

Rapport final du projet de recherche 14-C/2003

Titre du projet

**Etude des processus de dérive et de sélection liés aux pratiques d'élevage en
écloserie d'huître creuse**

Acromyne : ECLOGIGAS



**Partenaire 1 et coordinateur du projet : Laboratoire IFREMER de Génétique et
Pathologie (LGP), Mus-du-Loup, 17390 La Tremblade.**

Partenaire 2 : Genindexe, 6 rue des sports, 17000 La Rochelle

**Partenaire 3 : Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français (SYSAAF),
Station SCRIBE, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes**

Février 2006

Rappels concernant le projet :

Résumé du projet :

La production de juvéniles d'huîtres creuses en éclosion, alternative au collectage de naissain « naturel », est en expansion. Parallèlement aux possibilités de sélection au stade adulte pour des caractères d'intérêt aquacole, la reproduction en éclosion soulève des questions quant à l'impact génétique de cette phase d'élevage. L'objectif de ce projet est d'étudier les processus de dérive génétique (effet des tamisages sur la diversité) et de sélection sur des caractères de développement précoce (croissance et survie) en fonction des conditions environnementales (température et nourriture). Dans ce but, des expérimentations seront réalisées en milieu contrôlé. L'étude de la diversité sera basée sur des analyses de parenté par marqueurs microsatellites sur des individus issus de croisements contrôlés élevés en mélange. D'autre part, la diversité génétique des stocks de géniteurs des éclosiers français sera caractérisée et la variabilité de lots issus de ces éclosiers sera étudiée pour valider les résultats obtenus en expérimentation. L'ensemble des résultats permettra de proposer des recommandations en terme de gestion de la diversité dans les stocks de géniteurs, notamment en ce qui concerne les pratiques d'élevage aux stades précoces.

Calendrier du projet :

Date	Partenaire	Phase
Année 1		
1 – 3	GENINDEXE	Mise au point du multiplexage de 4 marqueurs microsatellites sur séquenceur ABI.
4 – 6	SYSAAF	Echantillonnages dans les éclosiers privés
6 – 12	LGP	Définition des conditions d'élevage larvaire « haute » et basse »
	LGP	Réalisation des élevages larvaires «avec et sans tamisage »
	LGP – GENINDEXE	Génotypage des larves «avec et sans tamisage » et des échantillons issus éclosiers privés.
Année 2		
1-3	LGP	Réalisation des élevages larvaires en conditions « haute et basse»
4 – 9	LGP - SYSAAF	Analyse des données obtenues en année 1
10 – 12	LGP – GENINDEXE	Génotypage des larves «haute et basse »
	LGP - SYSAAF	Analyse des données et établissement des recommandations pour la gestion de la variabilité génétique dans les éclosiers. Organisation d'une réunion de restitution des travaux avec les éclosiers privés.

Ce rapport final est constitué comme suit :

Page 3 : résumés en français et en anglais.

Pages 4-17 : rapport de synthèse présentant les résultats obtenus leurs analyses et interprétations.

Cette synthèse est actuellement soumise pour publication dans les actes du colloque du BRG qui se tiendra du 2 au 4 Octobre 2006 à La Rochelle et au cours duquel ces résultats seront présentés oralement.

Annexes :

- Thèse de doctorat (sans ses annexes) de Nicolas Taxis soutenue le 22 décembre 2005 à l'Université de La Rochelle. Cette thèse a été réalisée dans le cadre du présent projet.
- 2 articles (un publié, un en cours de publication) résultant de ce projet.

Résumé : Afin d'étudier les conséquences génétiques des pratiques de production de larves en éclosérie d'huître creuse, deux facteurs ont été examinés : l'effet de l'élimination des plus petites larves et l'effet de la température. Une approche de familles élevées en mélange a été utilisée afin d'avoir accès à l'information génétique au stade larvaire.

Les résultats obtenus montrent que l'assignation de parenté basée sur des marqueurs microsatellites hautement discriminants est un outil performant pour les études génétiques en phase larvaire. Bien qu'avantageuse d'un point de vue phénotypique, la pratique de tamisage sélectif représente un risque substantiel de perte de diversité si cette pratique n'est pas associée à une assignation de parenté par empreintes génétiques. La fixation des larves à croissance lente permet de minimiser la variabilité du succès reproducteur et de fait, de maximiser la variabilité génétique. Ces résultats corroborent les estimations de variabilité sur les stocks d'écloséries commerciales françaises où l'on constate une diversité allélique inférieure à celle de populations issues du milieu naturel. La température exerce également une influence sur la précocité de l'expression de la variabilité génétique pour la croissance larvaire. Ainsi une température élevée (26°C) associée à une procédure de tamisage peut amplifier l'effet sélectif. Enfin, la sélection de larves à croissance rapide semble démontrée, s'opposant à la dépression de consanguinité présumée en phase larvaire. Les conditions d'élevage peuvent donc avoir un effet génétique significatif qui devrait être pris en considération dans les pratiques d'éclosérie, notamment dans la gestion de la diversité génétique.

Mots-clés : *Crassostrea gigas* / larve / sélection-domestication / diversité génétique / éclosérie.

Abstract: Genetic consequences of production of Pacific oyster larval in hatchery: drift and selective pressures related to rearing practices. In order to study the genetic consequences of production of oyster larvae in hatcheries, two factors were examined: the effects of discarding the smallest larvae (i.e. culling) and temperature effects. A mixed-family approach was used in order to infer the genetic composition of the larval population. The results show that high polymorphic microsatellite-based family assignment is a powerful tool for the study of bivalve larvae genetics. Culling by selective sieving is an advantageous practice at a phenotypic scale, but also represents a substantial risk for diversity loss if parentage assignment is not introduced as a breeding practice. Settlement of slow growing larvae contributes to minimizing the variability of reproductive success and therefore to maximizing genetic diversity. These results corroborate the lower estimations of variability made on broodstocks from French commercial hatcheries relative to natural populations. Temperature exerts an influence on the expression of genetic variability for larval growth. A temperature of 26°C, coupled with culling could amplify the selective effect. Furthermore, selection of fast growing larvae has proven to counteract inbreeding depression at this stage. Genetic effects of intensive rearing conditions are significant and should be taken into account in hatchery practices, especially in terms of genetic diversity management.

Keywords: *Crassostrea gigas* / larvae / selection-domestication / genetic diversity / hatchery.

1. INTRODUCTION

Les mollusques marins occupent une place particulière au sein des animaux d'élevage. A l'instar des poissons, la plupart des espèces sont encore peu voire pas domestiquées, au sens zootechnique du terme [42]. En effet, la particularité du cycle de vie, alternant phase larvaire libre et adulte benthique, ne permet pas toujours une maîtrise complète des cycles d'élevage et de reproduction. Cette phase larvaire, généralement synonyme de forte fécondité [44] est aussi associée à une forte mortalité [41], [34].

Pour l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas*, mollusque le plus produit à l'échelle mondiale (4,4 millions de tonnes en 2003 [13]), les techniques de reproduction en milieu contrôlé sont aujourd'hui bien maîtrisées grâce à un savoir-faire développé depuis plusieurs décennies, permettant désormais d'alimenter de manière croissante une production dominée en France par le captage naturel [22]. Que la reproduction soit issue d'écloserie ou du milieu naturel, le reste du cycle d'élevage est néanmoins réalisé dans le milieu naturel. La phase larvaire est donc la seule particulièrement « sensible » aux effets potentiels de la production en milieu artificiel.

Compte tenu d'une demande de production de naissain d'écloserie sans cesse croissante, la question des conséquences de cette domestication zootechnique en phase larvaire se pose pour cette espèce, à la fois sur un plan très pratique de maintien de la variabilité génétique, mais également en terme de sélection de caractères pour un élevage plus performant.

L'objectif général de ce travail a été d'identifier les conséquences génétiques de certaines pratiques zootechniques d'élevage larvaire. Notre étude a plus particulièrement porté sur deux pratiques dont il semblait pertinent d'analyser les conséquences :

l'effet des tamisages sélectifs (sélection sur le taux de développement larvaire), pratiqués afin d'éliminer les plus petites larves pour ainsi homogénéiser et réduire les temps d'élevage.

l'effet de la température, facteur majeur de l'environnement d'élevage ayant une implication directe dans le taux de développement et donc la durée de la phase pélagique chez nombreux invertébrés benthiques marins [1].

Nous avons également suivi la descendance de deux populations de géniteurs, l'une issue d'écloserie, l'autre sauvage, afin de tester l'hypothèse d'une sélection de larves à croissance rapide en écloserie.

En parallèle, nous avons échantillonné différents lots de géniteurs afin d'obtenir une image de la diversité génétique de stocks issus de reproducteurs d'écloseries commerciales françaises.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Estimation de la variabilité génétique des stocks en écloserie commerciale

Le niveau de diversité génétique de différents lots d'écloserie commerciale (4 écloseries ici nommés A, B, C et D) a été évalué sur la base de trois marqueurs microsatellites (CG49, CG108 [26] et L10 [19]) et comparé à celui de deux populations sauvages de référence d'effectifs équivalents (toutes deux issues de captage naturel en bassin de Marennes-Oléron). Pour chacun des lots, plusieurs paramètres ont été estimés : le nombre d'allèles par locus, l'hétérozygotie observée (H_o) ainsi que l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg ($H_n.b.$), estimateur non biaisé d'hétérozygotie [28] tel que :

$$H_n.b. = [2n / (2n - 1)] \cdot [1 - \sum x_i^2]$$

avec x_i la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle, n étant la taille de l'échantillon.

Le F_{is} a également été calculé comme indice de fixation [43]. Les calculs de ces paramètres ont été réalisés à l'aide du logiciel GENETIX (version 4.05, [3]). Enfin, la fréquence des allèles nuls a été déterminée selon les méthodes de Chakraborty [8] et Brookfield [7].

2.2. Protocoles expérimentaux d'élevage

2.2.1 *Effets sélectifs du tamisage*

Afin d'étudier les effets d'une sélection des larves à croissance rapide par tamisage, différents caractères phénotypiques (croissance, survie, succès à la métamorphose) ont été suivis pour une

population larvaire issue d'un croisement factoriel (3 femelles x 10 mâles, soit 30 familles). Nous avons utilisé une approche de familles élevées en mélange afin de réduire les éventuels biais environnementaux [16]. Cette méthode implique une assignation rétrospective des individus aux familles. Pour cela, nous avons utilisé le jeu de trois marqueurs microsatellites précité en multiplexage [40]. Deux types d'élevage ont été suivis en parallèle (trois bacs de 50 litres pour chaque élevage). Pour le premier, les plus petites larves ont été progressivement éliminées par tamisage sélectif. Pour le second, la totalité de la population a été conservée jusqu'à métamorphose. L'intensité du tamisage sélectif a été ajustée de façon à éliminer 50% des larves et ce de manière progressive sur toute la durée de l'élevage. Lorsque les larves ont atteint le stade pédivéligère, une fraction a été prélevée pour analyse génétique. La "taille efficace" de population a ainsi été calculée d'après les données de contribution des fractions de larves pédivéligères échantillonnées. La formule utilisée est celle de Robertson [33] :

$$N_e = (\sum n_{ij})^2 / \sum n_{ij}^2$$

où n_{ij} est le nombre observé de descendants issus du mâle i et de la femelle j dans un échantillon donné.

2.2.2 Effets de la température sur le développement précoce

Afin d'étudier l'effet de la température, une même approche de famille en mélange a été mise en oeuvre. La descendance issue d'un croisement factoriel (4 femelles x 12 mâles, soit 48 familles) a été répartie en bacs d'élevage maintenus à 26°C et 20°C (trois bacs par condition). L'ensemble des larves a été conservé pour cette expérience (pas de sélection par tamisage). Des mesures individuelles de taille de larve ont été effectuées 22 jours après fécondation pour les deux conditions et 30 jours après fécondation à 20°C. Les larves mesurées ont été génotypées puis assignées. Des mesures de taille sur naissain génotypé ont aussi été réalisées 80 jours après fécondation. Ce naissain est issu de cohortes de larves fixées précocement ou tardivement.

2.2.3 Mise en évidence d'une réponse à une sélection précoce

Deux populations de géniteurs ont été utilisées pour cette expérience : la première composée des 47 individus de la population témoin sauvage 2, la seconde représentée par les 37 individus du lot 2 de l'écloserie A, issus de sept générations de reproduction et sélection. Les larves produites selon quatre types de croisement (femelles sauvages x mâles sauvages, (SxS), femelles d'écloserie x mâles d'écloserie (ExE), et les croisements hybrides correspondants (SxE ; ExS)) ont été suivies au travers de différents paramètres : croissance, survie et succès à la fixation (ou métamorphose). La distribution des fréquences de taille des larves a été examinée par analyse des progressions modales. La décomposition modale a été déterminée sur la base des méthodes de Bhattacharya [5] et Normsep [16] via le logiciel Fisat [14]. Des estimations de parenté ont également été déterminées selon la méthode des moments [32] entre tous les couples potentiels de géniteurs (340 paires dans le cas de la population d'écloserie (20 femelles, 17 mâles) et 462 pour la population sauvage (33 femelles, 14 mâles)).

2.3. Analyses statistiques des données

Les analyses statistiques relatives aux données phénotypiques et génétiques des différents protocoles expérimentaux impliquent deux types d'effets qualifiés de fixes (exemple : effet du traitement) et aléatoires (exemple : effet d'interaction). En conséquence, les données suivant une distribution normale ont été analysées en utilisant le principe des modèles linéaires mixtes (Proc MIXED, SAS/STAT® software [36]). Les données suivant une loi binomiale ou de Poisson ont été analysées sur le modèle mixte généralisé suivant la Macro-procédure GLIMMIX (équivalent à MIXED pour les données ne suivant pas une normale) du logiciel SAS [24]. Pour les deux procédures, les tests de significativité pour les effets fixes sont basés sur une statistique F. Pour les effets

aléatoires, les tests sont basés sur les rapports de vraisemblance entre sous-modèles, lesquels suivent de manière asymptotique une distribution du χ^2 [24].

3. RESULTATS

3.1. Variabilité génétique des stocks en éclosion commerciale (tableau I)

3.1.1 *Diversité allélique*

Comparée à la moyenne des deux populations témoins (32 allèles multilocus), les populations des éclosures A, B et D présentent une diversité allélique inférieure à celles des populations sauvages de l'ordre de 60 % (50 à 77 % selon les loci). En moyenne, elles présentent entre 10 et 15 allèles par locus contre 30 et 34 pour les populations sauvages. Considérant 7 générations de sélection (lots 1 et 2 de la population A), la perte moyenne par génération serait donc sensiblement inférieure à 10 % par génération si la population fondatrice présentait une variabilité équivalente à celles des populations sauvages. Les lots de la population C montrent une diversité allélique comparable à celle des témoins sauvages.

3.1.2 *Hétérozygotie*

Les lots des éclosures A, C et D présentent respectivement 21%, 17% et 6% de d'hétérozygotie (analyse multilocus) en moins, passant d'une valeur moyenne de 0,84 à des valeurs comprises entre 0,66 et 0,79. Par ailleurs, une forte variance est observée entre les loci : L10 présentant jusqu'à 50 % de baisse d'hétérozygotie et CG49 une augmentation de 19 % pour les lots de l'éclosion D. A contrario, les lots de l'éclosion C présentent des valeurs observées très élevées. En analyse multilocus, près de 99% des individus sont observés comme hétérozygotes. Concernant les valeurs de Fis, les valeurs multilocus sont significativement supérieures à 0 pour l'ensemble des populations échantillonnées, exception faite de la population éclosion B dont l'hétérozygotie observée est systématiquement plus élevée que l'hétérozygotie attendue non biaisée.

Tableau I: Paramètres généraux de l'analyse de variabilité génétique des populations échantillonnées.

		Témoïn 1	Témoïn 2	Ecloserie A		Ecloserie B	Ecloserie C		Ecloserie D	
				Lot 1	Lot 2		Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2
	N	50	47	49	37	65	50	50	50	50
Cg108	Nb _{individus}	50	46	49	37	64	49	50	50	46
	Nb _{allèles}	32	37	13	9	13	29	26	9	17
	H _{obs}	0,880	0.891	0,796	0,590	0,984	0.714	0.680	0.840	0.804
	H _{n.b.}	0,957	0.974	0,719	0,610	0,868	0.958	0.953	0.817	0.905
	F _{is}	0,085	0.086	-0,108	0,028	-0,135	0.256	0.288	-0.028	0.112
		*	*	ns	ns	ns	**	**	ns	*
	rC	0,04	0.04	-0,05	0,02	-0,06	0.15	0.17	-0.01	0.06
rB	0,04	0.06	0	0,01	0,02	0.14	0.14	0.00	0.05	
L10	Nb _{individus}	50	47	49	37	65	50	50	50	46
	Nb _{allèles}	33	37	10	8	11	32	30	9	15
	H _{obs}	0,900	0.894	0,449	0,65	1,000	0.500	0.580	0.913	0.747
	H _{n.b.}	0,965	0.969	0,801	0,80	0,844	0.960	0.960	0.500	0.587
	F _{is}	0,068	0.079	0,442	0,198	-0,186	0.481	0.398	0.333	0.359
		*	*	**	**	ns	**	**	**	**
	rC	0,04	0.04	0,28	0,10	-0,09	0.31	0.25	0.20	0.22
rB	0,03	0.04	0,20	0,08	0,00	0.23	0.19	0.14	0.17	
Cg49	Nb _{individus}	50	46	49	37	65	50	50	50	46
	Nb _{allèles}	25	28	13	13	13	30	30	11	13
	H _{obs}	0,640	0.804	0,735	0,712	0,985	0.860	0.880	0.880	0.913
	H _{n.b.}	0,939	0.944	0,888	0,900	0,888	0.961	0.961	0.838	0.872
	F _{is}	0,320	0.150	0,174	0,198	-0,110	0.105	0.085	-0.050	-0.046
		**	*	**	*	ns	**	*	ns	ns
	rC	0,19	0.08	0,09	0,11	-0,05	0.06	0.04	-0.02	-0.02
rB	0,15	0.09	0,08	0,09	0,00	0.05	0.04	0.00	0.00	
Multilocus	Nb _{allèles}	30	34	12	10	12	30	29	10	15
	H _{obs}	0,807	0.863	0,660	0,66	0,990	0.691	0.713	0.801	0.768
	H _{n.b.}	0,954	0.962	0,803	0,77	0,867	0.960	0.958	0.793	0.897
	F _{is}	0,155	0.104	0,180	0,15	-0,144	0.282	0.257	0.077	0.145
	**	**	**	**	ns	**	**	*	**	

Les indices *F_{is}* sont suivis d'un test de significativité en effectuant un certain nombre de permutations (1000) sur le fichier de données. L'idée sous-jacente est d'obtenir la distribution de l'estimateur sous l'hypothèse nulle *H₀*. La valeur observée sur les données réelles est ensuite comparée à la distribution obtenue, et permet d'obtenir une estimation de la probabilité d'obtenir une valeur > ou = à la valeur observée sous *H₀* ; (ns) correspond à des valeurs non significatives de *p*, * de *p*<0,05 et ** *p*<0,01 après correction de Bonferroni sur les locus.

3.2. Effets sélectifs du tamisage

3.2.1. Caractères phénotypiques

La procédure d'élimination progressive des plus petites larves a abouti à une réduction moyenne de l'effectif de la population d'environ 50% (pourcentage cumulé sur la durée de l'élevage) par rapport au témoin. Conséquence de cette pratique, la proportion de larves restantes 17 jours post-fécondation est de $46,8 \pm 9,2\%$ pour le témoin contre $30,5 \pm 5,3\%$ pour la condition avec tamisage. A partir de ces résultats, il est possible de déduire que la mortalité non liée au tamisage est de 14,2% plus importante dans la condition témoin après 17 jours. Ceci repose sur le postulat que dans la condition "tamisage", considérant 50% d'élimination, 61,1% de larves devraient être présentes 17 jours post-fécondation (signifiant aussi que cette fraction de larves éliminées par tamisage ne serait pas morte "spontanément" à cette date si elle n'avait pas été éliminée).

Cette sélection sur la taille a également un effet sur la croissance larvaire moyenne ($\chi^2 = 427,2$; $p < 0,001$) et sur le coefficient de variation des longueurs moyennes ($\chi^2 = 14,7$, $p < 0,001$) calculés sur l'ensemble de l'élevage. Les ANOVAs réalisées aux différentes dates de filtration montrent que le coefficient de variation des longueurs moyennes diffère entre traitements à partir du 10^{ème} jour d'élevage ($F = 12,6$; $p < 0,001$), même chose pour la taille des larves mais à partir du 13^{ème} jour ($F = 12,5$; $p < 0,001$). La taille moyenne larvaire qui en résulte est de $222,7 \pm 29,3 \mu\text{m}$ (coefficient de variation = 7,5%) pour la condition sélective contre $204,1 \pm 29,3 \mu\text{m}$ (coefficient de variation = 14,4%) pour le témoin.

Pour les deux conditions, les premières larves pédivéligères apparaissent 20 jours post-fécondation. La mortalité larvaire reste négligeable après cette date dans tous les bacs. Dans les bacs avec tamisage, les larves ont atteint le stade pédivéligère dans le temps moyen de 21 jours contre 24 jours pour les larves des bacs témoins.

En accord avec la tendance observée pour le coefficient de variation sur la taille, le tamisage sélectif mène à définir une fenêtre temporelle de fixation plus courte (5 jours contre 11, figure 1). D'autre part, les trois premiers jours de fixation représentent environ 89% des larves pédivéligères pour la condition sélective. Pour le témoin, les effectifs de larves arrivant à fixation suivent un schéma beaucoup plus progressif, étalé sur une durée plus longue.

Le nombre total moyen de larves atteignant le stade pédivéligère est logiquement plus faible avec tamisage (164 860 contre 240 000). Cependant, le nombre relatif de larves présentes le premier jour qui atteignent ce stade est plus élevé (61,1% contre 48,8%). Finalement, le succès à la métamorphose est aussi plus élevé en condition de tamisage ($61,8 \pm 3,9\%$ contre $48,6 \pm 16,0\%$), menant à un nombre de juvéniles quasi-équivalent entre les conditions dix jours après fixation.

3.2.2. Contributions parentales

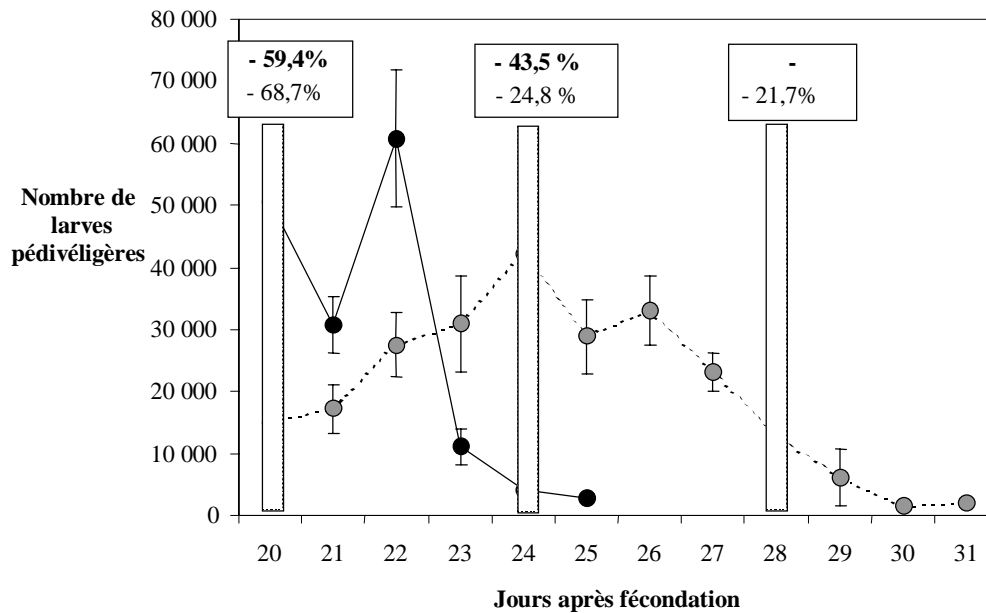
L'ensemble de l'échantillonnage pour analyse des contributions parentales représente 1440 larves. En effet, 96 larves par réplicat de chaque condition ont été génotypées 20, 25 et 28 jours post-fécondation. Ainsi, 90% des larves ont été assignées à un couple parental.

Au travers des effets significatifs d'interaction mâle*temps et femelle*temps (respectivement $\chi^2 = 28,6$; $p < 0,001$ et $\chi^2 = 17,7$; $p < 0,001$), les contributions parentales ont une évolution significative dans le temps. Nous observons ainsi un différentiel des contributions parentales entre larves prêtes à fixer précocement (20 jours post-fécondation) et tardivement (25 ou 28 jours post-fécondation selon la condition d'élevage). Par ailleurs, pour les cohortes de larves arrivées à métamorphose 20 jours post-fécondation, que ce soit en condition de tamisage sélectif ou pour le témoin, il existe un différentiel significatif entre contributions paternelles ($\chi^2 = 16,7$; $p < 0,001$ en condition tamisage ; $\chi^2 = 8,3$; $p < 0,004$ pour le témoin) et maternelles ($\chi^2 = 30,3$; $p < 0,001$ en condition tamisage ; $\chi^2 = 4,2$; $p < 0,04$ pour le témoin). Au 25^{ème} jour post-fécondation, le différentiel de contributions précédemment décrit disparaît, pour laisser place à une homogénéisation des données de contribution. De même, pour la cohorte fixée 28 jours post-fécondation (condition témoin uniquement), les contributions sont plus homogènes (pas de différences significatives de contributions maternelles, $\chi^2 = 0$; $p = 0,99$).

Ces données sont appuyées par l'évolution de l'effectif efficace « instantané » calculé à chacune des trois dates d'échantillonnage, exprimé en perte de diversité (%) par rapport à la valeur initiale de

référence (à la fécondation, figure 1). Au 20^{ème} jour post-fécondation, la perte de Ne atteint 68,7 % et 59,4 %, respectivement pour le témoin et la condition sélective. Au 25^{ème} jour post-fécondation, les Ne augmentent puisque la perte par rapport à la valeur initiale n'est plus que de 24,8 % pour l'élevage sans tamisage contre 43,5 % avec tamisage. Au dernier point d'échantillonnage, seul le témoin reste, affichant une valeur de l'ordre de la précédente date (-21,7 %).

Figure 1 : Evolution temporelle du nombre de larves pédivéligères et estimations des tailles efficaces aux jours 20, 25 et 28 post-fécondation pour les deux conditions d'élevage exprimées en perte de diversité (%) par rapport à la valeur initiale de référence.



3.3. Effets de la température

3.3.1. Données phénotypiques au stade larvaire

Dès le premier jour d'élevage, la température influence de manière significative le taux de croissance larvaire ($F = 182,8$; $p < 0,001$). Durant l'élevage, le diamètre moyen des larves placées à 26°C a toujours été supérieur à celui des larves placées à 20°C. Il existe un effet significatif du traitement sur le taux de croissance larvaire pour l'ensemble de la période d'élevage ($\chi^2 = 401,4$; $p < 0,001$).

L'effet de la température est significatif sur la survie pour l'ensemble de la durée d'élevage ($\chi^2 = 8,1$; $p = 0,004$). A 26°C, les premières cohortes de larves pédivéligères sont apparues au 23^{ème} jour d'élevage. La fenêtre temporelle de fixation s'est étendue sur 9 jours selon les lots. Nous avons groupé l'ensemble de larves mises en fixation en 3 cohortes de 3 jours. Les premières pédivéligères à 20°C ne sont apparues que 33 jours après fécondation. Pour chaque lot, 9 jours de mise à fixation ont également été observés (divisés en 3 cohortes de 3 jours).

Pour la condition 26°C, $44,0 \pm 4,8\%$ des larves présentes 3 jours après fécondation ont atteint la fixation, contre $5,4 \pm 4,2\%$ pour la condition 20°C.

A 26°C, le taux moyen de fixation (sur l'ensemble des trois cohortes temporelles) a été de $38,1 \pm 6,0\%$. A 20°C, le taux moyen a été de $6,8 \pm 5,2\%$.

3.3.2. Données de génotypages au stade larvaire

Sur les 2592 larves échantillonnées (3 points d'échantillonnage : 22 jours après fécondation pour les deux conditions et 30 jours après fécondation à 20°C), 2073 ont été génotypées et assignées sans ambiguïté à un couple de parents (80% d'assignation).

3.3.2.1 Contributions parentales

Les contributions (mâles et femelles, figures 2 et 3) sont distinctes pour le point J22-20°C des deux autres (comparaison J22-20°C vs J22-26°C : mâles $\chi^2 = 22,8$; $p < 0,001$, femelles $\chi^2 = 8,6$; $p < 0,001$; comparaison J22-20°C vs J30-20°C : mâles $\chi^2 = 39,6$; $p < 0,001$, femelles $\chi^2 = 8,2$; $p < 0,001$). Les deux échantillons précédant la phase de fixation sont beaucoup plus proches en terme de contribution (mâles $\chi^2 = 4,1$; $p < 0,04$, femelles $\chi^2 = 0$; ns).

Figure 2: Différentiel des contributions maternelles entre valeurs observées et attendues en fonction des taux d'éclosion (No=contribution observée ; Na=contribution attendue)

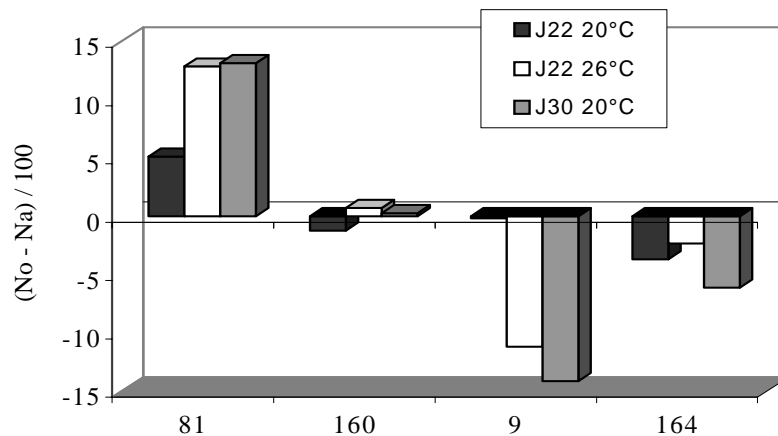
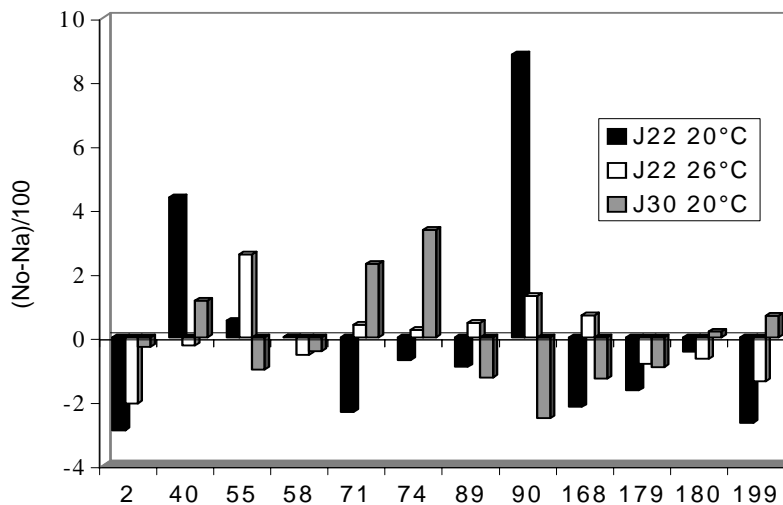


Figure 3 : Différentiel des contributions paternelles entre valeurs observées et attendues en fonction des taux d'éclosion (No=contribution observée ; Na=contribution attendue)



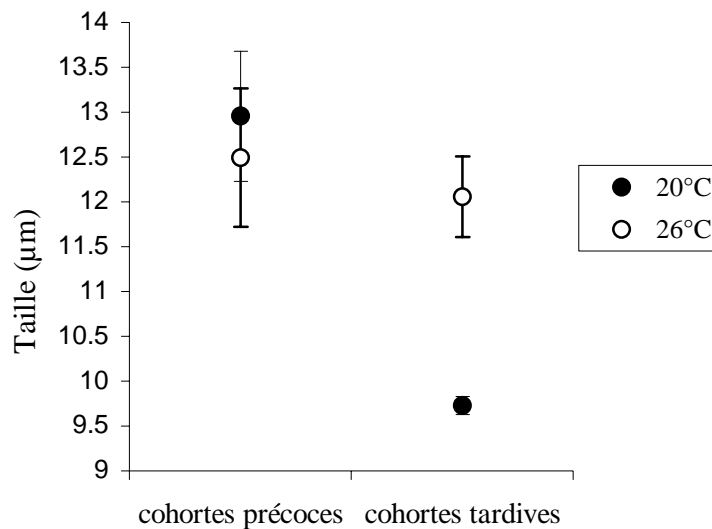
3.3.2.2 Croissance

Concernant les mesures de larves génotypées, il n'existe pas de différence entre les points précédant la phase de fixation dans les deux conditions (mâles $\chi^2 = 0,1$; $p = 0,75$, femelles $\chi^2 = 3$; $p = 0,08$). Autrement dit, les familles de demi-frères (voie paternelle et maternelle) ont globalement les mêmes tailles pour ces deux points. A contrario, le point J22-20°C se distingue du point J22-26°C via une différence significative par la voie mâle ($\chi^2 = 11,7$; $p < 0,001$) et du point J30-20°C via une différence significative par la voie maternelle ($\chi^2 = 10,8$; $p < 0,01$).

3.3.3 Données phénotypiques au stade naissain

Le naissain issu de cohortes de fixation tardives présente des tailles inférieures au naissain issu des cohortes plus précoces (figure 4). Cependant, à 26°C, la différence entre cohorte tardive et précoce n'est pas statistiquement significative ($\chi^2 = 0,01$; ns). Par contre, à 20°C, le retard reste significatif ($\chi^2 = 21,1$; $p < 0,001$).

Figure 4 : Taille moyenne du naissain par cohortes de fixation et température (« cohortes précoces », correspond à des individus fixés durant les premiers 3 jours de la période de fixation (sur 9 jours au total) ; « tardives », correspond à des individus fixés durant les derniers 3 jours)



3.3.4 Données de génotypages au stade naissain

Pour la condition 20°C, l'analyse statistique indique une différence significative (voie femelle $\chi^2 = 25,9$; $p < 0,001$, voie mâle $\chi^2 = 25,3$; $p < 0,001$) entre contributions des juvéniles issus de cohortes de fixation précoce et tardive. La condition 26°C montre également une différenciation entre cohortes (voie femelle $\chi^2 = 6,1$; $p < 0,05$, voie mâle $\chi^2 = 10,7$; $p < 0,01$). Les contributions des juvéniles issus de cohortes précoces à 20 et 26°C sont significativement différentes (voie femelle $\chi^2 = 17,2$; $p < 0,001$, voie mâle $\chi^2 = 25,5$; $p < 0,001$), même résultat pour la comparaison entre cohortes tardives (voie femelle $\chi^2 = 17,2$; $p < 0,001$, voie mâle $\chi^2 = 14,1$; $p < 0,001$).

3.4. Réponse à la sélection sur la taille en phase précoce

Du fait des différences de taille efficace mises en évidence précédemment, la parenté moyenne de la population issue d'écloserie est supérieure (près de six fois) ($r = 0,068 \pm 0,005$ contre $r = 0,012 \pm 0,001$) à celle de la population sauvage.

La distribution des fréquences de taille des larves varie nettement au cours de l'élevage larvaire en fonction de l'origine du croisement. Afin d'éviter le biais dû à un effet de densité, nous avons choisi de ne représenter que les réplicats des conditions ExE et SxS dont les nombres de larves étaient équivalents 3 jours post-fécondation (figure 5).

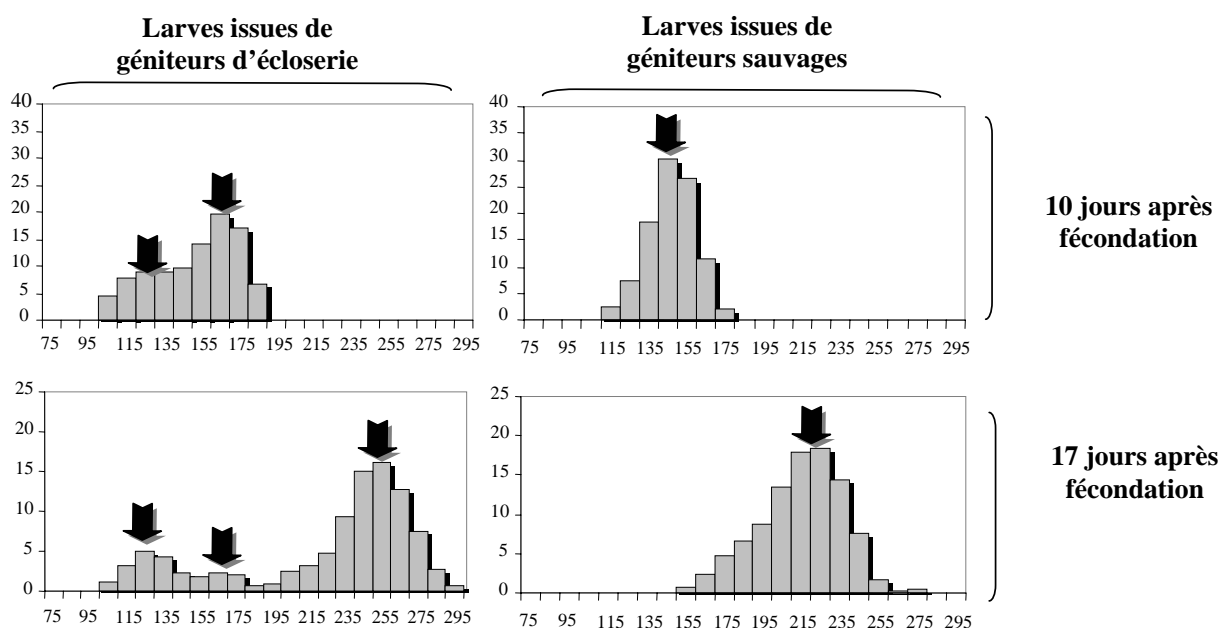
Le lot ExE tient une place particulière dans la mesure où une décomposition bimodale de la distribution de classe de taille dès le 10^{ème} jour post-fécondation est observable. Cette bimodalité se distingue encore plus nettement par la suite. En parallèle, les larves issues des trois autres types de croisements montrent une distribution unimodale. La structure plurimodale est confirmée pour le reste des dates d'échantillonnage pour le croisement ExE. Ainsi après 17 jours d'élevage, trois modes sont observables (figure 5).

En relation avec les distributions de fréquence de taille précédemment décrites, l'évolution temporelle des coefficients de variation sur la taille démarque le croisement ExE des trois autres.

La survie des larves issues du croisement ExE est significativement plus faible (SxE, $F = 9,41$, $p = 0,05$; SxS, $F = 11,25$, $p = 0,028$), sauf comparée avec la survie des larves SxE. En cause, la mortalité des larves issues du mode dont la croissance est la faible, par opposition au groupe de larves à croissance plus rapide. Les larves SxS montrent le meilleur taux de survie après 20 jours, mais ne diffèrent cependant pas statistiquement des valeurs obtenues pour les descendants hybrides ($p = 0,38$ et $p = 0,72$).

Pour l'ensemble des lots, la fenêtre temporelle de fixation s'étend sur 12 jours (entre 20 et 32 jours post-fécondation). Pour le croisement ExE, 90% des larves pédivéligères sont présentes dans les six premiers jours. Les effectifs observés après cette période restent résiduels (moins de 10%). La distribution des effectifs pour les autres croisements est plus progressive et se rapproche d'une normale. Par ailleurs, les résultats de l'estimation globale du taux de fixation donnent les valeurs respectives suivantes : 90,7% (ExE), 72,3% (SxS), 78,1% (ExS) et 68,7 (SxE).

Figure 5 : Histogrammes de distribution des tailles de larves pour les descendants des croisements Ecloserie x Ecloserie et Sauvage x Sauvage, 10 et 17 jours post-fécondation.



4. DISCUSSION

4.1. Pertinence de l'approche « famille en mélange »

L'élevage des larves en mélange constitue une approche originale de la problématique. Déjà fréquemment utilisée pour certaines espèces de poisson, elle est en revanche relativement nouvelle pour les bivalves [6]. Malgré un coût initial lié aux génotypages, elle permet d'augmenter le nombre de familles étudiées (donc la puissance de l'analyse génétique) et de s'affranchir des hétérogénéités environnementales qui biaisent les estimations des effets génétiques. Grâce à seulement trois marqueurs dont la variabilité allélique est d'environ 30 allèles en populations sauvages, l'assignation de parenté offre des résultats satisfaisants. Ainsi pour l'ensemble des expériences menées, sur les 4032 larves individualisées pour génotypage, 3369 ont pu être assignées avec certitude à un couple de géniteurs (soit 84%). La difficulté d'extraction d'ADN sur ce type de matériel explique les 16% manquants. En cela, les méthodes de conservation des larves paraissent perfectibles. Malgré cela, la méthode d'extraction couplée au multiplexage permet une analyse simple et efficace pour optimiser les assignations de parenté. Concernant la capacité d'analyse de la diversité des stocks de géniteurs, ce jeu de marqueurs constitue également un outil précieux car rapide et informatif. Il existe désormais un nombre de marqueurs microsatellites suffisamment abondant ([26], [19], [23], [37], [18], [45]) pour déterminer d'autres jeux de marqueurs afin d'améliorer cette résolution, mais cela sera associé à un coût de génotypage forcément supérieur.

4.2. Conséquences pratiques d'une sélection en phase larvaire

Considérant dans un premier temps l'effet du tamisage, nous sommes confrontés à deux résultats, qui considérés l'un sans l'autre, peuvent mener à des interprétations différentes. Les résultats d'un point de vue phénotypique, montrent que la sélection sur la taille a eu un effet plus important sur la variabilité des tailles de larves, homogénéisant ces dernières, que sur la croissance moyenne. Ces résultats suggèrent que le tamisage sélectif induisant une élimination des petites larves, est une procédure permettant un gain de temps à la fixation, aboutissant à une réduction de production relativement limitée du fait de la meilleure survie relative et du meilleur succès à la fixation des larves à croissance rapide. D'un point de vue génétique, il y a cependant un risque substantiel de perte de diversité lié à cette pratique. Laing et Earl [22] avaient déjà supposé de l'importance des cohortes tardives dans le but de minimiser les effets de dérive génétique dans les stocks d'écloserie et proposé le maintien de l'ensemble de la population larvaire pour la production de naissain. Nos données confirment leurs hypothèses. Le maintien de ces cohortes tardives est important car il permet de minimiser la variabilité du succès reproducteur entre et de fait, de maximiser la variabilité génétique des lots résultants.

Ces résultats font écho aux estimations de variabilité sur les stocks d'écloseries commerciales où l'on peut constater (sauf exception, écloserie D) une diversité allélique inférieure à celle des populations témoins échantillonnées en milieu naturel. A noter que pour la population de l'écloserie B, 99 % des individus sont observés comme hétérozygotes. Ces données semblent nous renseigner sur le mode de gestion du stock et sont vraisemblablement le résultat d'une procédure de sélection en population semi-fermée. On peut aussi légitimement penser qu'il s'agit d'une population ayant subi un goulot d'étranglement (suivi d'un croisement avec des individus d'une population sauvage), expliqué par le fait que la diversité allélique diminue plus vite que l'hétérozygotie après un tel événement [27].

Ces éléments renvoient également à la troisième expérience menée, révélant l'expression supposée d'un fardeau génétique en phase larvaire au travers de la sous-population (ExE) de larves à croissance lente dont la survie est quasi-nulle en fin d'élevage. Les effets négatifs de croisements entre apparentés (dépression de consanguinité) sont présumés, non plus cette fois dans des croisements expérimentaux visant à générer de la consanguinité [5], [21], mais dans un cadre concret d'une population d'écloserie commerciale. L'effet positif de la sélection sur la taille (meilleur succès à la métamorphose de la sous-population à croissance rapide issue du croisement ExE) s'oppose à l'expression présumée du fardeau génétique. Par ailleurs, le bénéfice apparent de la sélection des larves à croissance rapide peut aussi

être discuté. Différentes études rapportent une corrélation positive entre caractères au stade larvaire (croissance le plus souvent) et post-larvaire permettant d'envisager positivement une pratique de tamisage (*C. gigas* : [9], *C. virginica* : [30], [15], [25]). Newkirk et Haley [31] et Newkirk [29] discutent cependant le fait que cet avantage en phase précoce de développement tend à disparaître avec le temps, même si ce dernier peut se retrouver dans les premiers mois après métamorphose. De plus, l'existence d'une corrélation génétique négative entre croissance larvaire et succès à la métamorphose [12], ne plaide pas en faveur d'un tamisage sélectif.

L'influence de la température, au travers d'une expression plus précoce (en condition chaude, 26°C) de la variabilité génétique sur un caractère comme la croissance, doit également être prise en compte. La variabilité génétique pour la croissance larvaire s'exprimant précocement à 26°C (température proche de celles appliquées en conditions contrôlées d'écloserie), l'effet du tamisage au cours du développement larvaire est d'autant plus significatif sur la perte de diversité.

On peut conclure que le tamisage sélectif ne semble pas trouver de véritable appui en terme de pratique systématique, en tout cas du point de vue de la diversité génétique. Car il est aussi évident que l'élimination des « queues de lot » peut, dans un contexte sanitaire, être utile de façon à éviter le développement d'éléments pathogènes ou une dégradation du milieu d'élevage liés décomposition des larves mortes. Il reste à déterminer la limite entre un tamisage « trop sélectif » pour la diversité génétique des stocks et un tamisage préservant cette diversité et permettant aux éclosiers de réaliser un élevage dans des délais compatibles avec les contraintes économiques et/ou zoo-sanitaires de production.

Considérant l'effet de la température, il semble plus difficile de tirer des conclusions claires. Nous avons vu que la variabilité génétique pour la taille est exprimée plus précocement durant l'élevage des bacs maintenus à 26°C. Cette température est, comme montré à de nombreuses reprises, favorable à un développement larvaire optimal de l'espèce. Ainsi, les taux de survies et de fixation à 20°C sont nettement plus faibles. De surcroît, la température en phase larvaire interagit avec la croissance des juvéniles et l'hypothèse d'une corrélation positive entre croissance larvaire et juvénile est partiellement soutenue puisque uniquement démontrée à 20°C. C'est incontestablement en association avec une pratique de tamisage sélectif que l'influence de la température est intéressante tant celle-ci permet une expression supérieure de la variabilité.

5. CONCLUSION

Ces travaux apportent des éclaircissements sur les processus sélectifs appliqués en écloserie. Il apparaît de façon assez claire que les conséquences des pressions de sélection que nous avons envisagées sont importantes en terme de gestion de la variabilité. Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de définir un ratio optimal d'élimination, qui à la fois pourrait minimiser la perte relative de naissain et maximiser la réduction de variabilité dans la fenêtre temporelle de fixation. La répétabilité de certains résultats reste à examiner.

La partie concernant une réponse à la sélection mérite aussi d'être approfondie avec la mise en place de protocole incluant des points d'échantillonnage plus tardifs dans le temps, comme par exemple 1 an après métamorphose de façon à confirmer l'avantage sélectif sur la croissance.

Les résultats obtenus dans ce contexte très particulier de domestication pourraient également d'être confirmés et développés, suivant cette fois une approche plus fondamentale de génétique quantitative, focalisée entre autre sur les bases génétiques (et leur plasticité) de caractères larvaires d'intérêt. L'approche famille en mélange doit permettre de considérer ces éléments dans un contexte environnemental « standard ».

De façon plus générale, il serait important d'envisager un effort supplémentaire sur le développement de jeux de marqueurs. Le jeu de trois marqueurs est un outil précieux mais on pourrait aisément le compléter par d'autres car plus d'une centaine sont aujourd'hui disponibles. Leur intérêt tiendrait notamment dans la possibilité de choisir au mieux les géniteurs à l'origine de nouveaux stocks en minimisant leur apparentement. Cela fait écho au concept de « parenté minimale » (« minimal kinship ») envisagé pour les élevages de poissons par de nombreux auteurs [2], [11], [39],

[35], [38]. Le principe est de déterminer et de privilégier les individus présentant une « parenté » minimale, minimisant l'effet de dérive et de consanguinité. Cette approche repose sur le calcul des coefficients du type de ceux employés dans la troisième expérience.

Enfin, l'approche famille en mélange, qui dans ce projet a été focalisée sur le stade larvaire, pourrait cette fois-ci être mise en oeuvre pour d'autres stades. Elle constituerait une « première » chez *C. gigas*, permettant de compléter les données issues des approches plus classiques d'élevage en familles séparées [10]. La faisabilité de cette démarche reste à démontrer chez les bivalves. A quel point le fort déséquilibre de contribution parentale est-il le plus faible pour envisager de mélanger les familles sans déséquilibrer cette répartition une fois les huîtres placées sur les parcs d'élevage ? Nous avons vu que l'espèce est caractérisée par une forte variance du succès reproducteur, associée à la possibilité d'expression du fardeau génétique. Le maintien d'un niveau important de diversité génétique afin de minimiser les effets de consanguinité, est essentiel pour une gestion durable et efficace des géniteurs dans les écloséries commerciales.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Aldana-Aranda D., Baqueiro C., Suarez V.P., Overview of temperatures used in larviculture of *Strombus* spp., Proceedings Gulf and Caribbean Fisheries Institute 52 (2001) 327-339.
- [2] Ballou J.D., Lacy R.C., Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed population, In Ballou, J.D., Gilpin, M., Foose, T.J. (Eds.), Population Management for Survival and Recovery. Columbia Univ. Press, New York, 1995, pp. 76-111.
- [3] Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F., GENETIX 4.05, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France), 1996-2004.
- [4] Bhattacharya C.G., A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components, Biometrics 23 (1967) 115-135.
- [5] Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y., Bonhomme F., Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae, Genetics 148 (1998) 1893-1906.
- [6] Boudry P., Collet B., Cornette F., Hervouet V., Bonhomme F., High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses, Aquaculture 204 (2002) 283-296.
- [7] Brookfield J.F.Y., A simple new method for estimating null alleles frequency from heterozygote deficiency, Mol. Ecol. 5 (1996) 453-455.
- [8] Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S.P., Budowle B., Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications, Ann. Hum. Genet. 56 (1992) 45-57.
- [9] Collet B., Boudry P., Thebault P., Heurtebise S., Morand B., Gérard A., Relationship between pre- and post settlement growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), Aquaculture 175 (1999) 215-226.
- [10] Dégremont L., Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Thèse de Doctorat de l'Université de Caen, 2003, 333 p.
- [11] Doyle R.W., Perez-Enriquez R., Takagi M., Taniguchi N., Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations, Genetica 111 (2001) 291-304.
- [12] Ernande B., Clobert J., McCombie H., Boudry P., Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) : A quantitative genetics study, J. Evolution. Biol. 16 (2003) 399-411.
- [13] FAO, Aquaculture production : quantities 1950-2003 Fishstat Plus, 2005.
<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>
- [14] FiSAT (FAO-ICLARM Stock Assessment Tools). Gayanilo F.C.Jr., Sparee P., Pauly D., Food and Agriculture Organization of the united nations, Rome, 2002.
<http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/fisat/downloads.htm>

- [15] Haley L.E., Newkirk G.F., Selecting oysters for faster growth, *Proceedings of the World Mariculture Society* 8 (1978) 557-564.
- [16] Hasselblad V., Estimation of parameters for a mixture of normal distributions, *Technometrics* 8 (1966) 431-444.
- [17] Herbinger C.M., O'Reilly P.T., Doyle R.W., Wright J.M., O'Flynn F., Early growth performance of Atlantic salmon full-sib reared families reared in single family tanks versus in mixed family tanks, *Aquaculture* 173 (1999) 105-116.
- [18] Hubert S., Hedgecock D., Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Genetics* 168 (2004) 351-362.
- [19] Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C., Bonhomme F., Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the other cupped oyster species, *Anim. Genet.* 31 (2000) 71-72.
- [20] Laing I., Earl N.H., The lipid content, spatfall and subsequent growth of early and late settling hatchery-reared Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg larvae, *Aquac. Res.* 29 (1998) 19-25.
- [21] Launey S., Hedgecock D., High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Genetics* 159 (2001) 255-262.
- [22] Le Roux S., Un marché très demandeur sur le naissain d'écloserie, *L'Ostréiculteur français* 174 (2004).
- [23] Li G., Hubert S., Bucklin K., Ribes V., Hedgecock D., Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Mol. Ecol. Notes* 3 (2003) 228-232.
- [24] Littell R.C., Milliken G.A., Stroup W.W., Wolfinger R.D., SAS system for mixed models, SAS Inst., Cary, NC, 1996.
- [25] Losee E., Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (*Crassostrea virginica*), *Aquaculture* 16 (1979) 123-126.
- [26] Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V., Zouros E., Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Anim. Genet.* 29 (1998) 69-70.
- [27] Nei M., Maruyama T., Chakraborty, The bottleneck effect and genetic variability in populations, *Evolution* 29 (1975) 1-10.
- [28] Nei M., *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 1987.
- [29] Newkirk G.F., On the unpredictability of bivalve growth rates: is a slow growing juvenile oyster a runt for life?, in : Claus, C. et al. (Ed.). *Nursery Culturing of Bivalve Molluscs: Proceedings of the International Workshop on Nursery Culturing of Bivalve Molluscs Ghent, Belgium, 24-26 February 1981*, European Mariculture Society Special Publication 7 (1981) 211-218.
- [30] Newkirk G.F., Haley L.E., Waugh D.L., Doyle R., Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*, *Mar. Biol.* 41 (1977) 49-52.
- [31] Newkirk G.F., Haley L.E., Phenotypic analysis of the European oyster *Ostrea edulis* L. : relationship between length of larval period and postsetting growth rate, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 59 (1982) 177-184.
- [32] Ritland K., Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients, *Genet. Res.* 67 (1996) 175-185.
- [33] Robertson A., Inbreeding in artificial selection programmes, *Genet. Res.* 2 (1961) 189-194.
- [34] Rumrill S.S., Natural mortality of marine invertebrate larvae, *Ophelia* 32 (1990) 163-198.
- [35] Russello M.A., Amato G., *Ex situ* population management in the absence of pedigree information, *Mol. Ecol.* 13 (2004) 2829-2840.
- [36] SAS Institute Inc., *SAS/STAT User's Guide, Version 8, vol. 2*. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1999.
- [37] Sekino M., Hamaguchi M., Aranishi F., Okoshi K., Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Mar. Biotech.* 5 (2003) 227-233.
- [38] Sekino M., Sugaya T., Hara M., Taniguchi N., Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Aquaculture* 233 (2004) 163-172.
- [39] Taniguchi N., Genetic factors in broodstock management for seed production, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13 (2003) 177-185.

- [40] Taris N., Baron S., Sharbel T.F., Sauvage C., Boudry P., A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), *Aquac. Res.* 36 (2005) 1-3.
- [41] Thorson G., Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates, *Biol. Rev.* 25 (1950) 1-45.
- [42] Vandeputte M., Launey S., Quelle gestion génétique de la domestication chez les poissons? *INRA Productions Animales* 17 (2004) 237-242.
- [43] Weir B.S., Cockerham C.C., Estimating F-statistics for analysis of population structure, *Evolution* 38 (1984) 1358-1370.
- [44] Widdows J., Physiological ecology of mussel larvae, *Aquaculture* 94 (1991) 147-163.
- [45] Yamtich J., Voigt M.-L., Li G., Hedgecock D., Eight microsatellite loci for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Anim. Genet.* 36 (2005) 524-526.

**UNIVERSITE DE LA ROCHELLE
U.F.R DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE
ECOLE DOCTORALE ED 0374**

THESE DOCTORAT

BIOLOGIE

Nicolas Taris

**CONSEQUENCES GENETIQUES DE LA PRODUCTION INTENSIVE DE
LARVES D'HUITRES EN ECLOSERIE :
ETUDE DES PROCESSUS DE DERIVE ET DE SELECTION LIES AUX
PRATIQUES D'ELEVAGE.**

Thèse dirigée par Philippe Gouletquer

Soutenue le 22 décembre 2005

Membres du Jury :

M. Philippe Gouletquer	Cadre de recherche, IFREMER	Directeur de thèse
Mme Béatrice Chatain	Cadre de recherche, IFREMER	Rapporteur
M. Christophe Herbinger	Assistant Professor, Dalhousie University (Canada)	Rapporteur
M. Gérard Blanchard	Professeur, Université La Rochelle	Examineur
M. Aboubakry Sarr	Professeur, Université Paris VI	Examineur
M. Nicolas Bierne	Chargé de recherche, CNRS	Membre invité
M. Pierre Boudry	Cadre de recherche, IFREMER	Responsable scientifique

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE : *Crassostrea gigas* : biologie et aquaculture, présentation générale de l'étude 1

I. Préambule : bref historique de l'ostréiculture en France : des gisements antiques au développement d'une industrie	3
II. Eléments de Biologie : <i>Crassostrea gigas</i>	5
1. Systématique	5
2. Cycle de vie	5
3. Anatomie de la larve	8
4. Anatomie de l'adulte	9
III. Elevage et production ostréicole	12
IV. Contexte de l'étude : la reproduction en écloserie.....	14
V. Notion de Sélection-Domestication (en phase larvaire).....	17
VI. Objectifs généraux	20
VII. Plan de la thèse	20

CHAPITRE 1 : Approche « famille en mélange » : protocole expérimental : mise au point d'un jeu de trois marqueurs microsatellites22

I. Elevage larvaire « en commun » : détermination rétrospective de parenté	24
1. Principe	24
2. Les microsatellites	25
2.1 Présentation	25
2.2 Rôle	26
2.3 Modèles de mutation	27
2.4 Application et problèmes potentiels associés.....	28
3. Mise au point du protocole expérimental : génotypage et assignation de parenté	29
3.1 Extraction	29
3.2 Multiplexage PCR	30
3.3 La catégorisation des groupes d'allèles ou « Binning »	32
3.4 Méthodes d'assignation de parenté.....	32
3.5 Détermination du pouvoir résolutif	35
II. Autre application possible du jeu de marqueurs : estimation de la variabilité génétique des stocks en écloserie commerciale	37
1. Introduction	37
2. Analyse	37
3. Résultats	40

3.1 Diversité allélique	40
3.2 Hétérozygotie	40
3.3 Taille efficace de la population	40
4. Discussion	40
Bilan-synthèse	43

CHAPITRE 2 : Effets sélectifs du tamisage : Conséquences phénotypiques et génétiques de la sélection sur la taille au stade larvaire44

I. Introduction.....	46
II. Matériel et Méthodes	48
1. Choix des géniteurs	48
2. Croisement	50
3. Elevage larvaire.....	50
4. Analyse de parenté	52
5. Analyse des données	54
5.1 Procédure statistique générale : modèles mixtes	54
5.2 Inférences statistiques pour les analyses phénotypiques....	54
5.2.1 Taux d'éclosion	54
5.2.2 Analyses de covariance	55
5.2.3 Analyses de variance	55
5.3 Inférences statistiques pour analyses génotypiques	56
5.4 Taille efficace de population.....	56
III. Résultats	57
1. Développement larvaire	57
1.1 Taux d'éclosion.....	57
1.2 Caractères larvaires	57
2. Contributions parentales : diversité génétique des cohortes de fixation	61
3. Taille efficace de population	67
IV. Discussion	68
1. Assignment de parenté	68
2. Conséquences du tamisage sélectif	69
2.1 Aspects phénotypiques	69
2.2 Aspects génétiques	71
Bilan-synthèse	73

CHAPITRE 3 : Effets de la température sur le développement précoce : polymorphisme phénotypique et génétique74

I. Introduction	76
II. Matériel et méthodes	78
1. Reproduction	78
1.1 Choix des géniteurs	78

1.2 Obtention des gamètes	78
1.3 Fécondation	78
2. Elevage larvaire	79
3. Mesures individuelles des larves et de juvéniles.....	82
4. Analyse de données	82
4.1 Inférences statistiques pour analyses phénotypiques	82
4.1.1 Taux d'éclosion.....	82
4.1.2 Taille des larves et taille de population	83
4.2 Inférences statistiques pour analyses génotypiques	83
4.2.1 Larves	84
4.2.2 Juvéniles.....	85
4.2.3 Larves/Juvéniles	85
III. Résultats	86
1. Données phénotypiques	86
1.1 Taux d'éclosion	86
1.2 Caractères larvaires	87
1.2.1 Croissance larvaire	87
1.2.2 Taille de population et taux de fixation	88
2. Données génétiques individuelles	89
2.1 Génotypage et assignation	89
2.2 Points d'échantillonnage en phase larvaire	91
2.2.1 Données de contribution	91
2.2.2 Données de croissance	93
2.3 Points d'échantillonnage du naissain 80 jours après fécondation	95
2.4 Comparaison larves/juvéniles	95
IV. Discussion	98
1. Déroulement de l'élevage larvaire.....	98
2. Typage et assignation.....	99
3. Données génotypiques en phase larvaire.....	99
4. Données génotypiques pour les juvéniles	101
Bilan-synthèse	103

CHAPITRE 4 : Mise en évidence d'une réponse à une sélection précoce ?104

I. Introduction	106
II. Matériel et méthodes	108
1. Choix des géniteurs	108
2. Croisement	108
3. Elevage larvaire	108
4. Analyses de diversité génétique	109
5. Analyse d'apparentement.....	109
6. Procédures d'analyse des données	111

III. Résultats	115
1. Analyse génétique des populations parentales	115
1.1 Diversité génotypique	115
1.2 Coefficients de parenté	115
2. Croissance et survie larvaire	117
2.1 Evolution temporelle des distributions de taille.....	117
2.2 Coefficient de variation de la taille des larves.....	117
2.3 Survie	120
2.4 Taux de fixation	121
IV. Discussion	122
Bilan-synthèse	126
<u>CONCLUSION - SYNTHESE</u>	128
Synthèse	130
I. Pertinence de l'approche « famille en mélange »	131
II. Conséquences pratiques des pressions de sélection en phase larvaire.....	132
Perspective	134
Références bibliographiques	136

INTRODUCTION GENERALE

Crassostrea gigas

BIOLOGIE ET AQUACULTURE

PRESENTATION GENERALE DE L'ETUDE

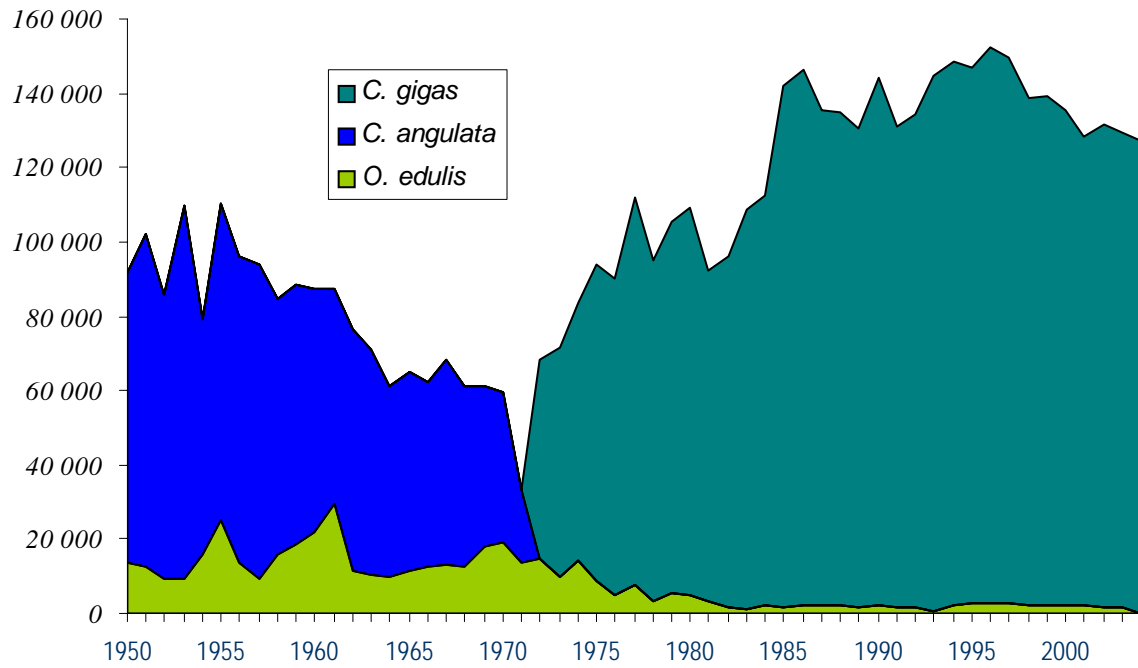


Figure 1 : Evolution de la production ostréicole en France de 1950 à 2004 : tonnage par espèce (source Fishstat, FAO, 2004).

I. Préambule : Bref historique de l'ostréiculture en France : des gisements antiques au développement d'une industrie (d'après Héral, 1990)

Les premières consommations d'huîtres provenant de gisements naturels remontent au moins à l'époque romaine. Il s'agissait alors de l'huître plate (*Ostrea edulis*), espèce indigène en France métropolitaine. C'est à partir du XVII^{ème} siècle que la culture de ce bivalve se développe, d'abord dans les réservoirs des marais salants de la côte atlantique puis dans des bassins spécialement aménagés. Il existait déjà des techniques d'élevage selon lesquelles les huîtres étaient collectées à partir de bancs naturels puis élevées quatre à cinq ans en bassin avant commercialisation.

Au XVIII^{ème} siècle, les bancs naturels sont surexploités entraînant l'apparition des premiers arrêtés d'interdiction de dragage et de cueillette. Au XIX^{ème}, une réglementation d'exploitation se met en place, en parallèle d'une amélioration des techniques de captage (opération consistant à collecter le naissain (larves fixées)). L'ostréiculture moderne naît à cette époque. A partir de 1860, faisant face à une pénurie d'huître plate, est importée dans le bassin d'Arcachon l'huître creuse portugaise provenant de l'embouchure du Tage (*Crassostrea angulata*). En 1865, au cours d'un de ces transports, le bateau 'le Morlaisien' se réfugie après une tempête dans l'estuaire de la Gironde où il rejette sa cargaison d'huîtres portugaises. L'espèce s'implante dès lors colonisant le littoral français des côtes de Vendée au bassin d'Arcachon. L'ostréiculture se développe intensivement jusqu'en 1960 (85 000 tonnes de *C. angulata*, 28 000 de *O. edulis*). Entre 1969 et 1973, la production de *C. angulata* connaît un important déclin suite à la généralisation d'une infection virale ('maladie de la branchie') engendrée par un agent pathogène de type iridovirus (Comps et al., 1976). En parallèle, la production de l'huître plate décroît du fait de deux attaques parasitaires successives : *Marteilia refringens* et *Bonamia ostrea*. L'introduction de l'huître du pacifique *Crassostrea gigas* (à partir de 1966 ; Grizel et Héral, 1991) permet alors de redémarrer la production ostréicole. Aujourd'hui, près de 98% de la production est constituée par la culture de *C. gigas* (figure 1).

Si cette espèce est dominante en France, à l'échelle mondiale, *C. gigas* est aussi produite dans 27 pays et reste le mollusque le plus cultivé avec une production de 4,4 millions de tonnes en 2004. La France est le quatrième producteur mondial avec 130 000 tonnes, derrière la Chine, le Japon et la République de Corée (respectivement 3 668 000, 260 000 et 238 000 tonnes, FAO données de 2004).

Initialement issue de captage naturel, la production passe désormais également par des méthodes d'élevage en milieu contrôlé. Cet élevage comme alternative au captage naturel est en constante progression, notamment en France où cinq « écloseries » sont implantées et assurent une production de naissain basée sur une maîtrise du cycle de reproduction complet. En tant que produit aquacole d'échelle nationale et internationale, la maîtrise des méthodes de reproduction de *C. gigas* est devenue un enjeu important, d'un point de vue économique, mais aussi scientifique.

Avant d'aborder plus précisément les questions et objectifs qui ont permis de développer ce projet de thèse sur les conséquences génétiques de la production intensive de larves d'huîtres en écloserie, une présentation de l'espèce dans sa composante biologique est un préalable indispensable.

II. Eléments de biologie : *Crassostrea gigas*

1. Systématique

Selon les critères taxonomiques de Grassé (1960), *Crassostrea gigas* appartient à l'embranchement des Mollusques, classe des Bivalves (ou Lamellibranches), ordre des *Filibranchia*, sous-ordre des *Anisomyaria*, super-famille des *Ostreioidea*, famille des *Ostreidae*, genre *Crassostrea* et espèce *gigas*.

Il est à noter que la taxonomie chez les huîtres est parfois ambiguë. La grande plasticité morphologique des coquilles peut facilement porter à confusion et la plupart du temps, les caractères de la coquille sont utilisés pour l'identification. Ranson (1948) est malgré tout parvenu à distinguer dans la famille des *Ostreidae* trois genres (*Crassostrea*, *Ostrea* et *Pycnodonta* d'après les caractéristiques de la prodissoconque (coquille larvaire). Harry (1985), toujours selon des critères morphologiques, ajoute trois sous-familles à la famille des *Ostreioidea*, à savoir *Lophinae*, *Ostreinae*, et *Crassostreinae* à laquelle le genre *Crassostrea* appartient.

Au sein même du genre *Crassostrea*, représenté sur presque toutes les côtes bordant les mers tempérées du globe (Asie : *C. gigas*, *C. ariakensis*, *C. sikamea* ; Afrique : *C. gasar* ; Amérique : *C. virginica*, *C. rhizophorea*), la validité de la notion d'espèce est complexe et parfois mal élucidée (Gaffney & Allen, 1993). Une des ambiguïtés la plus étudiée concerne les espèces *gigas* et *angulata*. Différentes études, morphologiques (Ranson, 1960 ; Menzel, 1974), expériences d'hybridation (Huvet et al., 2001 ; Huvet et al., 2002), analyse caryotypique (Leitão et al., 1999), marqueurs allozymiques (Buroker et al., 1979 ; Mattiucci & Villani, 1983) et ADN satellite (Lopez-Flores et al., 2004) considèrent les deux taxa comme une même espèce. Cependant, d'autres données différencient ces deux espèces (caractéristiques écophysologiques : Haure et al., 2003 ; analyse caryotypique : Leitão et al., 2004) appuyées par des analyses d'ADN mitochondrial (Boudry et al., 1998 ; O'Foighil et al., 1998 ; Boudry et al., 2003a).

2. Cycle de vie (Figure 2)

C. gigas est une huître ovipare à forte fécondité (Deslous-Paoli & Héral, 1988). Espèce à hermaphroditisme successif asynchrone, les adultes peuvent changer de sexe au cours du temps, avec une tendance à la protandrie (premier cycle de reproduction en tant que mâle (Héral & Deslous-Paoli, 1990). Dans le milieu naturel, la gamétogénèse se déroule d'abord selon un rythme très lent (octobre à mars). A la fin de l'hiver, les lignées germinales se

développent de façon active pour arriver à maturité sexuelle au début de l'été (juillet). La gamétogenèse dépend cependant de nombreux facteurs, intrinsèques (état général de l'individu) ou externes (température et nutrition parmi les plus prépondérants) (Gérard et al., 1995 ; Gouletquer, 1997, Fabioux 2004). Arrivés à maturité, les géniteurs expulsent les gamètes dans le milieu (fécondation externe). Le nombre d'ovocytes par femelle peut atteindre cent millions d'oeufs (Walne, 1974).

Concernant le développement embryonnaire précoce, les divisions cellulaires sont rapides, aboutissant à la formation d'un embryon de type morula (16 cellules) après 2-3 heures. Vingt quatre heures après fécondation, la larve dite trochophore (endotrophe) devient larve « D » (début de l'exotrophie), appelée ainsi à cause de la forme de sa coquille. A ce stade, la larve possède une coquille (prodissoconche I) mesurant environ 70µm ainsi qu'un velum, organe de nutrition et de locomotion. La sécrétion de la prodissoconche II commence juste après le stade véligère « D ». A la fin de la vie planctonique, la coquille juvénile va changer d'aspect : la sécrétion de la prodissoconche constituée d'aragonite s'arrête pour celle de la dissoconque faite de calcite, précipité contenant plus de calcium minéral et moins de matières organiques (Pronnier, 1996). Un organe sensoriel apparaît également à cette période sur la coquille sous forme d'un point noir faisant de ces larves des larves dites « oeuillées ». Parallèlement, avec l'apparition du pied, la larve modifie son comportement à la recherche d'un substrat annonçant la fixation (stade pédivéligère). Les larves ont alors généralement une taille comprise entre 300 et 380µm. La métamorphose met fin à la vie planctonique de l'huître (disparition du pied et du velum). Cette transformation aboutit au stade juvénile définissant un mode de vie benthique qui persistera le reste de la vie de l'animal. La phase larvaire dure globalement de 15 à 30 jours, dépendant des conditions du milieu, notamment des conditions thermiques. A faible température (14°C), cette phase peut se prolonger jusqu'à 76 jours (observation personnelle). Le premier développement gonadique des huîtres a lieu au cours de la première année de vie des animaux.

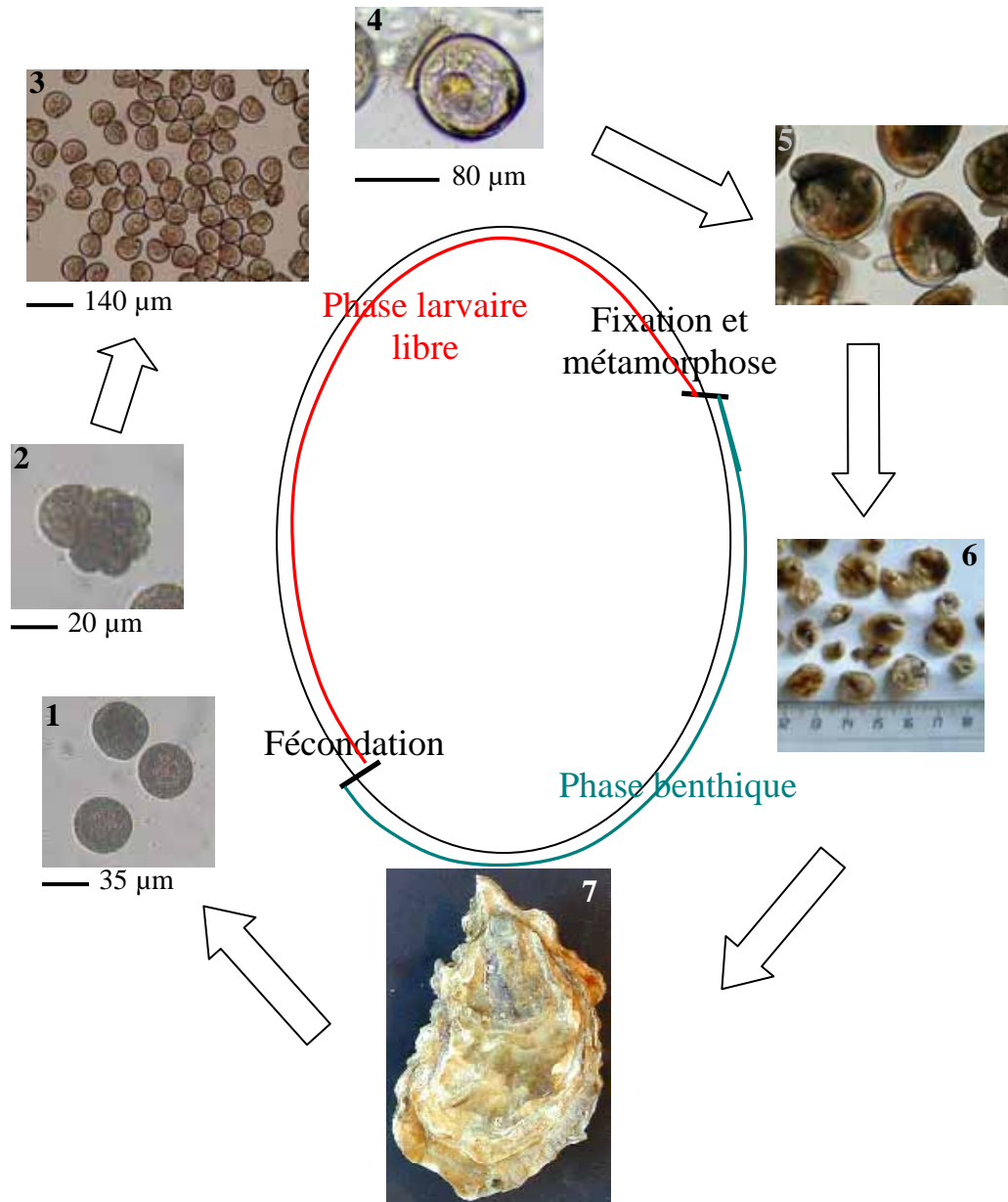


Figure 2 : Cycle de vie de l'huître creuse.

- 1 : Fécondation : ovocytes en présence de spermatozoïdes (points noirs ou réfringents)
- 2 : Embryon stade morula (2-3 heures)
- 3-4 : Larves D (24 heures)
- 5 : Larve pédivéligère (~20 jours)
- 6 : Naissains
- 7 : Adulte

3. Anatomie de la larve (d'après Pronnier, 1996)

Le développement larvaire distingue différents stades, depuis la larve trochophore jusqu'à la larve pédivéligère. Nous avons représenté le stade pédivéligère (précédant l'étape de métamorphose) (figure 3), pour lequel les organes larvaires sont développés et localisables. On distingue ainsi :

- le velum, présent dès 24 heures après fécondation, organe de nutrition et de locomotion. Il est surmonté d'une bande ciliaire qui dans sa fonction de nutrition permet l'acheminement de particules alimentaires vers la bouche. Concernant la locomotion, grâce au vélum, la larve décrit des hélices verticales en se déplaçant autour de son axe dorso-ventral. La nage peut être continue jusqu'à ce que la larve soit capable de rétracter son vélum en cas de stimuli.

- le manteau : la surface interne de chacune des deux valves est tapissée d'un épithélium qui se replie sur ses bords et forme deux feuillets.

- la musculature : elle apparaît pendant la sécrétion de la prodissoconque I. On distingue les muscles rétracteurs des muscles adducteurs (antérieurs et postérieurs). Les muscles rétracteurs, du vélum et du pied, sont striés. Les muscles adducteurs servant comme chez l'adulte à l'ouverture et la fermeture de la coquille, possèdent à la fois des parties lisses et striées,

- le tractus digestif, développé dès les premiers stades de la véligère est composé d'une bouche, située en face postérieure du vélum, qui donne sur un œsophage cilié cylindrique conduisant à l'estomac cilié lui aussi. Un stylet cristallin engainé est présent à l'extrémité postérieure de l'estomac.

- les organes des sens : les statocystes, organes servant à l'équilibration, créés par une invagination de l'épithélium du pied ; l'« œil », coupe sphérique d'épithélium pigmenté aperçu chez la larve pédivéligère sous la coquille translucide au centre de la valve ; le pied qui apparaît quelques jours avant la métamorphose, assurant la recherche de substrat sur lequel la larve va se fixer.

- enfin les branchies, qui apparaissent à la fin du développement larvaire et persistent après la métamorphose.

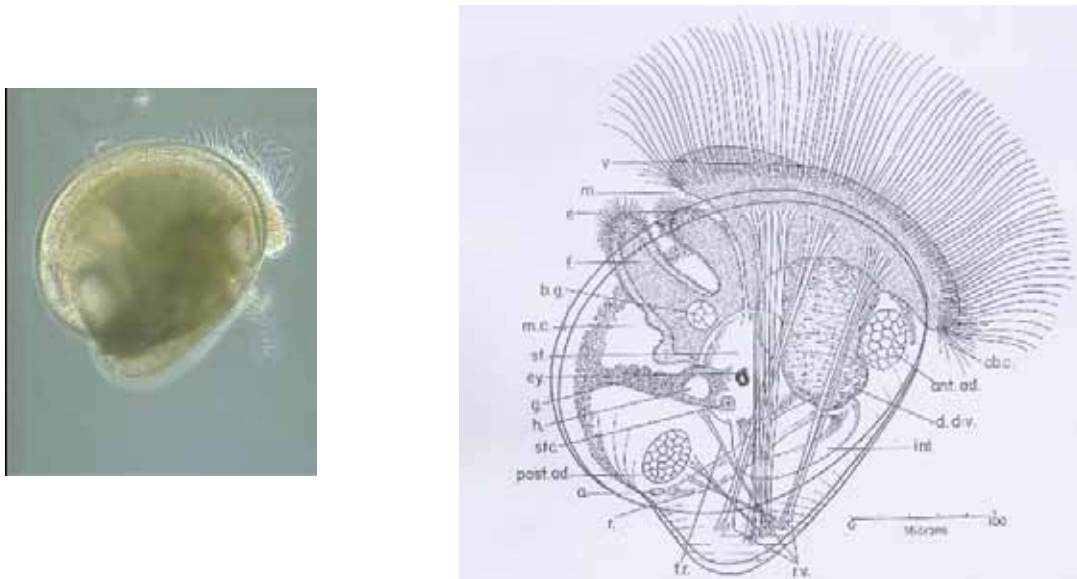


Figure 3 : Anatomie de larve pédivéligère (genre *Crassostrea*) (d'après Galtsoff, 1964).

a.-anus, **ab.c.**-bande ciliaire, **v.**-velum, **ant.ad.**-muscle adducteur antérieur, **b.g.**-glande byssale, **d.div.**-diverticule digestif, **e.**-œsophage, **ey.**-œil, **f.**-pied, **f.r.**-muscles rétracteurs du pied, **g.**-branchie rudimentaire, **h.**-cœur, **int.**-intestin, **m.**-bouche, **m.c.**-cavité palléale, **post.ad.**-muscle adducteur postérieur, **r.**-rectum, **r.v.**-muscles rétracteurs du velum, **st.**-estomac-, **stc.**-statocystes.

4. Anatomie de l'adulte

Coquille

Chez *Crassostrea gigas*, la coquille de l'adulte (dont la genèse est assurée par le manteau) est asymétrique. Les deux valves qui la composent sont différentes en taille et en forme. La valve supérieure est 'plate' (légèrement convexe), tandis que la valve inférieure est nettement creusée (Hughes, 2002). Selon une coupe allant de l'extérieur vers l'intérieur, la coquille est formée par trois parties distinctes :

- le périostracum : membrane organique mince et colorée.
- les couches prismatiques : prismes verticaux de carbonate de calcium (calcite) entourés par une matrice protéique de conchyoline.
- la nacre : structure feuilletée constituée de cristaux d'aragonite.

Structure interne (figure 4)

Le manteau, formation tégumentaire, enveloppe tous les organes. Il adhère étroitement au corps dans les régions dorsale et latéro-dorsale, puis se dilate à la base des branchies en deux

lobes. L'espace libre entre les lobes du manteau délimite la cavité palléale. Cette cavité contient l'anus, les orifices rénaux, génitaux et les branchies. *Crassostrea gigas* possède une paire de branchies (soudées au manteau à leur base) constituées de deux paires de rangées longitudinales de filaments. Elles constituent le principal organe de la respiration et servent également à la filtration et à la rétention des particules en suspension (Gerdes, 1983 ; Bougrier et al., 1995, 1998 ; Gouletquer et al., 1999). La bouche, encadrée par les palpes labiaux est proche de la charnière. Ces palpes labiaux permettent le tri des nutriments vers la bouche. L'anus se situe juste au-dessus du muscle adducteur. L'œsophage cilié donne sur l'estomac contenant un stylet cristallin. L'estomac se prolonge par l'intestin et le rectum qui longe le muscle adducteur et débouche sur l'anus. En période de reproduction, la gonade se développe largement autour de l'appareil digestif pour atteindre jusqu'à 70% de la masse de chair sèche (Gouletquer, 2005). A proximité du muscle adducteur se trouve le cœur qui est situé dans une cavité péricardique. Il est formé d'une oreillette et de deux ventricules, qui par des artères et des artéioles distribuent l'hémolymphe aux différentes parties du corps. L'appareil circulatoire est dit de type lacunaire ou semi-ouvert, en contact constant avec le milieu extérieur. Le système nerveux est formé de plusieurs paires de ganglions nerveux (cérébroïdes et viscéraux). Enfin, le muscle adducteur sert à l'ouverture et la fermeture de la coquille. Il est composé de deux parties, l'une translucide responsable des mouvements de fermeture rapide, l'autre blanche faisant office de contrepoids à la force du ligament empêchant de fait une trop grande ouverture des valves.

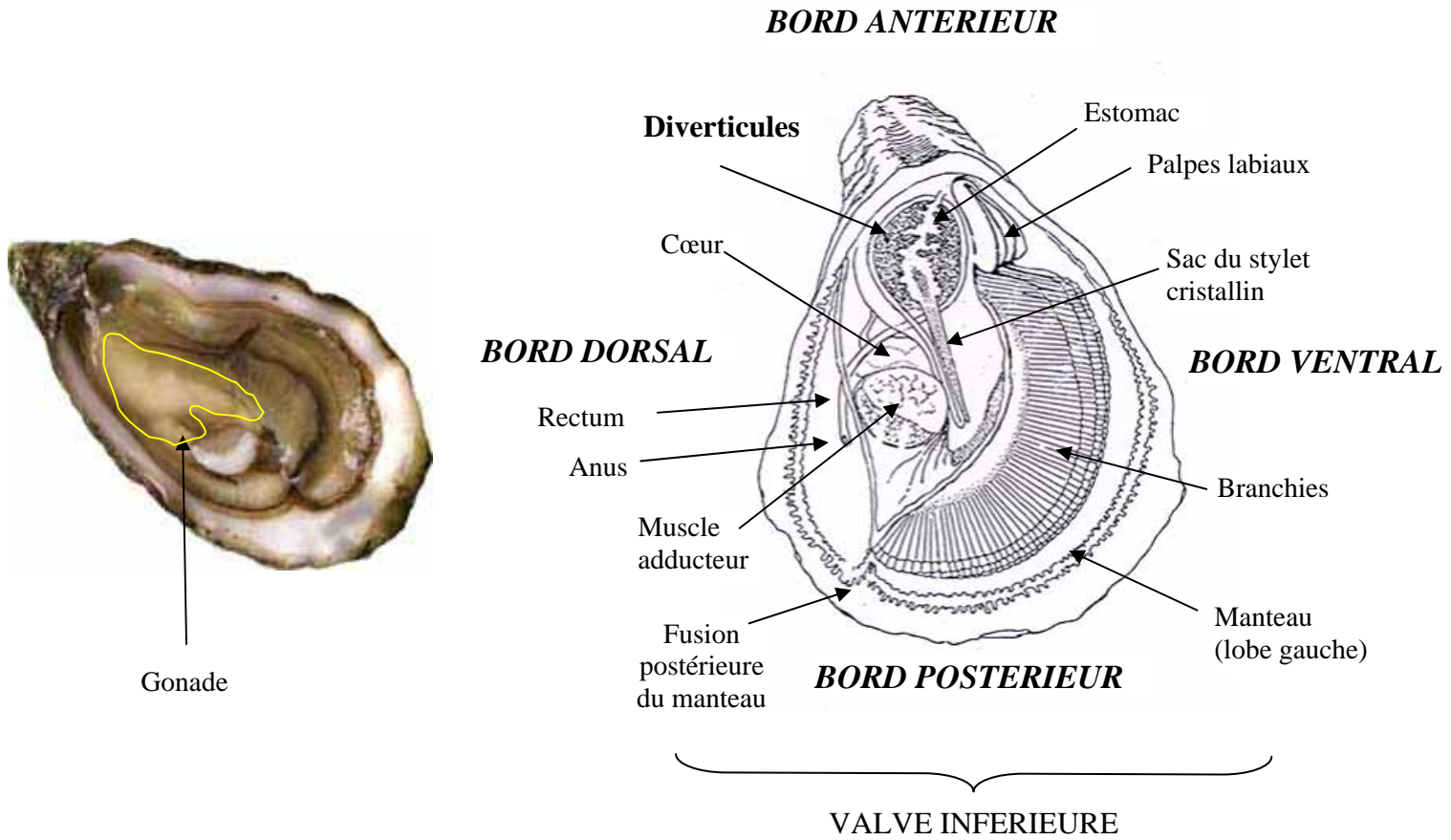


Figure 4 : Anatomie de l'huître adulte (d'après Galtsoff, 1964 ; Evseev & Yakovlev, 1996).

III. Elevage et production ostréicole

Comme nous l'avons évoqué en préambule, la production ostréicole française est principalement issue du captage naturel du naissain. L'activité ostréicole repose sur différents bassins de production, essentiellement localisés sur la façade atlantique, des côtes de Normandie à l'Aquitaine mais également en Méditerranée (étang de Thau). L'ensemble des bassins produit annuellement environ 130 000 tonnes (figure 5). Seuls deux secteurs (littoral charentais et bassin d'Arcachon) permettent un cycle de reproduction complet aboutissant à un recrutement régulier et abondant. Dans les autres bassins de production (Normandie, Bretagne, Vendée, Méditerranée), une gamétogenèse complète peut s'effectuer aboutissant à une ponte, et parfois seulement à un recrutement lorsque les conditions thermiques le permettent (Gouletquer, 1997). D'une manière générale, le développement de populations naturelles d'huîtres a tendance à progresser vers le nord. Un cycle d'élevage complet se déroule comme suit (Dégremont, 2003) : pendant la période de reproduction (maturité sexuelle en période estivale), les professionnels disposent sur les parcs ostréicoles des collecteurs (tuiles chaulées, tubes ou coupelles plastiques, coquilles d'huîtres...) afin de procéder au captage des larves. Six à 18 mois après la fixation, le naissain est détaché (séparé du substrat) puis mis en poche ostréicole pour être placé sur estran sur des tables surélevées. Le travail consiste ensuite à retourner les poches afin d'empêcher la prolifération d'algues, puis à changer la maille des poches et les dédoubler en fonction de la croissance des huîtres. Les huîtres atteignent une taille commerciale à partir de 40g. Selon les zones de production, les huîtres peuvent être placées en bassin d'affinage afin de correspondre à certains critères de qualité dont dépendent les appellations commerciales. Il existe d'autres pratiques culturelles consistant à « semer » les huîtres à plat ou à les disposer en eaux profondes.

En France, **l'essentiel de la production** s'appuie donc **sur le captage naturel** issu des bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon. Cependant, à l'heure actuelle, **la part du naissain d'écloserie** (établissement de reproduction et d'élevage contrôlés) **est en pleine expansion**. En 1998, environ 10% du naissain provenait d'écloserie (Robert & Gérard, 1999). Le marché du naissain d'écloserie pourrait représenter en 2004 (selon les professionnels) presque **50% de la production** totale (Le Roux, 2004), notamment à cause d'un intérêt croissant pour les huîtres triploïdes (Nell, 2002).



Figure 5 : Production française d’huître creuse dans les principaux sites d’élevage (données CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2004).

IV. Contexte de l'étude : la reproduction en éclosion

Depuis la première expérience rapportée par Brooks (1879) attestant d'une fécondation artificielle chez l'huître et jusqu'au développement des techniques modernes d'écloseries de production, la reproduction « artificielle » des bivalves se décline au travers de plus d'un siècle de travaux (Helm et al., 2004). Les années 1960 et 1970 sont plus particulièrement riches d'une littérature qui a incontestablement participé à l'évolution des techniques d'élevage de mollusques bivalves (Matthiessen & Toner, 1966 ; Walne, 1965 et 1974 ; Breese & Malouf, 1975 ; Dupuy et al., 1977 ; Jones & Jones, 1983). Parmi ces ouvrages, celui publié en 1963 par Loosanoff & Davis résumant dix années d'expériences sur près d'une vingtaine d'espèces prend une place particulière. Par la précision et la multiplication de ses recherches, ce dernier ouvrage est certainement à l'origine de la création de nombreuses écloseries, aussi bien expérimentales que commerciales (Lucas, 1981).

Aujourd'hui les écloseries assurent un développement contrôlé du naissain, depuis l'œuf jusqu'à la post-larve et ce suivant différents objectifs (Lucas, 1981) :

- tout d'abord afin de pallier d'éventuelles insuffisances de captage naturel, problème récurrent et extrêmement variable d'une année sur l'autre pour les espèces à forts enjeux économiques (en France pour *C. gigas*),
- pour développer la culture d'espèces pour lesquelles le captage naturel est inexistant ou insuffisant (en Grande-Bretagne et aux Etats-Unis pour *C. gigas*),
- également pour mettre en place une production contrôlée appuyée par des programmes d'amélioration génétique (polyploïde, sélection).

La reproduction « artificielle » de bivalves est une activité relativement bien maîtrisée mais dont l'ensemble des procédés techniques reste néanmoins perfectible. Pour citer Helm et al. (2004) dans un manuel pratique dédié aux techniques de culture de bivalves : « l'élevage en éclosion relève plus d'un art s'appuyant sur la science que de science en elle-même ».

En termes pratiques, les écloseries utilisent des techniques qui reposent sur des connaissances essentiellement empiriques pour produire des larves en masse, dans des conditions nettement différentes de celles du milieu naturel (His & Seaman, 1992 ; Laing &

Earl, 1998). Par définition, le milieu naturel est caractérisé par des environnements biotiques et abiotiques inconstants. La température et plus spécialement la disponibilité en nourriture semblent être les paramètres ayant une influence prépondérante sur la croissance des larves. La salinité peut également entrer en ligne de compte, notamment en synergie avec la température (His et al., 1989). Cependant, comme suggéré par Carlson (1982), Neudecker (1985), Nell et Holliday (1988) ou par Auby et Maurer (2004) en milieu naturel, la salinité (entre 15 et 39‰) n'influence pas la survie et peu la croissance des larves. La production des huîtres en éclosion suppose généralement des conditions de température élevées ($\geq 25^{\circ}\text{C}$) associées à une qualité et une disponibilité en nourriture présumées optimales. De telles conditions peuvent induire une possible levée de pression de sélections, sélections différentes de celles du milieu naturel. Depuis les travaux de Hedgecock & Sly (1990), Hedgecock et al. (1992) pour *C. gigas* et Gaffney et al. (1992) pour *C. virginica*, qui ont mis en évidence des tailles efficaces de population d'éclosion restreintes (valeurs de N_e (voir par ailleurs p.42) majoritairement inférieures à 50), relativement peu d'intérêt a été porté à la diversité génétique des productions d'éclosion. Cette diversité est un facteur important, notamment pour ce qui concerne l'interaction entre populations naturelles et huîtres issues d'éclosion ainsi que pour une bonne gestion des stocks de géniteurs.

Il est également intéressant de constater que les larves et le naissain d'huître creuse présentent une grande variabilité phénotypique, notamment en terme de vitesse de croissance, réussite à la métamorphose et taux de survie. Il a été montré par exemple que dans un lot de larves élevées dans les mêmes conditions thermiques (23°C) et trophiques, les plus précoces se fixent entre 17 et 29 jours après fécondation (Collet et al., 1999). En 1981(a), Newkirk insistait déjà sur la variabilité des taux de croissance d'huîtres juvéniles alors même que les conditions environnementales d'expérience étaient identiques. Cette variabilité est augmentée par une grande plasticité des caractères (croissance et survie larvaire : Abdel-Hamid et al., 1992 ; Lemos et al., 1994 ; morphologie : Strathmann et al., 1993 ; croissance, survie et effort reproducteur des adultes : Ernande, 2001) en fonction des conditions environnementales. Face à cette grande variabilité, éclosoirs, nurseurs et ostréiculteurs ont recouru au tri par tamisage pour homogénéiser leur production avec élimination des « queues de lots », sélectionnant ainsi les individus à croissance plus rapide mais introduisant ainsi un biais dans la variabilité d'origine naturelle (Laing & Earl 1998).

Globalement, le naissain commercialisé, qu'il soit issu de captage naturel ou d'éclosion, ne répond pas toujours aux demandes des producteurs. En cause notamment, les phénomènes

de mortalité qui sont fréquemment observés (Jones & Jones, 1983, Haws et al., 1993 ; Robert & Gérard, 1999). Ces mortalités ont un impact sur la diversité génétique du naissain (Hedgecock et al., 1992 ; Boudry et al., 2002). En effet, elles font que le succès reproducteur est extrêmement variable entre individus d'une même population ou d'un stock d'huîtres, à la fois en conditions naturelles (Hedgecock, 1994 ; Li & Hedgecock, 1998) et en écloserie (Lannan, 1980 ; Hedgecock & Sly, 1990 ; Hedgecock et al., 1992), ce qui diminue fortement la variabilité génétique du naissain (Boudry et al., 2002). En revanche, la très forte fécondité des huîtres (25-50 millions d'ovocytes/ femelle /an) et la grande taille des populations permettent le maintien d'un polymorphisme génétique, d'autant plus que les conditions environnementales sont variables. Enfin les corrélations génétiques entre des caractères liés à la valeur sélective (« fitness »), comme la survie et l'effort de reproduction au stade adulte, sont influencés par l'environnement (Ernande, 2001), ce qui entraînerait également le maintien de polymorphisme génétique pour ces caractères (Rose, 1982 ; Barton & Turelli, 1989).

D'une manière générale, les études génétiques appliquées aux huîtres (et aux bivalves au sens large) s'intéressent le plus souvent aux stades juvéniles et adultes. Le stade larvaire représente une étape clef dans la vie d'une huître. Les nombreux travaux théoriques sur l'écologie larvaire des invertébrés marins sont la preuve de l'intérêt suscité par ce stade de développement, notamment en terme de trait d'histoire de vie (Thorson, 1950 ; Strathmann, 1980, 1985 ; Strathmann et al., 1993 ; Hines, 1986 ; Jablonski, 1986 ; Rumrill, 1990 ; Giangrande et al., 1994 ; Pechenik, 1999). De nombreuses lacunes subsistent par ailleurs en terme génétique (diversité) mais aussi zootechnique. Compte tenu des conditions d'élevage appliquées en écloserie, la question d'un phénomène de sélection-domestication dès les stades précoces de développement peut naturellement se poser. Le sujet exprime un intérêt particulier si l'on imagine dès lors possible une sélection précoce ayant des effets sur la qualité ultérieure du naissain en terme de survie, de croissance et d'effort reproducteur et ce, pour une espèce d'une importance économique reconnue comme *C. gigas*.

Cette notion de sélection-domestication que l'on rencontre plus fréquemment en aquaculture chez les poissons (Campton, 1995 ; Waples, 1999 ; Lutz, 2000 ; Vandeputte & Prunet, 2002, Vandeputte & Launey, 2004 ; Glover et al., 2001, 2004) reste peu étudiée chez les bivalves.

V. Notion de Sélection-Domestication (en phase larvaire)

Historiquement, ce que Darwin appelle la sélection «artificielle» et sur laquelle il s'est largement appuyé pour élaborer ses théories évolutionnistes (Richards, 1998), remonte à plus de 9000 ans (Simm et al., 1996). La notion de sélection artificielle remonte en effet aux premiers agriculteurs-éleveurs. Très tôt, ces derniers se sont aperçus qu'ils pouvaient choisir les caractéristiques de leurs plantes et de leurs animaux en sélectionnant et supervisant la production. L'homme a donc appris en exerçant une pression de sélection spécifique à utiliser les « mécaniques » de la génétique. Le phénomène se retrouve aujourd'hui également dans la littérature sous le nom de domestication ou sélection-domestication (pour les végétaux, on nomme « syndrome de domestication » le résultat du processus de domestication). La domestication définie selon Doyle (1983) est caractérisée par des changements génétiques affectant comportement, morphologie et physiologie sous la contrainte d'une culture en condition artificielle. Dans une optique de biologie de la conservation appliquée au domaine aquacole, Busack & Currens (1995) voient le phénomène de domestication comme des changements en quantité, variété ou combinaison d'allèles à l'intérieur d'une population résultant là aussi de sélection dans un environnement artificiel. Précisant leur définition, ces auteurs reconnaissent différentes formes de domestication :

- intentionnelle
- non intentionnelle
- et un troisième type défini comme biais d'échantillonnage durant certaines étapes de culture, donc à rapprocher d'une domestication non-intentionnelle.

Si la première est classiquement le résultat d'un effort délibéré, la seconde (voire la troisième) prend une valeur toute particulière puisqu'il s'agit dans ce cas de domestication inconsciente, simplement dictée par certains impératifs de production. Dans le cas des bivalves, la notion de domestication est rarement évoquée (au moins dans sa conception zoologique formulée par Denis, 2004), si ce n'est peut-être en situation de domestication non intentionnelle (Hedgecock, 1988). La cause en revient alors aux conditions environnementales sélectives appliquées ainsi qu'aux pratiques de tamisage, principalement durant la phase larvaire. La phase larvaire reste en cela très mal connue.

Les effets de différents facteurs sur le développement larvaire sont parfois appréhendés mais sans jamais envisager cette notion de domestication. L'amélioration des techniques

d'élevage depuis Loosanoff (1963) a en effet permis l'étude des effets environnementaux sur la croissance et la survie larvaire chez différentes espèces de bivalves. Ces études ont été conduites pour la plupart en laboratoire en testant les effets de température, salinité et nutrition indépendamment les uns des autres. Les effets combinés de ces paramètres ont plus récemment été envisagés, rendant ainsi possible une meilleure compréhension des interactions existantes entre l'environnement et l'organisme. Des articles sont ainsi consacrés aux larves de bivalves (pour revue voir, Robert et al., 1988 ; Lemos et al., 1994 ; Abdel-Hamid et al., 1992 ; Devakie & Ali, 2000). Concernant plus spécifiquement *Crassostrea gigas*, différents travaux de recherche (Calabrese & Davis, 1970 ; Millican & Helm, 1973 ; Helm & Millican, 1977 ; Nell & Holliday, 1988 ; His et al., 1989 ; Abdel-Hamid et al., 1992) se sont attachés à définir les conditions optimales de développement. La plupart soulignent l'importance des facteurs nourriture et température mais révèlent également un manque de données sur ces approches écologiques. Il est également important de constater que dans la plupart des cas, seul le caractère croissance est étudié, le caractère survie étant plus rarement abordé.

Si l'on s'intéresse enfin de plus près aux études portant sur les aspects génétiques des caractères larvaires, différents travaux ont vu jour, principalement dans une optique agronomique. En effet, aspect génétique sous-entend souvent génétique quantitative, aboutissant en d'autres termes à définir des valeurs d'héritabilité. Au sens large, l'héritabilité (H^2) est la part de variance phénotypique qui est d'origine génétique.

Différents articles ont reporté des estimations d'héritabilité pour des caractères de production associés au stade larvaire chez le genre *Crassostrea*. Ces articles sont référencés dans le tableau 1.

Il faut ajouter à ces travaux ceux de Losee (1979) ainsi que Haley & Newkirk (1978) concernant *Crassostrea virginica*, lesquels ont mis en évidence l'existence de relation significative entre caractères larvaire et juvénile. Collet et al. (1999) aboutissent à une même conclusion pour *C. gigas*. Plus récemment, Ernande et al. (2003) ont montré qu'il existait une composante génétique aux variations de survie et de croissance larvaire, et des corrélations génétiques négatives entre taux de développement larvaire et succès à la métamorphose, permettant la coexistence de différentes stratégies de développement précoce. Mais encore une fois, l'influence des conditions environnementales sur ce polymorphisme reste à étudier.

Tableau 1 : Héritabilité estimée pour des caractères liés à la phase larvaire chez le genre *Crassostrea* (d'après Dégremont, 2003) (FS : plein-frères ; HS : demi-frères ; N : héritabilité au sens strict ; B : héritabilité au sens large).

Espèces	Caractère	Héritabilité	Référence
<i>Crassostrea gigas</i>	Survie larvaire	0,31± 0,06	Lannan, 1972
	Succès à la fixation	0,09 ± 0,08	
<i>Crassostrea gigas</i>	Croissance larvaire	0,24± 0,57 ^N ; 0,91 ± 0,65 ^B	Ernande et al., 2003
	Survie larvaire	0,55 ± 0,40 ^N ; 0,81± 0,29 ^B	
	Taux de métamorphose	0,10 ± 0,17 ^N ; 0,31± 0,14 ^B	
	Taille à la fixation	0,41 ± 0,29 ^N ; 0,41 ± 0,16 ^B	
<i>Crassostrea gigas</i>	Croissance larvaire	0,14± 0,21 ^N - 0,18 ± 0,27 ^N	Dégremont, 2003
	Survie larvaire	0,07 ^N - 0,64 ^N	
<i>Crassostrea virginica</i>	Croissance larvaire à 6 jours	0-0,24 ^{HS} ; 0,10-0,46 ^{FS}	Haley et al., 1975
	Croissance larvaire à 16 jours	0,08 ^{HS} ; 0,13-0,25 ^{FS}	
<i>Crassostrea virginica</i>	Croissance larvaire	0,24 ^{HS}	Longwell, 1976
<i>Crassostrea virginica</i>	Croissance larvaire à 6 jours	0,09-0,51 ^{FS} ; 0,26-0,39 ^{HS}	Newkirk et al., 1977
	Croissance larvaire à 16 jours	0,50 ^{HS} ; 0,60 ^{FS}	
<i>Crassostrea virginica</i>	Croissance larvaire à 7 jours	0,07 ± 0,09 ; 0,90 ± 0,59 ^{HS}	Losee, 1978
	Croissance larvaire à 14 jours	0,27 ± 0,29 ; 0,62 ± 0,46 ^{HS}	
	Croissance larvaire à 21 jours	0,30 ± 0,31 ; 0,85 ± 0,56 ^{HS}	
	Longueur coquille larvaire	0,14 ± 0,07 ; 0,44 ± 0,14 ^N	

Enfin, citons les travaux qui se sont attachés à mettre en évidence l'existence d'un fardeau génétique révélé dès la phase larvaire chez les huîtres *Ostrea edulis* (Bierne et al., 1998) et *Crassostrea gigas* (Launey et al., 2001). Dans ce dernier, hétérosis et distorsion de ségrégation sont dus à la liaison entre marqueurs (neutres) et allèles récessifs délétères à proximité des loci. L'hétérosis (se dit pour un hybride lorsque la valeur moyenne pour ce caractère est supérieure à celle la plus élevée des parents) chez *C. gigas* est ici montré comme conséquence de cette liaison et non intrinsèquement comme dû à une meilleure valeur sélective des individus hétérozygotes. De plus, la ségrégation non-mendélienne des marqueurs microsatellites employés serait due à la purge sélective des homozygotes délétères aux loci liés. L'existence d'un fardeau génétique revêt une importance toute particulière lorsque l'on considère l'étude d'une espèce où un phénomène de dérive génétique est potentiellement observable, pouvant ainsi mener à une dépression de consanguinité.

VI. Objectifs généraux

Malgré de nombreuses études concernant la physiologie ou à plus large échelle l'écologie des larves d'une espèce à intérêt économique comme *C. gigas*, il transparaît une relative méconnaissance des aspects génétiques. Lesquels aspects sont tout particulièrement importants dans un contexte où l'espèce est soumise, intentionnellement ou non, à des pressions de sélection au cours des cycles de production.

Ce travail de thèse a donc pour objectif général de **mieux comprendre l'impact des conditions de reproduction en éclosérie sur le stade larvaire et de déterminer ainsi l'existence des processus évolutifs (en terme de dérive génétique et de sélection) liés à la reproduction artificielle**. Partant du fait qu'il existe une variabilité génétique en phase larvaire, il s'agit d'étudier d'une part l'évolution de la diversité génétique et d'autre part la réponse de cette variabilité face à un environnement particulier afin ainsi de savoir si certains caractères larvaires sont sélectionnés de façon non intentionnelle. Cela passe entre autre par l'étude des conséquences de pressions de sélection sur la variance phénotypique, sachant qu'un même génotype peut répondre différemment en fonction de l'environnement auquel il est confronté (interaction Génotype x Environnement). Enfin, la connaissance des corrélations phénotypiques et génétiques entre caractères aux stades précoces et plus tardifs est souhaitable pour examiner les conséquences de la sélection chez *C. gigas* (la sélection pour un caractère à un stade donné pouvant entraîner des réponses corrélées pour d'autres caractères).

VII. Plan de la thèse

Afin d'apporter un éclairage sur les conséquences génétiques de la production intensive de larves d'huîtres en éclosérie, nous avons focalisé nos efforts sur deux aspects des pratiques de production en éclosérie, à savoir :

- **l'effet des tamisages sélectifs** (sélection sur le taux de développement larvaire).
- et **l'effet des conditions intensives** d'élevage (interaction génotype x environnement) au travers de la **température**, un des facteurs les plus prépondérants dans les processus de développement larvaire.

Les marquages individuels sont impossibles aux stades précoces. Par ailleurs, l'élevage de familles séparées nécessite un grand nombre de structures et peut induire un biais du fait de

l'hétérogénéité des conditions environnementales entre bacs. Pour chacun des deux aspects, nous avons donc utilisé une approche d'élevage dite de « famille en mélange ». Les descendants de croisement sont donc mélangés. L'assignation à un couple de parent (famille) se fait alors rétrospectivement par l'utilisation de marqueurs (microsatellites).

Le **premier chapitre** aborde la **mise au point d'un jeu de trois marqueurs microsatellites** révélés dans une même réaction PCR (multiplexage). Ce jeu de marqueurs est utilisé dans le cadre de l'approche de « **famille en mélange** », permettant d'assigner au mieux les larves à un couple de géniteurs. Cette procédure constitue une base moléculaire commune à l'ensemble des expériences décrites dans les chapitres suivants (chapitres 2 et 3). La puissance d'assignation du jeu de marqueurs est estimée. Outre l'assignation rétrospective, une autre utilisation du jeu est également décrite, cette fois-ci afin d'estimer la variabilité de stocks d'écloseries commerciales.

Le **deuxième chapitre** est consacré à l'**impact des pratiques de tamisage** d'un point de vue phénotypique et génotypique, au travers pour ce dernier, de **la diversité génétique d'une population larvaire** estimée en terme de taille efficace sur la base de la variance du succès reproducteur entre géniteurs (les résultats de ce chapitre font l'objet d'un article accepté dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*).

Le **troisième chapitre** traite quant à lui des **effets de la température**, là encore au travers de la **composition génétique d'une population larvaire** en comparant deux élevages simultanés, l'un à 26°C, l'autre à 20°C, simulant les conditions d'écloserie et de milieu naturel.

Enfin le **quatrième**, appuyé par les différents résultats précédemment obtenus aborde la question d'une possible mise en évidence d'une **réponse à la sélection précoce de larves à croissance rapide** (ce chapitre fait l'objet d'un article en préparation).

Les résultats permettront, d'une part, d'identifier les **processus précoces de domestication** (tamisage et pressions de sélection environnementales) chez *C. gigas*, mais également d'intégrer ces résultats dans les pratiques de production et de **gestion génétique** des géniteurs dans les écloseries d'huîtres. A la lumière de ces données, dans une synthèse finale, nous discuterons des voies de réflexion sur la pertinence de l'approche moléculaire employée et sur la gestion de la variabilité génétique au sein des populations d'écloserie.

CHAPITRE 1

APPROCHE « FAMILLE EN MELANGE »

PROTOCOLE EXPERIMENTAL :
MISE AU POINT D'UN JEU DE TROIS MARQUEURS
MICROSATELLITES

I. Elevage larvaire « en commun » : détermination rétrospective de parenté

1. Principe

Les espèces aquatiques sont souvent caractérisées par une forte fécondité et de fait, par la petite taille relative des premiers stades de développement. Ainsi chez l'huître creuse, les larves présentent des tailles comprises entre 70 et environ 380µm, depuis le stade « D » (24 h après fécondation) jusqu'au stade pédivéligère précédant la métamorphose. Suivre l'évolution des contributions parentales dans la descendance par marquage physique individuel des larves afin d'avoir accès à la composante génétique est par conséquent impossible.

Or étudier la diversité ou les bases génétiques de caractères d'intérêt requiert cet accès à l'information génétique contenue dans cette analyse de niveau d'apparentement entre individus.

Aujourd'hui encore, l'approche classique consiste à élever séparément la descendance issue de différents croisements. Autrement dit, à chaque descendance de famille correspond un bac d'élevage. Plus les croisements sont complexes et plus le nombre d'unités d'élevage doit être élevé, d'où une certaine limitation technique et financière. De surcroît, du fait de l'hétérogénéité des conditions environnementales entre structures, un biais (« effet bac ») peut masquer l'effet génétique (Doyle & Herbinger, 1994 ; Herbinger et al., 1995 ; Davis & Hetzel, 2000) ayant pour conséquence une sur-estimation des paramètres génétiques (Dupont-Nivet et al., 2002).

Une autre approche, dite de « famille en mélange » (pour répondre à l'expression anglaise « mixed-family »), permet de s'affranchir de ce biais (Herbinger et al., 1999). Après fécondations séparées, l'ensemble de la descendance des différents croisements est mélangé. L'accès à l'information de parenté se fait alors rétrospectivement, via l'utilisation de marqueurs hypervariables. Pour ces différentes raisons, nous avons utilisé cette méthode afin d'étudier au stade larvaire, l'évolution des caractères de croissance et survie dans un contexte de sélection-domestication. La méthode a déjà été de nombreuses fois mise à l'épreuve pour les espèces aquacoles (tableau 2). Les microsatellites sont les marqueurs préférentiellement utilisés pour l'assignation rétrospective. La plupart des études citées dans le tableau concernent des espèces de poisson. Pour les mollusques, les exemples sont plus rares. Les pourcentages d'assignation sont globalement élevés, se rapprochant du 100% selon le nombre de loci impliqués dans l'analyse. Lorsque les pourcentages sont moins élevés (ex. Jerry et al.,

2004), la présence d'allèles nuls ou plus fréquemment la mauvaise qualité de l'ADN relative à la méthode d'extraction est discutée.

Tableau 2 : Pourcentages d'assignation chez différentes espèces d'intérêt aquacole.

Espèces	Géniteurs (mâles x femelles)	Pourcentage d'assignation	Nb de Loci	Références bibliographiques
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	10x10	65	4	Herbinger et al., 1995
<i>Salmo salar</i>	12x12	80	4	O'Reilly et al., 1998
	12 familles	~100	4	Herbinger et al., 1999
<i>Dicentrarchus labrax</i>	3x3	96	2	Garcia de Leon et al., 1998
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	2 x 48	93	15	Fishback et al., 1999
<i>Pagrus major</i>	-	73	4	Perez Enriquez et al., 1999
<i>Salmo salar</i>	2 x 10	98	8	Norris et al., 2000
<i>Haliotis asinina</i>	(2x1; 2x2; 4x1)	15-100 selon le nombre de loci	5	Selvamani et al., 2001
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	-	92	14	Olsen et al., 2001
<i>Crassostrea gigas</i>	5 x 5	99.8	1	Boudry et al., 2002
<i>Paralichthys olivaceus</i>	6x12	100	4	Sekino et al., 2003a
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	13 x 14	98	5	Jackson et al., 2003
<i>Cyprinus carpio</i>	24 x 10	95,3	8	Vandeputte et al., 2004
<i>Penaeus japonicus</i>	150 x 30	47	6	Jerry et al., 2004
<i>Paralichthys olivaceus</i>	6x12	-	4	Sekino et al., 2005
<i>Homarus gammarus</i>	-	93.7	6	Jørstad et al., 2005

Afin de réaliser au mieux les analyses de parenté pour les larves, nous avons utilisé les microsatellites, marqueurs ADN hautement polymorphes dont une description est donnée ci-après.

Nous avons mis au point un jeu de trois marqueurs microsatellites utilisés en multiplex. Au préalable, nous avons optimisé les étapes d'extraction ADN sur larves et adultes.

2. Les microsatellites

2.1 Présentation

Les microsatellites sont aujourd'hui définis comme des séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétition est comprise entre 1 et 6 paires de bases (Tautz, 1989 ; Litt & Luty, 1989). Le terme microsatellite peut encore mener à quelques confusions de langage car il était utilisé historiquement pour définir les répétitions du motif dinucléotide CA(GT) (Litt & Luty, 1989). Communément on retrouve employé le terme de STRs (« Short Tandem Repeat ») ou SSRs (« Single Sequence Repeats »), tous deux synonymes de microsatellites.

Ils ont été trouvés dans la plupart des espèces eucaryotes et procaryotes étudiées (Field & Wills, 1996 ; Tóth et al., 2000). Leur répartition le long du génome reste aléatoire malgré une sous-représentation dans les régions télomériques et centromériques des chromosomes (Winterø et al., 1992). Cette caractéristique les différencie des minisatellites (l'ensemble minisatellites et microsatellites est nommé « Variable Number Tandem Repeat » ou VNTR). Ces derniers, correspondant à des segments d'ADN répétées en tandem d'au moins 20 paires de base, sont localisés de façon prédominante dans les régions subtélomériques (Royle et al., 1988).

Les loci microsatellites présentent un haut degré de polymorphisme dû à la variation du nombre de répétition du motif de base (Jarne & Lagoda, 1996 ; Zhu et al., 2000). Ce polymorphisme permet l'accès à une quantité importante d'informations basées sur les fréquences alléliques. C'est la PCR (« Polymerase Chain Reaction », Saiki et al., 1988) qui permet de les révéler "individuellement", fournissant ainsi des marqueurs spécifiques de locus, codominants et polymorphes. Si un microsatellite n'est pas spécifique d'un locus, les régions qui les encadrent (dites flanquantes), par contre, le sont. Une paire d'amorces spécifique de ces régions flanquantes amplifiera donc ce seul microsatellite, dont le polymorphisme sera révélé par électrophorèse puis visualisé sur différents supports possibles.

Les marqueurs microsatellites semblent posséder les caractéristiques attendues de bons marqueurs en génétique des populations, à savoir : transmission mendélienne, codominance, polymorphisme et neutralité.

En revanche, le développement et la caractérisation de ce type de marqueurs reste une étape assez longue et délicate puisque faisant intervenir des étapes de clonage et de séquençage (Queller et al., 1993).

2.2 Rôle

De façon globale, les microsatellites sont identifiés au travers du rôle de marqueur génétique qui leur est attribué. Le rôle fonctionnel de ces séquences est relativement moins connu. Il existe cependant de nombreuses études mentionnant leur présence dans les régions promotrices de séquences codantes ou même directement en relation avec des régions codantes (Kunzler et al., 1995 ; Kashi et al., 1997). Différents articles (voir Li et al., 2002, 2004) passent en revue ces études, apportant des preuves de leur implication dans la régulation de l'activité de certains gènes (des changements dans le nombre d'unité de répétition microsatellite pourraient causer une variation d'ordre quantitative dans les fonctions

protéiques et l'activité de gènes (Kashi & Soller, 1999), de leur utilité comme éléments de régulation des processus métaboliques de l'ADN ou de leur rôle dans l'organisation de la chromatine. Le débat pour savoir si les microsatellites jouent un rôle quelconque dans le développement des organismes, l'adaptation, la survie et l'évolution est aujourd'hui encore un sujet de discussion inexhaustible (Li et al., 2004).

2.3 Modèles de mutation

Il a rapidement été établi que les microsatellites étaient soumis à des taux de mutation très élevés expliquant leur grande variabilité. Afin de ne pas fausser l'interprétation des données populationnelles (ex. : homoplasie, apparition trompeuse d'"identité d'état" par suite de mutations parallèles, Jarne & Lagoda, 1996), de nombreux modèles mutationnels propres à ces marqueurs ont été proposés.

Les observations moléculaires suggèrent que les mécanismes de mutation se produisent essentiellement lors de crossing-over inégaux (Wolff et al., 1989) ou bien au cours de la réplication de l'ADN par phénomène de glissement de la polymérase suivi d'une absence de réparation (« Slipped Strand Mispairing » ou SSM, Levinson & Gutman, 1987). Les taux de mutation estimés par différentes méthodes (estimation directe par comptage des mutations de pedigrees connus, estimation indirecte à partir du nombre d'allèles conservés dans une population en équilibre mutation-dérive) fournissent des valeurs de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-2} (Weber & Wong, 1993 ; Amos et al., 1996 ; Jarne & Lagoda, 1996 ; Crawford & Cuthbertson, 1996). Concernant les modèles probabilistes de mutation, les théories restent discutées (Ellegren, 2004). Au modèle classique en nombre infini d'allèles (IAM, Kimura & Crow, 1964) basé sur l'idée que chaque mutation introduit un allèle entièrement nouveau, s'opposent généralement le modèle de type pas-à-pas (ou SMM « Stepwise Mutation Model » Kimura & Ohta, 1978, figure 6) et le modèle à deux phases (ou TPM « Two Phase Model » Di Rienzo et al., 1994). Le modèle SMM suppose que chaque mutation ajoute ou retranche une unité de répétition. Le modèle TPM incorpore le processus mutationnel du SMM, mais tient compte des mutations de plus d'une unité. Il existe un quatrième modèle (KAM pour « K Allele Model »), plus rarement évoqué, qui correspond à une extension du modèle en nombre infini d'allèle où K est le nombre d'état allélique possible, chaque allèle ayant la même probabilité de mutation (Estoup & Cornuet, 1999).

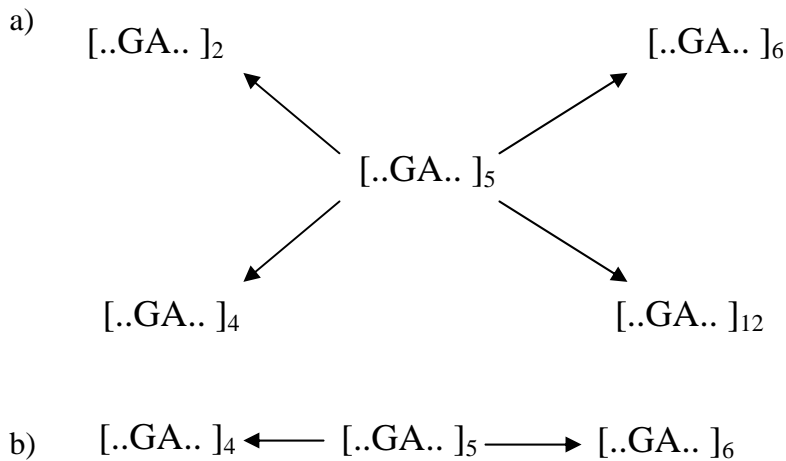


Figure 6 : Principaux modèles de mutation a) en nombre infini d'allèles (IAM) ; b) SMM « Stepwise Mutation Model » (d'après Lowe et al., 2004).

Des observations en faveur des modèles IAM ou SMM existent. Chez l'humain, les mutations microsatellites diffèrent de l'allèle parental d'une ou deux répétitions, ce qui semble aller dans le sens du modèle SMM (Weber & Wong, 1993). A contrario chez quelques espèces de poissons, les différences importantes en nombre de répétitions semblent supporter le modèle IAM (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

2.4 Application et problèmes potentiels associés

Dans le cadre d'études de structure des populations, les microsatellites s'avèrent aujourd'hui être un outil de choix. Hautement polymorphes, ils donnent accès aux analyses de parenté. De nombreuses études témoignent de leur utilisation dans le règne animal, depuis les populations humaines jusqu'aux poissons (salmonidés) en passant par les insectes sociaux (*cf* synthèse Launey, 1998). Quelques contraintes sont cependant liées à leur application, comme notamment la possible présence d'allèles "nuls" (non visualisés car non amplifiés en PCR) (Dakin & Avise, 2004). Ces derniers peuvent poser des problèmes dans l'identification de génotypes hétérozygotes et par conséquent fausser les estimations de taux d'hétérozygotie dans une population. L'existence de ces allèles nuls semble se justifier soit par des mutations dans les régions flanquantes (Callen et al., 1993), soit par des artefacts d'amplification dans le cas d'hétérozygote ayant des allèles de tailles très différentes. Une méthode, bien que relativement laborieuse pour éviter ce désagrément, consiste à redessiner les amorces.

Parfois, certains problèmes sont liés à la PCR elle-même. La Taq polymérase peut provoquer un glissement au cours de la PCR, ajoutant ainsi une répétition et faussant de fait la taille de l'allèle (Ginot et al., 1996 ; Gill et al., 1997).

L'homoplasie est également souvent évoquée pour les microsatellites. Elle désigne le fait que deux allèles sont identiques par état et non par descendance (comme vu précédemment). Les modèles SMM et TPM sont susceptibles de générer l'homoplasie de taille, laquelle peut mener à sous-estimer les divergences entre populations ou espèces (Taylor et al., 1999).

Hedrick (1999) a également montré que le calcul de *Fst* pour des microsatellites hautement polymorphes peut être sous-estimé. En effet, le *Fst*, qui détermine la proportion d'hétérozygotes entre sous-populations comparée à l'ensemble de la population, ne permet pas de spécifier l'identité des allèles impliqués.

3. Mise au point du protocole expérimental : géotypage et assignation de parenté

3.1. Extraction

Considérant la difficulté d'extraction de l'ADN pour des larves (petite taille et présence d'une coquille), nous avons mis au point un protocole simple et efficace pour maximiser l'analyse où l'objectif est de réaliser un échantillonnage à grande échelle. La procédure est basée sur la méthode décrite par Estoup et al. (1996), associant Chelex[®] et ébullition mais ici sans utilisation de la résine de Chelex. Elle est inspirée des méthodes employées par Huvet et al. (2001) et Bierne et al. (1998). Les larves préservées dans de l'éthanol 70 sont prélevées individuellement puis transférées avec 3µl d'éthanol dans un tube Eppendorf[®] 0,2 ml. Afin d'assurer une meilleure extraction, les larves sont écrasées à l'aide d'une pointe d'aiguille sous loupe binoculaire. L'éthanol restant est évaporé soit sous hôte aspirante, soit à l'aide d'une centrifugeuse à vide (15min à 35°C). Dans chaque tube contenant une larve, sont ajoutés 30µl du tampon de lyse (670-mM Tris HCl pH 8,8 ; 166-mM ammonium sulfate ; 0,1% de détergent Tween 20) associés à 5µl de protéinase K (1mg/µL). Les tubes sont ensuite mis à incuber 1 heure à 55°C puis 20 min à 100°C dans un thermo-cycleur susceptible de contenir des tubes de 0,2 ml. Les échantillons sont enfin transférés dans une micro plaque 96 puits en attendant la réaction PCR. La méthode d'extraction est également valable pour les adultes. Un très fin morceau de branchies (~1mm²) est prélevé par individu. Le volume de tampon de lyse est alors de 150µl. Les temps d'incubation sont les mêmes que précédemment.

3.2 Multiplexage PCR

L'amplification de marqueurs moléculaires en multiplexage permet un gain de temps et une réduction du coût importante (Neff et al., 2000). C'est dans cette optique de génotypage haut-débit (associé à la procédure d'extraction décrite) que l'amplification de marqueurs microsatellites nécessaires à l'estimation des contributions parentales a été réalisée.

Le multiplexage final auquel nous avons abouti intègre trois loci tirés de la littérature, connus pour leur degré de polymorphisme et leur facilité de génotypage. Plus d'une centaine de marqueurs microsatellites sont disponibles chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Magoulas et al., 1998 ; Huvet et al., 2000 ; Li et al., 2003 ; Sekino et al., 2003b; Hubert & Hedgecock, 2004; Yamtich et al., 2005). Notre choix s'est porté sur CG49, CG108 (Magoulas et al., 1998) et L10 (Huvet et al., 2000) ayant respectivement un nombre moyen d'allèles par locus de 41, 41 et 40 (Huvet et al., 2004). Les amorces spécifiques à ces loci, utilisées pour la PCR en multiplexage, sont récapitulées dans le tableau 3 suivant.

Tableau 3 : Description des amorces de PCR.

Locus	Séquence répétée	Amorces utilisées	Température appariement	Taille moyenne du produit de PCR
CG 49	(CA) ₃₅	CATCAGGGGTAAATTAAGTAAGC CCACAGACGATTTTCATATATCCTG	53°C	162 pb
CG 108	(CA) ₁₈	ATATGTAATGATTACGAAACT GTATGAGATTTGGTTCCACC	55°C	147 pb
L 10	(AG) ₂₆	GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC CATGTTTTCCCTTGACTGATCC	55°C	136pb

Ci-après, un autre tableau (4) résume le protocole PCR-multiplex intégrant les valeurs de concentrations (initiales et finales) et de volume (final pour 1 individu).

Tableau 4 : Volumes et concentrations utilisés pour le multiplexage.

<u>[C] initiale</u>	<u>Volume final</u> pour 1 individu		<u>[C] finale</u>
Tampon 10x	1,5	μl	1x
dNTP (2mM)	1,5	μl	0,2mM
MgCl₂ (25mM)	1,2	μl	2mM
Mélange amorces	1,44	μl	
<i>Cg49 R+F (0,18+0,18) NED</i>	0,36	μl	0,15 μM
<i>Cg108 R+F (0,36+0,36) FAM</i>	0,72	μl	0,3 μM
<i>L10 R+F (0,18+0,18) HEX</i>	0,36	μl	0,15 μM
Taq polymérase	0,3	μl	
H₂O	7,86	μl	
ADN	1,2		
Total	15μl		

Le multiplexage ne se définit pas comme une simple addition de PCR simples, il représente une réaction particulière dans la mesure où il faut amplifier simultanément plusieurs séquences cibles et ce, sans déséquilibre de représentation. Il nécessite une spécificité de mise au point comme le montre le multiplex pour le gène de la dystrophine (9 sites d'amplification simultanés ; Chamberlain et al., 1988) où une concentration en Taq polymérase 4 à 5 fois plus élevée qu'en uniplex est nécessaire pour une amplification multiple. D'autres auteurs insistent sur la nécessité de réajustements en multiplex (Henegariu et al., 1997 ; Elnifro et al., 2000 ; Masi et al., 2003). Nos ajustements ont essentiellement porté sur les concentrations finales des amorces (voir tableau 4), la température d'appariement (55-58°C) mais aussi sur le volume (final) de réaction. La température d'appariement optimale a été fixée à 55°C. Concernant les volumes, facteur important puisque déterminant les quantités de produits à utiliser, quatre ont été testés (10, 15, 20 et 25 μl). Si le volume de 25 μl initialement défini offre des résultats satisfaisants, il en va de même pour les volumes inférieurs de 20 et 15 μl . Le dernier (10 μl) n'a abouti qu'à des profils d'électrophérogramme (exemple p.62) dont les pics étaient pour la majorité non-spécifiques donc inexploitable. Nous avons par conséquent adopté 15 μl comme volume final pour la suite des analyses. L'ensemble de ces optimisations techniques a été associé à l'étape d'extraction, le détail de cette combinaison fait l'objet d'une note technique publiée en 2005 dans *Aquaculture Research* (voir Annexe 1). Cette méthode a également été adaptée pour la détection de la présence du virus de type Herpès (OsHV-1) dans les larves de *C. gigas* (voir Annexe 2).

Afin de réaliser le génotypage d'huîtres aux trois loci considérés, 1 μ L de produit de PCR multiplexé de chaque échantillon est mélangé avec 12 μ L de formamide et 0,25 μ L de standard de taille Genescan™ ROX™ (Applied Biosystems). Les analyses sont réalisées sur un séquenceur à capillaires de type ABI PRISM 3100 *Avant* (Applied Biosystems) utilisant du polymère POP4 et un jeu de 4 capillaires de 36 cm. Les données brutes sont collectées *via* le logiciel Foundation Data Collection v2.0 (Applied Biosystems).

3.3 La catégorisation des groupes d'allèles ou « Binning »

Afin, de caractériser et de corriger les groupes d'allèles, c'est-à-dire de ne retenir que les allèles parentaux qui apparaissent dans le génotype des larves, puis d'assigner chaque larve à un couple de parents de manière exacte, l'étape de « Binning » est indispensable. Le logiciel (GENMAPPER®) permet par élaboration de « panel » (définition d'une fenêtre d'apparition des valeurs alléliques de descendants pour chaque locus en fonction des allèles parentaux) de déterminer et de valider les allèles réellement transmis tout en s'affranchissant des pics artefacts et de la variabilité entre passages. Le binning est une étape importante, surtout lorsqu'on a à faire, comme c'est le cas chez l'huître, à des microsatellites imparfaits (= structure imparfaite du motif de répétition). Cette opération constitue un réel gain de temps et reste une étape préliminaire à l'assignation parentale. Là encore, une fois les génotypes des larves définis après binning, multiples méthodes existent pour l'assignation (en dehors de la comparaison manuelle).

3.4 Méthodes d'assignation de parenté

Plusieurs auteurs (Jones & Ardren, 2003 ; Wilson & Ferguson, 2002) passent en revue les différentes méthodes de calcul pour l'assignation de parenté. Il serait fastidieux de dresser une liste exhaustive mais en règle générale, on distingue au moins 3 grandes approches pour le calcul de parenté :

- les méthodes dites d'exclusion,
- l'allocation catégorique,
- et l'allocation fractionnée.

Le procédé d'exclusion repose sur les incompatibilités entre parents et descendants permettant de rejeter une combinaison parent-enfant donnée. Une mère et un descendant dont les génotypes diploïdes sont respectivement A/A et A/B vont logiquement exclure un père dont le génotype sera A/C pendant qu'un père B/C restera possible. Cette méthode se révèle particulièrement efficace lorsque le nombre de parents candidats est faible et le

polymorphisme de marqueurs disponibles élevé. Dans le cas d'un nombre de parents plus grand, il convient alors d'augmenter le nombre de marqueurs. Dans la plupart des programmes développés sur ce principe, il est possible de spécifier le nombre de désappariements nécessaire pour que l'exclusion soit valide.

L'allocation catégorique repose sur une approche du maximum de vraisemblance pour déterminer le parent le plus probable parmi un pool de parents déterminé. Ceci implique le calcul du logarithme du rapport de vraisemblance (ou « LOD score » pour « logarithm of the odds ratio ») correspondant à la vraisemblance d'un individu (ou d'une paire d'individus) à être le ou les parents d'un descendant donné, divisée par la vraisemblance de ces individus à ne pas être les parents du descendant. L'assignation des descendants se fait par le calcul des « LOD scores » les plus élevés. Cette méthode d'allocation paraît plus tolérante face aux mutations et erreurs de génotypage que le principe d'exclusion strict. Il existe différentes formulations de « LOD score » selon les connaissances préalables sur le génotype des parents (identification d'un parent lorsque l'autre parent est connu, identification d'un parent lorsque l'autre parent est inconnu et identification d'une paire de parents sans information préalable). Ces formulations sont autant de variations de la méthode que l'on retrouve développée par Meagher & Thompson (1986).

Tableau 5 : Programmes testés pour analyse de parenté dans le cas où le lien de parenté n'est pas connu *a priori* et où la totalité des génotypes parentaux est accessible.

^a**PROBMAX** Danzmann (1997) <http://www.uoguelph.ca/rdanzman/software/probmax/>

^b**PAPA** Duchesne et al. (2002) <http://www.bio.ulaval.ca/contenu-fra/professeurs/Prof-l-bernatchez.html>

^c**FAMOZ** Gerber et al. (2003) <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/Famoz/>

^d**PARENTE** Cercueil et al. (2002) <http://www2.ujf-grenoble.fr/leca/membres/manel.html>

^e**FETII** Boulangé & Goyard (1999) développé par Frédéric Boulangé et Emmanuel Goyard http://www.ifremer.fr/cop/Unite_Gene/Fetii/fetii_fr.htm

L'allocation fractionnée assigne des fractions, comprises entre 0 et 1 de chaque descendant sur un groupe de parents candidats. La proportion d'un descendant alloué à un parent particulier est proportionnelle à la vraisemblance de parenté de ce descendant comparée à celle de tous les autres parents potentiels.

Dans notre situation (aucun lien de parenté connu à priori, totalité des génotypes parentaux accessibles), 5 programmes susceptibles d'être appliqués ont été testés (voir ci-contre le tableau 5). Deux reposent sur les calculs de probabilité d'exclusion (PROBMAX^a, Fetii^c). Les trois autres (PAPA^b, Parente^d, FamoZ^c) utilisent l'allocation catégorique. Nous avons décidé d'appliquer le programme PAPA pour différentes raisons. En premier lieu, il autorise un contrôle sur les erreurs de transmission de valeurs alléliques. L'allocation catégorique est en ce sens beaucoup plus tolérante que les probabilités d'exclusion. PAPA utilise l'algorithme développé par Sancristobal & Chevalet (1997). D'autre part, l'excellente interface et la facilité d'utilisation ont permis de privilégier ce programme face aux autres.

PAPA repose sur une méthode du calcul de vraisemblance pour déterminer le parent le plus probable parmi un groupe déterminé de parents, chacun ayant potentiellement le même succès reproducteur. Les loci sont considérés indépendamment. Il n'est pas nécessaire que les génotypes parentaux soient tous connus. Par contre, ceux-ci sont supposés affranchis de toute erreur.

Concernant les 'erreurs' de transmission (mutations, génotypages erronés), deux paramètres sous contrôle de l'utilisateur sont disponibles. D'abord le niveau global d'erreur 'e' considéré comme la somme de toutes les probabilités qu'un allèle 'a' transmis devienne 'b' ('a' différent de 'b'), conséquence d'une mutation ou d'une mauvaise lecture de génotype. Autrement dit, il existe une probabilité 1-e que l'allèle 'a' reste 'a' après transmission à la descendance. Ce paramètre 'e' est compris entre 0 et 0,1. Ensuite, le programme considère la distribution de transmission de l'«erreur», sous contrôle également via le paramètre 'S'. S est défini comme la vitesse de perte de probabilité d'erreur vis-à-vis des allèles voisins. Soit un allèle parental 'a', la probabilité d'erreur attribuée à l'allèle 'b' est proportionnelle au rapport $1/D^S$ où D est la distance entre a et b ($D = |a-b|$). Avec des valeurs élevées de S, seuls les allèles les plus proches de 'a' seront recherchés comme porteurs potentiels de l'erreur. La valeur de S, comme celle de 'e' s'applique à tous les loci.

3.5 Détermination du pouvoir résolusif

Afin de valider la pertinence de l'ensemble du protocole « extraction-multiplexage trois loci » sur larves de *C. gigas*, il était aussi important de s'attarder sur le pouvoir résolusif défini par ce multiplexage pour les analyses de parenté.

Par l'intermédiaire du programme *FAP* (J.B. Taggart, University of Stirling ; non publié) nous avons déterminé ce pouvoir résolusif de parenté en se basant sur les génotypes de 13 géniteurs (3 femelles, 10 mâles) issus d'une population naturelle. Il est à signaler que ces génotypes ont été choisis parmi les plus polymorphes et hétérozygotes et ce, afin de faciliter l'analyse. Toutes les combinaisons possibles ont été calculées (sur le principe d'exclusion) et le résultat aboutit à 100% d'assignation (supposant aucune erreur de génotypage). Ce résultat permet de mettre en évidence l'excellent pouvoir résolusif de ce jeu de trois marqueurs (dans le cas où les génotypes parentaux sont choisis).

De plus, nous avons souhaité réaliser une simulation, pour cette fois-ci estimer le pouvoir résolusif « général » du multiplexage dans le cas où les géniteurs ne sont plus sélectionnés parmi les plus hétérozygotes mais pris au hasard. Pour cela, nous avons utilisé le programme de simulation (*CERVUS*) élaboré par Marshall et al. (1998), lequel est basé sur une méthode d'allocation catégorique. Celle-ci compare la vraisemblance de parenté de parents « vrais » à la vraisemblance de parenté de chacun des autres parents candidats, et ce pour un large nombre de descendants générés artificiellement par le programme. Les génotypes de descendants sont produits par échantillonnage « Mendélien » à partir des allèles des parents rentrés dans le programme pour la simulation. Les fréquences alléliques de 88 parents (nombre d'huîtres parmi lesquelles ont initialement été choisis les 13 géniteurs de l'expérience) ont été utilisées pour générer la simulation. Nous avons ainsi testé les configurations possibles en simulant de 2 à 100 adultes géniteurs (figure 7).

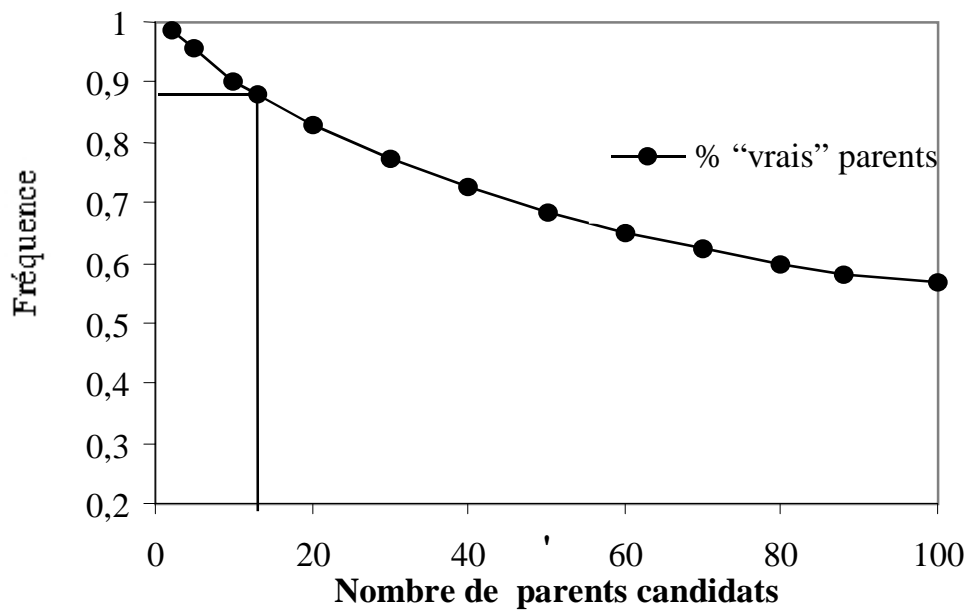


Figure 7 : Simulation du pouvoir résolutif via le programme CERVUS (Marshall et al.,1998).

On observe sur la courbe du pourcentage simulé de parents « vrais » que les valeurs diminuent jusqu'à 60% lorsque 100 parents sont utilisés comme géniteurs potentiels. Avec 13 parents « non choisis », le pourcentage atteint 87%. Cette valeur est à rapprocher du 100% calculé obtenu lorsque les parents sont choisis.

Cela montre que le pouvoir résolutif est encore suffisamment important pour appliquer le jeu de marqueurs à des populations, sinon naturelles, au moins d'éclosion non sélectionnées sur critère génotypique.

II. Autre application possible du jeu de marqueurs : estimation de la variabilité génétique des stocks en éclosérie commerciale

1. Introduction

Outre son application dans la détermination rétrospective de parenté, le jeu de trois marqueurs a été utilisé afin d'estimer la variabilité génétique de géniteurs issus d'écloséries commerciales. Une première validation a été réalisée au travers du génotypage d'individus échantillonnés dans les stocks de géniteurs de deux écloséries commerciales (que nous nommerons A et B). L'objectif est ici de quantifier le niveau de diversité génétique de ces lots par rapport à une population sauvage de référence (captage naturel Marennes-Oléron, supposée représentative de la population d'origine des lots d'écloséries) afin d'estimer l'éventuelle perte de diversité qui pourrait résulter de la fermeture de ce stock (par dérive génétique et/ou par l'effet de la sélection). Les trois marqueurs microsatellites ont été utilisés.

2. Analyse

Plusieurs paramètres ont été mesurés afin d'estimer la variabilité génétique au sein des différentes populations :

- le nombre d'allèles par locus,
- l'hétérozygotie observée (H_o) représentant la fréquence des individus hétérozygotes à chaque locus,
- l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de l'équilibre de HARDY-WEINBERG ($H_n.b.$). Ce dernier paramètre correspond à un estimateur d'hétérozygotie non biaisé (Nei, 1987) tel que :

$$H_n.b. = [2n / (2n - 1)] \cdot [1 - \sum x_i^2]$$

avec x_i la fréquence du $i^{\text{ième}}$ allèle, n étant la taille de l'échantillon. Le rapport $2n / (2n - 1)$ permet de prendre en compte le biais d'échantillonnage.

- le F_{is} a également été calculé comme indice de fixation. Cet indice mesure les écarts à l'équilibre de HARDY-WEINBERG à l'intérieur de chaque population (estimé selon Weir & Cockerham, 1984). Les valeurs de F_{is} sont comprises entre -1 et 1 (les valeurs négatives correspondent à un excès d'hétérozygotes, les valeurs positives à un déficit).

Pour tester l'hypothèse nulle $F_{is}=0$, nous avons effectué une permutation des allèles à l'intérieur des populations : pour chaque locus, une urne gamétique est construite à

partir des allèles des individus de la population. Le tirage aléatoire dans cette urne permet de reconstruire les génotypes monolocus en simulant la panmixie. Les génotypes sont conservés, ce qui permet de s'affranchir de la non-dépendance des allèles lorsque le F_{is} est différent de 0. La valeur observée sur les données réelles est ensuite comparée à la distribution obtenue, et permet d'avoir une estimation de la probabilité d'obtenir une valeur supérieure ou égale à la valeur observée sous H_0 . Les tests ont été effectués avec 1000 permutations. Le calcul de ces paramètres a été réalisé à l'aide du logiciel GENETIX (version 4.05, Belkhir et al., 2004).

- la fréquence des allèles nuls selon deux méthodes :

- méthode de Chakraborty (Chakraborty et al., 1992) reposant sur le déficit apparent en hétérozygotes, donnant une estimation de la fréquence des allèles nuls (r) à partir des valeurs d'hétérozygotie observée et attendue telle que :

$$r = (Hn.b. - H_0)/(Hn.b. + H_0)$$

- méthode de Brookfield (Brookfield, 1996) qui, contrairement à la précédente, prend en compte l'existence des individus non amplifiés, considérés comme homozygotes pour l'allèle nul. Cette méthode définit l'estimateur (r) tel que :

$$r = \frac{A + \sqrt{A^2 + B}}{2(1 + Hn.b.)} \text{ où } A = Hn.b.(1+N) - H_0 \text{ et } B = 4N(1 - Hn.b.^2)$$

Ces deux formules définissent des estimations respectivement minimales et maximales pour la fréquence des allèles nuls.

Enfin, la taille efficace de population ou effectif efficace (N_e) a été calculée suivant la méthode dite " temporelle " utilisant les changements temporels des fréquences alléliques au cours des générations successives (Waples, 1989). Cette méthode repose sur le concept suivant : le changement des fréquences alléliques au cours du temps sous l'effet de la dérive permet d'estimer la taille efficace d'une population, à partir de l'observation des variances temporelles pour des loci sélectivement neutres. Le logiciel NeEstimator (Peel et al., 2004) a

Tableau 6 : Paramètres généraux de l'analyse de variabilité génétique des trois populations.

	Population Témoin	Ecloserie A	Ecloserie B
Cg108	N	50	49
	Nb individus	50	49
	Nb allèles	32	13
	H _{obs}	0,880	0,796
	H _{n.b.}	0,957	0,719
	F _{is}	0,085	-0,108
		*	ns
	rC	0,04	-0,05
	rB	0,04	0
L10	N	50	49
	Nb individus	50	49
	Nb allèles	33	10
	H _{obs}	0,900	0,449
	H _{n.b.}	0,965	0,801
	F _{is}	0,068	0,442
		*	**
	rC	0,04	0,28
	rB	0,03	0,20
Cg49	N	50	49
	Nb individus	50	49
	Nb allèles	25	13
	H _{obs}	0,640	0,735
	H _{n.b.}	0,939	0,888
	F _{is}	0,320	0,174
		**	**
	rC	0,19	0,09
	rB	0,15	0,08
Multilocus	N	50	49
	Nb allèles	30	12
	H _{obs}	0,807	0,660
	H _{n.b.}	0,954	0,803
	F _{is}	0,155	0,180
		**	**
			ns

Les indices Fis sont suivis d'un test de significativité en effectuant un certain nombre de permutations (1000) sur le fichier de données. L'idée sous-jacente est d'obtenir la distribution de l'estimateur sous l'hypothèse nulle Ho. La valeur observée sur les données réelles est ensuite comparée à la distribution obtenue, et permet d'obtenir une estimation de la probabilité d'obtenir une valeur > ou = à la valeur observée sous Ho ; (ns) correspond à des valeurs non significatives de p,* de p<0,05 et ** p<0,001 après correction de Bonferroni sur les locus.

Nb individus	Nombre d'individus analysés
Nb allèles	Nombre d'allèles dans l'échantillon
Hobs	Hétérozygotie observée
Hn.b.	Hexp corrigée pour le biais de l'échantillonnage
Fis	Indice de fixation estimé selon Weir & Cockerham (1984)
rC	Estimation des fréquences d'allèles nuls Chakraborty (1992)
rB	Estimation des fréquences d'allèles nuls selon Brookfield (1996)

été utilisé pour calculer les N_e selon cette méthode (voir page 42 pour plus de détails sur la notion de N_e).

3. Résultats (tableau 6)

3.1 Diversité allélique

Les deux populations d'écloserie ont perdu environ 60 % de leur diversité allélique (70 à 48 % selon les loci). En moyenne, elles présentent 12 allèles par locus contre 30 pour la population sauvage. Sur 7 générations, la perte moyenne par génération est donc sensiblement inférieure à 10 %.

3.2 Hétérozygotie

La population "Écloserie A" a perdu 20% de son hétérozygotie, passant d'une valeur moyenne de 0,81 à 0,66. Une forte variance est observée entre les loci : L10 présentant 50 % de baisse d'hétérozygotie et CG49 une augmentation de 14 %. A contrario, la population "Écloserie B" présente des valeurs très élevées. En analyse multilocus, près de 99 % des individus sont observés comme hétérozygotes.

3.3 Taille efficace de la population

En supposant que la population naturelle génotypée soit représentative de la population d'origine du stock d'écloserie et en se basant sur un écart de 7 générations, les variations de fréquence allélique donnent une taille efficace de la population A égale à 50 (intervalle de confiance : 35 – 72).

4. Discussion

Cette « image » de la diversité génétique de deux populations d'écloserie, comparée à une population sauvage, montre l'intérêt du jeu de marqueurs utilisé. Nous avons ici une première information quant à la diversité de stocks de géniteurs d'écloserie simplement basée sur un jeu de trois marqueurs. Pour la population "Écloserie A", la perte de diversité génétique apparaît significative et supérieure à ce qui est communément admis pour une population en sélection. Le calcul des N_e montre des valeurs comparables à celles déterminées dans les travaux de Hedgecock & Sly (1990) et Hedgecock et al. (1992) pour *C. gigas* et Gaffney et al. (1992) pour *C. virginica* (valeurs de N_e majoritairement inférieures à 50).

Les F_{is} sont significatifs ($F_{is} > 0$) pour cette population, ainsi d'ailleurs que pour la population témoin. Généralement, les principales explications concernant l'existence de déficit en hétérozygotes révélé par F_{is} s'articulent autour de trois points (David, 1996) :

- effets populationnels : les individus considérés ne proviennent pas d'un pool unique de gamètes fécondés au hasard. Il est alors possible de considérer une réassociation non aléatoire des gamètes (consanguinité) ou bien il existe un mélange de groupes différenciés à l'intérieur de l'échantillon (effet Wahlund).
- effets sélectifs : la sélection élimine une partie des hétérozygotes au cours de la phase larvaire ou embryonnaire. En effet les larves peuvent être soumises à un régime de sélection largement différent de celui des adultes (Haag & Garton, 1995). Quelques analyses portant sur des mortalités différentielles pendant ces stades montrent cependant que les homozygotes (et non les hétérozygotes) sont contre-sélectionnés (Bierne et al., 1998 ; Launey & Hedgecock, 2001).
- non-détection du polymorphisme introduisant une sous-estimation de l'hétérozygotie observée. On distingue différentes possibilités de non-détection :
 - ✓ existence d'allèles nuls (non visualisés),
 - ✓ ou même artefacts de lecture.

Pour des populations d'éclosion, l'hypothèse d'un effet Wahlund est difficilement justifiable, surtout lorsque l'historique « généalogique » est connu. En revanche, elle peut expliquer le déficit observé en population sauvage témoin. La présence d'allèles nuls peut également justifier une partie du déficit. Cependant, seuls les marqueurs CG49 pour la population témoin et L10 pour la population A, présentent des valeurs élevées (15 à 28 %). Enfin, compte tenu des estimations des effectifs efficaces, l'hypothèse de croisement entre individus apparentés (consanguinité) peut aussi être évoquée, au moins pour la population d'éclosion A.

En ce qui concerne la seconde population d'éclosion, les résultats sont plus inattendus puisque aucun déficit en hétérozygotes n'est observé. Et pour cause, 99 % des individus sont observés comme hétérozygotes. Ces données semblent nous renseigner sur le mode de gestion du stock et sont vraisemblablement le résultat d'une procédure de sélection en population semi-fermée. On peut aussi légitimement penser qu'il s'agit d'une population ayant subi un goulot d'étranglement, expliqué par le fait que la diversité allélique diminue plus vite que l'hétérozygotie après un tel événement (Nei et al., 1975). Enfin, de façon plus hypothétique, ces résultats pourraient peut-être traduire que le processus de sélection sur une génération

conduit à sélectionner les individus hétérozygotes, ce qui, dans ce cas pourrait représenter plutôt un effet d'hétérosis qu'un effet additif sélectionnable, bien qu'à ce stade de l'analyse rien ne le prouve.

NOTION D'EFFECTIF EFFICACE

La taille efficace d'une population (N_e) est un paramètre relativement complexe à appréhender. En effet, il fait appel à nombreuses notions de génétique des populations et s'applique à différentes situations dont le contexte est souvent mal défini. Il n'en est pas moins un paramètre important en génétique évolutive ainsi qu'en biologie de la conservation car il influence la dérive génétique. La dérive génétique influence à son tour le rythme de perte de diversité génétique, le rythme de fixation d'allèles délétères mais aussi l'efficacité de la sélection naturelle en maintenant des allèles bénéfiques (Berthier et al., 2002). La taille efficace (ou effectif efficace) d'une population peut être globalement définie comme la taille d'une population idéale (de type Wright-Fisher) pour laquelle la fluctuation du polymorphisme est la même que celle de la population étudiée (Wright, 1931 ; Wang & Cabalero, 1999). Tous les individus ne participent pas forcément au processus reproductif, si bien que la taille de la population N qui détermine le rythme de la dérive génétique n'est pas égale à la taille de recensement de la population. Pour généraliser, N_e est la taille d'une population idéale dans laquelle un paramètre génétique donné prend la même valeur que celle attendue dans la population recensée. Ceci suggère qu'il existe plusieurs types de taille efficace, selon le paramètre ou l'effet du paramètre auquel on s'intéresse (Vitalis & Couvet, 2001). Généralement, la littérature recense trois grands types de N_e :

- 4 Changement de la consanguinité de la population (« **inbreeding effective population size** ») (Crow & Deniston, 1988).
- 4 Variance du changement des fréquences alléliques d'une génération à l'autre (« **variance effective population size** ») (Crow & Deniston, 1988).
- 4 Changement de l'hétérozygotie de la population d'une génération à l'autre (« **eigenvalue effective population size** ») (Ewens, 1979, 1982)

L'estimation d'un tel paramètre reste délicate en populations naturelles ou populations sans pedigree connu (Waples, 1989), d'autant que le N_e est lié au modèle de mutation considéré. Aucune méthode ne permet véritablement d'établir une estimation consensuelle. Les mécanismes d'accouplements, la variance dans le succès reproducteur des individus, l'inégalité des sex-ratios ou les générations chevauchantes sont autant de facteurs qui différencient la taille au sens strict d'une population de la notion de taille efficace (Caballero, 1994).

Le N_e peut être ainsi calculé sur la base directe d'une estimation de ces paramètres (Nunney & Elam, 1994). Ces méthodes de calcul reposent sur des données démographiques qui sont, en pratique, difficiles à obtenir et l'estimation du N_e devient particulièrement difficile pour des espèces à forte fécondité et mortalité juvénile (Anderson, 2005). Alternatives à cette évaluation directe, il existe des méthodes indirectes utilisant des données génétiques. On distingue différentes méthodes basées sur le changement temporel des fréquences alléliques (Pollack, 1983 ; Waples, 1989 ; Williamson & Slatkin, 1999 ; Anderson et al., 2000 ; Berthier et al. 2002 ; Anderson, 2005), l'excès d'hétérozygotie (Pudovkin et al., 1996 ; Luikart & Cornuet 1999), la perte d'hétérozygotie (Harris & Allendorf, 1989) et le déséquilibre de liaison (Hill, 1981).

La méthode des changements des fréquences alléliques est la plus souvent répandue. Elle s'attache à estimer N_{ev} (« **variance effective population size** ») (Crow & Deniston, 1988). A partir des fréquences alléliques de deux échantillons issus d'une même population et séparés par un nombre connu de générations, l'estimation de N_{ev} peut donc passer par la méthode temporelle (Waples, 1989) mais aussi par la méthode basée sur la vraisemblance (Likelihood-based methods) (Williamson & Slatkin, 1999 ; Anderson et al., 2000 ; Berthier et al., 2002 ; Anderson, 2005).

Bilan-synthèse

✓ Ce chapitre décrit la mise au point d'un jeu de trois marqueurs microsatellites suffisamment polymorphes pour une assignation de parenté sur larves, rendant possible pour la première fois chez *C. gigas* une approche dite "famille en mélange".

✓ Cette approche donne accès à l'information génétique en stade larvaire permettant d'établir une étude de polymorphisme génétique en terme de contribution ou même d'envisager de déterminer les bases génétiques de caractères d'intérêt (en s'affranchissant des biais environnementaux).

✓ La méthode d'analyse de parenté a été optimisée de façon à obtenir des pourcentages d'assignation supérieurs à 80% pour un nombre de géniteurs (non choisis sur le génotype) inférieur ou égal à 20 (soit jusqu'à 100 familles).

✓ En parallèle, ce jeu de marqueurs constitue un outil efficace à l'estimation de la diversité génétique de stock d'écloserie, lesquels stocks montrent une diversité allélique réduite par rapport au témoin sauvage de référence.

CHAPITRE 2

**EFFETS SELECTIFS DU TAMISAGE : Conséquences
phénotypiques et génétiques de la sélection sur la taille au stade
larvaire**

I. Introduction

De nombreux organismes invertébrés marins ont un cycle de vie incluant une phase larvaire pélagique. L'existence de cette phase est généralement synonyme de forte fécondité (Widdows, 1991). Williams (1975) apparente ces espèces au modèle qu'il a défini sous le nom de «Orme-Huître», dressant un parallèle entre ces organismes, animaux ou végétaux, qui produisent un nombre important de descendants, ensuite diffusés dans le milieu. Différentes théories existent pour expliquer l'émergence évolutive de ces cycles de vie complexes (Moran, 1994 ; Wilbur, 1980). Ainsi, le stade larvaire pourrait résulter d'une adaptation à la dispersion et à la sélection de l'habitat, opposé au stade adulte, spécialisé dans la croissance et la reproduction (Wray & Raff, 1991). Wilbur (1980), insiste sur l'importance de la métamorphose, interprétant les phases de tels cycles comme des changements adaptatifs à différentes niches écologiques, dissociant clairement les implications écologiques des étapes larvaires et adultes.

Plus communément, cette stratégie d'histoire de vie est considérée comme une réponse évolutive à la forte mortalité en phase précoce de développement. En effet, le pourcentage de larves atteignant le stade adulte est très restreint (Thorson, 1950 ; Rumrill, 1990). La phase larvaire représente en cela une étape critique. Une conséquence des mortalités en phase précoce est la forte variabilité du succès reproducteur entre individus d'une même population, aussi bien observée en milieu naturel (Hedgecock, 1994 ; Li & Hedgecock, 1998) que pour des stocks d'écloserie (Lannan, 1980 ; Boudry et al., 2002). D'une manière générale, cette variabilité du succès reproducteur, est supposée réduire la diversité génétique. Le maintien de ce polymorphisme est cependant, en théorie, équilibré par la forte fécondité ainsi que des tailles de populations importantes, sans compter sur l'effet aléatoire des conditions environnementales (Sgrò et al., 2004).

A ces événements de mortalités qui caractérisent l'espèce huître, ajoutons la forte variabilité phénotype existante en phase larvaire. Cette variabilité touche essentiellement les caractères de croissance et survie. La forte plasticité de ces caractères accroît la variabilité phénotypique.

En milieu contrôlé (i.e. en écloserie de production), l'élevage larvaire tient une place particulière puisque « clef de voûte » de la production en aval. Cette période allant de la fécondation à la métamorphose est optimisée la plupart du temps dans un souci de rentabilité. Cette optimisation passe par la pratique du tamisage, reposant implicitement sur le postulat

d'une corrélation positive entre croissance larvaire et post-larvaire, et dont l'objectif est d'éliminer les plus petites larves. Cette élimination des plus petites larves afin de réduire le temps d'élevage et la variabilité de taille est opérée en écloserie de bivalves depuis déjà quelques décennies (Bardach et al., 1972).

L'impact d'une telle pratique, tant au niveau phénotypique qu'en terme de diversité génétique reste relativement inconnu. Quelques études rapportent dans les stocks d'écloserie des tailles efficaces de population faibles (Hedgecock & Sly, 1990 ; Hedgecock et al., 1992 ; Gaffney et al., 1992).

Dans ce chapitre, nous présentons une expérience ayant pour objectif d'étudier les conséquences de la sélection de larves à croissance rapide sur la variabilité phénotypique et génotypique de *C. gigas*. Croissance et diversité génétique dans une population larvaire issue d'un plan de croisement factoriel, ont été suivies. Les familles (=descendants d'un couple de géniteur) issues du croisement ont été élevées en mélange. Deux méthodes d'élevage ont été appliquées :

- (1) élimination progressive des plus petites larves au cours de l'élevage (méthode classiquement appliquée en écloserie de production)
- (2) maintien de l'ensemble de la population.

Dès que des larves ont atteint une taille suffisante pour être retenues sur un tamis de 220 μm et atteint le stade pédivéligère annonçant fixation et métamorphose, la fraction de larves retenue a été échantillonnée pour analyses par marqueurs microsatellites.

Les données ainsi recueillies, ont une double perspective :

- (1) quantifier l'impact des pratiques de tamisage sur la diversité génétique de la population estimée en terme de taille efficace sur la base de la variance du succès reproducteur entre géniteurs (Boudry et al., 2002),
- (2) tracer la structuration temporelle de la population larvaire au cours de son développement (et donc d'estimer la part potentiellement perdue par élimination des plus petites larves).

II. Matériel et Méthodes

1. Choix des géniteurs

Des huîtres adultes ($n = 100$) issues du milieu naturel (Port des Barques, Charente-Maritime) ont été obtenues auprès d'un ostréiculteur. Dès leur arrivée à l'écloserie, les animaux ont été individualisés par collage sur la coquille d'une fine étiquette à la colle époxy. Ils ont ensuite été placés dans un raceway alimenté par eau de mer filtrée et maintenus dans des conditions de température et de nourriture optimales pour leur maturation avant reproduction (Fabioux, 2004). Des prélèvements de manteau pour génotypage par marqueurs microsatellites ainsi que le sexage ont été effectués dans une solution anesthésiante (3/5 eau douce, 2/5 eau de mer avec une concentration finale en $MgCl_2$ à 5%). Le tissu prélevé a été conservé dans une solution d'éthanol 70 en attendant l'extraction d'ADN.

Après typage et sexage, nous avons procédé à la caractérisation des géniteurs potentiels. Pour cela, 5 étapes de sélection successives ont été appliquées comme suit :

*(Le **tableau 7** illustre chacune des différentes étapes de sélection)*

- Première sélection :

élimination des individus dont le génotype était incomplet pour les loci L10, CG49 et CG108 (nombre d'individus restants = 88).

- Deuxième sélection :

élimination des homozygotes avérés, donc conservation des hétérozygotes aux 3 loci précités ($n = 33$)

- Troisième sélection :

tous les allèles ont été comptabilisés en terme de nombre d'apparition dans la population restante. Un score est ainsi déterminé pour chaque individu en sommant le nombre d'apparition de chacun des 6 allèles. Conséquence, les individus pourvus d'une somme plus faible sont supposés posséder des allèles globalement moins fréquents. Cette étape permet de déterminer un classement sur lequel s'appuient les deux étapes suivantes.

- Quatrième sélection :

ont été éliminés les individus potentiellement homozygotes, et ce aux vues des différences entre valeurs relatives des allèles. Ont été ainsi éliminés les individus dont les allèles sont séparés par 2 ou moins de deux paires de base ($n = 24$).

- Cinquième sélection :

enfin la compatibilité des génotypes entre mâles et femelles a été testée afin de maximiser le nombre d'allèles mis en jeu lors du croisement ($n=13$).

Tableau 7 : Illustration des différents niveaux de sélection intervenant dans le choix des géniteurs.

(1) sélection des individus de génotype complet pour 3 loci (CG49, CG108 et L10)
(2) et conservation des seuls hétérozygotes

(3) détermination d'un score tenant compte de la fréquence de chaque allèle

Individu	Sexe	CG49		CG108		L10		Score	Doute	Cg49	Cg108	L10
164	?	138	145	117	127	118	144	14		7	10	26
23	?	144	147	138	163	146	171	19		2,86	24,7	25
89	?	136	145	125	144	138	159	21		8,7	19	21
2	?	142	157	125	138	128	153	22		14,8	12,7	24,8
190	F	134	175	123	137	153	183	9		40,7	14	30,2
131	F	161	165	130	152	153	161	14				
53	F	157	163	121	128	142	165	16				
73	F	140	142	135	156	132	155	17	*			
121	F	144	168	142	151	114	146	18				
142	F	145	150	129	144	114	134	18				
169	F	140	159	118	143	140	142	18	*			
154	F	128	140	120	131	132	177	19				
27	F	130	144	149	168	157	177	20		14	18,5	20
158	F	136	142	120	121	146	148	21	*	6,16	1	2,09
184	F	144	159	125	140	116	142	21		14,8	15	26
167	F	145	179	131	141	146	151	22		34	10	4,61
147	F	159	166	131	133	142	157	24	*	7,49	2	15,1
130	F	150	165	125	131	157	165	25		14,6	6	8
103	M	153	163	148	153	177	179	10	*	10	5	2
20	M	140	171	147	150	128	154	11		30,6	2,79	25,8
139	M	132				125	153	12		46	14	28
16	M	144				124	132	16		8,67	19,8	8
144	M	142				142	144	16		13	13	2,06
178	M	138	192	124	138	120	134	16		53,9	14	14
82	M	132	159	120	144	130	159	19		26,9	24	29
179	M	136	149	131	134	112	130	19		12,8	3	18
116	M	161	164	129	131	120	155	21	*	3,76	1,82	35
171	M	130	157	142	143	120	146	21	**	27	1,08	26,4
119	M	159	161	131	134	124	136	22	*	2	3	12
62	M	130	138	132	144	157	159	23	*	8	12	2,11
175	M	138	157	129	138	138	157	23		19	9	19
22	M	136	149	126	131	134	146	25		12,5	4,93	12,3
172	M	161	165	132	156	146	157	25		4	24	11,1

(4) élimination des homozygotes potentiels sur la base des valeurs alléliques brutes données par le logiciel Genemapper®. Les individus écartés sont pourvus d'un astérisque rouge dans la colonne « doute ».

(5) compatibilité des génotypes mâles et femelles

2. Croisement

Au final, 10 mâles et 3 femelles ont été « sélectionnés » pour le croisement factoriel, chaque mâle et chaque femelle étant croisés entre eux (30 croisements). Après ouverture, le sexe de chaque individu retenu a été vérifié. Les spermatozoïdes et les ovocytes ont été collectés par scarification, méthode consistant à dilacérer la gonade puis à rincer cette dernière à l'eau de mer filtrée. Les concentrations des gamètes ont été déterminées par comptage sur cellule (Malassez pour les ovocytes, Thoma pour les spermatozoïdes) couplée au logiciel IPS de l'analyseur d'image SAMBATM (IPS 4.40 Copyright © 2003, Samba Technologies).

Les 30 croisements ont ensuite été effectués séparément dans des béchers de 500ml. Le mélange des gamètes a été fait à raison de 100 spermatozoïdes par ovocyte, chacun des 30 béchers contenant théoriquement 10^6 ovocytes (objectif final : obtenir 5 millions de larves dans chaque bac d'élevage, soit une densité de 100 larves/ml). Ce ratio de gamètes est considéré comme optimal pour réaliser la fécondation. En deçà de 50 spermatozoïdes par ovocyte, le taux de fécondation peut être affecté et au-delà de 500 spermatozoïdes/ ovocyte, le risque de polyspermie devient significatif (Gérard et al., 1995).

Des prélèvements post-fécondation ont été réalisés afin de déterminer le taux d'éclosion (= nombre de larves D / nombre total d'ovocytes à 24h). Ainsi pour chaque croisement, en triplicat (3 réplicats), ont été ajoutés 333 μ l d'ovocytes fécondés à 9666 μ l d'eau de mer. Après 24h, une goutte de formol (pur) a été ajoutée. Le comptage d'ovocytes fécondés a été réalisé sous microscope sur plaque quadrillée dans un volume de 1ml. Chaque réplicat est lui-même le fruit d'un triple comptage. Un second comptage afin de réestimer les concentrations d'ovocytes a aussi été accompli par prélèvement de 500 μ l d'ovocytes fécondés (1h après fécondation) additionné de formol, et ce dans des eppendorfs de 1,5ml. Cette réestimation a été faite sur cellule de Nageotte en utilisant le système d'analyse d'image (SAMBATM). Enfin, des fragments branchiaux des 13 individus participant au croisement ont été prélevés pour confirmer les génotypes précédemment établis.

3. Elevage larvaire

Les embryons des 30 croisements ont été mélangés 3h après fécondation permettant de maximiser la diversité génétique en évitant la compétition spermatique (Boudry et al., 2002). Après mélange et homogénéisation, les embryons ont été transférés en salle d'élevage larvaire. La répartition a été faite dans 6 jarres de 50 litres d'eau de mer filtrée (1 μ m).

Les conditions environnementales d'élevage ont été fixées de la manière suivante : température de 23°C, salinité 28-32‰, régime trophique quotidien non saturant à base de 2 micro-algues : *Tetraselmis suecica* et *Isochrysis aff. Galbana* (T-iso), tableau 8).

Tableau 8 : Rationnement larvaire.

	Tableau de rationnement (nb de cell/ μ L/j)	
	<i>Isochrysis aff. galbana</i> (T-iso)	<i>Tetraselmis suecica</i>
Ration progressive phase 1 (J1-J6)	4	0,3
Ration progressive phase 2 (J7-J15)	19,3	1,7
Ration progressive phase 3 (J15-Fin)	38,5	4

La dose normale progressive appliquée se réfère aux rations trophiques distribuées au sein de l'écloserie expérimentale de l'IFREMER La Tremblade, laquelle, comme son nom l'indique évolue en fonction de la taille moyenne des larves (Lamouroux, 2001).

Deux méthodes d'élevage ont été appliquées : (1) élimination progressive des plus petites larves au cours de l'élevage et (2) maintien de l'ensemble de la population larvaire (suivant la méthode décrite par Collet et al., 1999) (3 réplicats par condition). Les vides de maille des tamis utilisés pour les 2 conditions sont référencés dans le tableau 9 suivant.

Tableau 9 : Evolution de l'application du tamisage.

Jour d'élevage	(2) Tamisage non sélectif (μ m)	(1) Tamisage sélectif(μ m)
1	45	45
3	45	45
6	45	60
8	45	85
10	60	100
13	60	150
15	60	180
17	60	180
20	60+220	180+220

Pour tous les lots, la densité larvaire a été ramenée à 10 larves/ml après 24h (équivalent pour un bac de 50 litres à 500 000 larves).

Au bout de 24h d'incubation, les larves ont été récupérées sur un tamis de maille de 45 μ m, rincées à l'eau de mer filtrée puis remises en suspension dans une éprouvette pour réaliser un échantillonnage (comptage, mesure). La remise en eau a ensuite été effectuée à une température de 23°C. Pour la suite de l'élevage, une filtration identique à celle précédemment décrite a été réalisée tous les 2-3 jours. La maille de tamis a été augmentée progressivement pour 3 des lots correspondant à une simulation des conditions d'écloserie commerciale. Cette augmentation a été adaptée au cours de chaque filtration de façon à éliminer au final environ 50% de l'effectif initial. Pour l'autre condition expérimentale, une maille de tamis de 45 μ m (puis de 60 μ m de façon à se débarrasser des coquilles résiduelles) a été maintenue afin de retenir le maximum de variabilité phénotypique.

Plus précisément, les paramètres contrôlés au cours de cet élevage ont été les suivants :

- survie (à chaque filtration, estimée selon la procédure décrite par Utting & Spencer, 1991),
- croissance (à chaque filtration, mesures du diamètre maximal d'une centaine d'individus réalisées par logiciel d'analyse d'image SAMBATM).

4. Analyses de parenté

Dès que des larves ont atteint une taille suffisante pour être retenues sur un tamis de 220 μ m, associée à la présence d'un « œil » de fixation correspondant au stade pédivéligère annonçant la fixation et la métamorphose, la fraction de larve retenue a été échantillonnée pour analyses par marqueurs microsatellites. Ainsi tous les 2-3 jours (à partir du 20^{ème} jour d'élevage), 96 larves pédivéligères de chaque réplicat ont été prélevées puis préservées dans l'éthanol 70° pour analyses de parenté.

L'analyse de parenté a été réalisée comme décrit dans le chapitre 1. Le génotypage a été fait sur séquenceur ABI Prism® 3100 (Applied Biosystem) via le logiciel Genemapper® pour les procédures de 'binning'. Pour l'assignation à proprement parlé, le logiciel PAPA (« Package for the Analysis of Parental Allocation », Duchesne et al., 2002) a été utilisé (paramètres d'allocation : niveau global de l'erreur de transmission $\alpha=0,1$; distribution de l'erreur de transmission $S=6$). Des échantillons ont été analysés à trois dates : 20 jours après fécondation (a.f.), correspondant au premier jour de fixation pour les deux conditions

d'élevage ; 25 jours a.f. correspondant aux dernières cohortes de fixation pour la condition avec tamisage et aux cohortes intermédiaires pour la condition témoin (non sélective) ; enfin, 28 jours a.f. représentant les dernières cohortes pour le témoin.

Le reste de la fraction retenue a été transféré vers le dispositif de fixation en micronurserie. Les larves ont alors été réparties dans un tamis rectangulaire (45x35x12cm) dont la maille est de 150 μ m. La microbrisure de coquilles d'huîtres est utilisée comme support de fixation (entre 50 et 100ml de brisure par tamis).

Le reste des larves non retenue par le tamis de 220 μ m a été remis dans les bacs respectifs d'élevage larvaire.

Chaque cohorte de fixation a été disposée de façon aléatoire dans des raceways contenant les tamis rectangulaires précédemment décrits. Ces raceways ont été alimentés par un flux continu d'eau filtrée (20 μ m) enrichie en phytoplancton. Pour chaque cohorte, une estimation de la densité de juvéniles (larves fixées) a été réalisée (Ernande et al., 2003) 10 jours après mise en fixation. Pour cela, le poids total de la cohorte considéré a été déterminé, ainsi que les poids de 3 sous-échantillons d'un nombre connu de juvéniles. La moyenne des 3 sous-échantillons a permis de ramener le poids total à un nombre estimé de juvéniles présents dans le tamis. L'ensemble des cohortes a ensuite été réduit à une densité de 5000 individus par tamis. Ces mesures ont permis de définir le taux de fixation.

L'ensemble des analyses au cours de l'élevage larvaire et de la période de micronursage est résumé dans la figure 8.

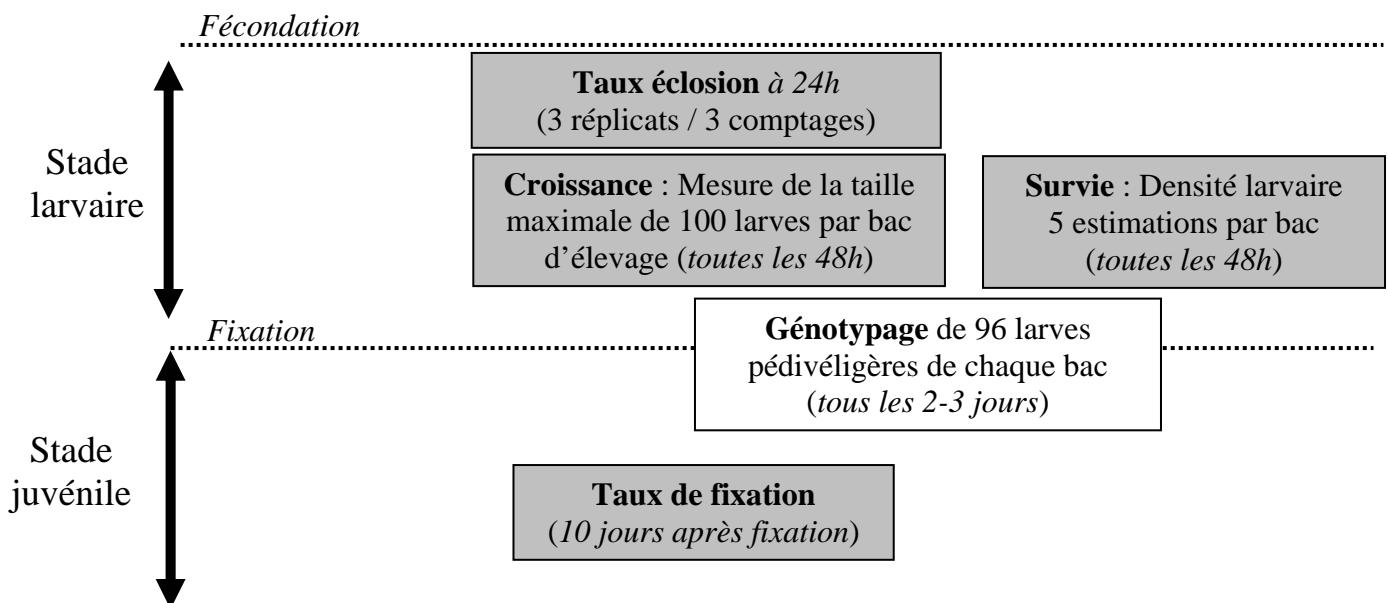


Figure 8 : Ensemble des analyses au cours de l'expérience (en grisé les données phénotypiques, en blanc les données de génotypages).

5. Analyse des données

5.1 Procédure statistique générale : modèles mixtes

Les analyses statistiques relatives aux données phénotypiques et génétiques de l'expérience impliquent deux types d'effets qualifiés de fixes et aléatoires : le *temps* et l'effet principal '*traitement*' sont définis comme fixes, pendant que les effets '*mâle*', '*femelle*' (spécifiques des données génétiques ainsi que du taux d'éclosion) et '*réplicat*' sont considérés comme aléatoires (rentrent également dans cette dernière catégorie tous les effets impliquant une interaction, quelle que soit la qualification de l'effet). En conséquence, les données suivant une distribution normale sont analysées en utilisant le principe des modèles linéaires mixtes (Proc MIXED, SAS/STAT[®] software, SAS Institute Inc., 1999). Cette procédure est une généralisation de la procédure GLM (General Linear Models) qui traite les modèles linéaires à effets fixes uniquement. Même s'il existe une ligne de commande 'RANDOM' reliée à la procédure GLM sous SAS[®], l'algorithme de calcul considère malgré tout les effets aléatoires comme fixes. Le recours à la procédure MIXED se justifie également par rapport à la présence d'effets imbriqués (exemple : '*réplicat*' imbriqué dans l'effet '*traitement*'; *traitement* correspond à la condition de tamisage), de données manquantes mais aussi de jeux de données non équilibrés. Dans ces derniers cas évoqués, la procédure classique d'analyse de variance GLM ne permet pas de construire les tests d'hypothèse appropriés. La procédure MIXED, par opposition, permet une telle souplesse dans les calculs, ces derniers reposant sur une approche du maximum de vraisemblance. Les données suivant une loi binomiale ou de Poisson sont analysées sur le modèle mixte généralisé suivant la Macro-procédure GLIMMIX (équivalent à MIXED pour les données ne suivant pas une Normale) du logiciel SAS (Littell et al., 1996). Pour les deux procédures, les tests de significativité pour les effets fixes sont basés sur une statistique F. Pour les effets aléatoires, les tests sont basés sur les rapports de vraisemblance entre sous-modèles, lesquels suivent de manière asymptotique une distribution du χ^2 (Littell et al., 1996).

5.2 Inférences statistiques pour analyses phénotypiques

5.2.1 Taux d'éclosion

La proportion du nombre d'embryons développés 24 heures a.f. (= taux d'éclosion) a été traitée comme donnée binomiale en utilisant une fonction de lien logistique (logit). Dans la

définition du modèle linéaire généralisé, ce lien permet de passer de l'intervalle [0,1] à la droite réelle entière.

$$\text{Logit (taux d'éclosion)} = \log(\text{taux d'éclosion}/(1-\text{taux d'éclosion}))$$

La variation du taux de fécondation entre mâles et entre femelles a été testée en ajustant un modèle prenant en compte de ces deux effets ainsi que leur interaction.

Modèle : $\text{Logit (taux d'éclosion)} = \text{m\^ale} + \text{femelle} + \text{r\^eplicat} + \text{m\^ale*femelle} + \text{m\^ale*r\^eplicat} + \text{femelle*r\^eplicat} + \text{m\^ale*femelle*r\^eplicat} + \text{r\^esiduelle}$

5.2.2 Analyses de covariance

La taille des larves ainsi que leur coefficient de variation ont été analysés comme données normales (normalité préalablement testée via le test de Shapiro-Wilk). La taille de population (ou survie) (= nombre de larves comptées à chaque jour de filtration) a été analysée comme donnée de type Poisson en utilisant une fonction de lien log. Dans un premier temps, les données collectées sur l'ensemble de la durée d'élevage larvaire ont été étudiées avec le *temps* en covariable, le *traitement* et le *réplicat* (imbriqué dans le *traitement* que l'on peut simplifier par la notation : *réplicat / traitement*) (ainsi que les interactions associées) comme variables. Il s'agit donc d'une analyse de co-variance (ANCOVA) visant à mettre en évidence s'il en est, un premier effet global du *traitement* sur l'ensemble de la durée d'élevage (*traitement*temps*).

Modèle : $\text{Log (...)} = \text{traitement} + \text{temps} + \text{r\^eplicat (traitement)} + \text{traitement*temps} + \text{temps*r\^eplicat(traitement)} + \text{r\^esiduelle}$

5.2.3 Analyses de variance

Par la suite, pour chaque date d'échantillonnage, des analyses de variance ont été effectuées avec le *traitement* et *réplicat / traitement* comme variable. L'objectif ici est de préciser la date d'apparition de différence significative entre conditions (*traitement*).

Modèle : $\text{Log (...)} = \text{traitement} + \text{r\^eplicat (traitement)} + \text{r\^esiduelle}$

5.3 Inférences statistiques pour analyses génotypiques

Les contributions parentales (basées sur des valeurs corrigées par les taux d'éclosion différentiels) des larves pédivéligères échantillonnées ont été examinées comme données suivant une loi de Poisson en utilisant une fonction de lien log. D'abord, un modèle complet a été établi avec le *temps* en covariable et les différents effets suivants : *traitement*, *réplicat/traitement*, *mâle*, *femelle* et interactions attenantes.

Modèle : $\text{Log}(\text{contribution}) = \text{m\^a\^l}e + \text{femelle} + \text{temps} + \text{traitement} + \text{r\^e}p\text{l}\text{i}c\text{a}t(\text{traitement}) + \text{temps} * \text{traitement} + \text{temps} * \text{femelle} + \text{temps} * \text{m\^a\^l}e + \text{m\^a\^l}e * \text{traitement} + \text{femelle} * \text{traitement} + \text{temps} * \text{r\^e}p\text{l}\text{i}c\text{a}t(\text{traitement}) + \text{femelle} * \text{r\^e}p\text{l}\text{i}c\text{a}t(\text{traitement}) + \text{m\^a\^l}e * \text{r\^e}p\text{l}\text{i}c\text{a}t(\text{traitement}) + \text{temps} * \text{traitement} * \text{femelle} + \text{temps} * \text{traitement} * \text{m\^a\^l}e + \text{temps} * \text{m\^a\^l}e * \text{r\^e}p\text{l}\text{i}c\text{a}t(\text{traitement}) + \text{temps} * \text{femelle} * \text{r\^e}p\text{l}\text{i}c\text{a}t(\text{traitement}) + \text{temps} * \text{m\^a\^l}e * \text{femelle} + \text{temps} * \text{m\^a\^l}e * \text{femelle} * \text{traitement} + \text{temps} * \text{m\^a\^l}e * \text{femelle} * \text{r\^e}p\text{l}\text{i}c\text{a}t(\text{traitement}) + \text{r\^e}s\text{i}d\text{u}e\text{l}\text{l}e$

Ensuite, des sous-modèles ont été construits afin de se focaliser sur les composantes *temps* et *traitement*. Le premier sous-modèle insiste sur l'influence du tamisage en tenant compte des données de contributions parentales à chaque date d'échantillonnage. Le second souligne l'effet temporel en considérant les contributions pour chaque condition d'élevage au travers du temps.

5.4 "Taille efficace" de population

La "taille efficace" de population a été calculée d'après les données de contribution des fractions de larves pédivéligères échantillonnées. La formule utilisée est issue de Robertson (1961)

$$N_e = (\sum n_{ij})^2 / \sum n_{ij}^2$$

où n_{ij} est le nombre observé de descendants issus du mâle i et de la femelle j dans un échantillon donné.

III. Résultats

1. Développement larvaire

1.1 Taux d'éclosion

Pour les mâles, les taux moyens d'éclosion, estimés comme la proportion d'embryons développés 24 heures a.f., sont compris entre $64,1 \pm 32,4\%$ et $69,9 \pm 33,5\%$ et ne sont pas significativement différents ($\chi^2 = 0$; $p = 0,99$).

Entre femelles, la variation du taux est plus importante puisque la première femelle affiche un taux de $25,3 \pm 5,8\%$, la seconde de $94,8 \pm 2,9\%$ et la troisième de $82,5 \pm 6,9\%$. Comme attendu d'après ces valeurs, les taux d'éclosion entre femelles sont significativement différents ($\chi^2 = 67,0$; $p < 0,001$).

De surcroît, l'interaction *mâle*femelle* n'est pas significative ($\chi^2 = 0$; $p = 0,99$). Par conséquent, seuls les taux d'éclosion entre femelles sont statistiquement différents. Cette donnée, relative à la qualité initiale des gamètes sera prise en compte dans l'estimation ultérieure du succès reproducteur au travers des contributions parentales.

1.2 Caractères larvaires

Les mailles de tamis utilisées au cours de l'élevage, la longueur moyenne des larves (et le coefficient de variation relatif), la taille de population moyenne (ou survie= % larves par rapport au nombre après 24 heures), ainsi que le pourcentage de larves éliminées par tamisage (= intensité d'élimination) sont présentés dans le tableau 10. Dans la mesure où aucun effet *réplicat* n'a pu être mis en évidence d'un point de vue statistique pour les caractères étudiés (taille, $\chi^2 = 2,1$; $p = 0,18$; coefficient de variation, $\chi^2 = 1,1$; $p = 0,29$; et survie, $\chi^2 = 2,3$; $p = 0,13$), les données relatives à ces réplicats ont été regroupées.

La procédure progressive de tamisage sélectif a abouti à une réduction moyenne de la taille de population d'environ 50% (pourcentage cumulé sur l'ensemble de l'élevage, dernière colonne du tableau 10) si l'on se base sur le témoin dont la mortalité n'est pas due au tamisage. Conséquence de cette pratique sélective, la proportion de larves restantes 17 jours a.f. est de $46,8 \pm 9,2\%$ pour le témoin contre $30,5 \pm 5,3\%$ pour la condition avec tamisage. A partir de ces résultats, il est possible de déduire que le pourcentage de mortalité "spontanée" (c'est-à-dire non due au tamisage) est de 14,2% ($= (30,5 / 0,5) - 46,8$) plus important dans la condition témoin après 17 jours. Ceci repose sur le postulat que dans la condition "tamisage", considérant 50% d'élimination, 61,1% de larves devraient être présentes 17 jours a.f.

Tableau 10 : Caractères larvaires suivis à chaque date d'échantillonnage pour les deux conditions.

Jour	Vide de maille (μm)		Longueur maximale moyenne \pm S.E. (μm)		Coefficient de variation		% larves / nombre initial après 24h \pm S.E.		Intensité d'élimination (%)
	(1) témoin	(2) sélection	(1) témoin	(2) sélection	(1) témoin	(2) sélection	(1) témoin	(2) sélection	
1	45	45	75,9 \pm 2,3	75,4 \pm 2,2	3,0	3,0	100	100	/
3	45	45	85,6 \pm 2,9	85,5 \pm 2,9	3,4	3,4	85,1 \pm 12,6	81,2 \pm 4,0	/
6	45	60	113,9 \pm 6,6	113,3 \pm 6,6	5,8	5,9	67,3 \pm 12,0	69,2 \pm 8,9	4 \pm 1
8	45	85	129,1 \pm 9,1	130,1 \pm 6,9	7,1	5,3	59,6 \pm 13,8	58,4 \pm 1,1	9 \pm 2
10	60	110	158,6 \pm 13,8	163,8 \pm 11,5	8,7	7,0	55,5 \pm 10,3	56,4 \pm 0,9	3 \pm 1
13	60	150	204,1 \pm 29,3	222,7 \pm 16,7	14,4	7,5	57,2 \pm 11,8	43,3 \pm 4,2	18 \pm 3
15	60	180	233,6 \pm 32,0	257,7 \pm 18,1	13,7	7,0	49,3 \pm 11,7	32,0 \pm 0,4	16 \pm 6
17	60	180	250,8 \pm 29,6	275,2 \pm 19,9	11,8	7,3	46,8 \pm 9,2	30,5 \pm 5,3	0

(signifiant aussi que cette fraction de larves éliminées par tamisage ne serait pas morte “spontanément” à cette date si elle n’avait pas été éliminée).

En conséquence, l’effet du *traitement* (tamisage) est fortement significatif sur la décroissance de la taille de population dans le temps (*traitement*temps*, $\chi^2 = 44,5$; $p < 0,001$), résultat ANCOVA). Les analyses complémentaires à chaque date d’échantillonnage montrent que la taille de population diffère significativement entre traitements à partir du 13^{ème} jour d’élevage ($F = 17,3$; $p < 0,001$).

Cette sélection sur la taille a également un effet sur la croissance larvaire moyenne (*traitement*temps*, $\chi^2 = 427,2$; $p < 0,001$) et sur le coefficient de variation des longueurs moyennes (*traitement*temps*, $\chi^2 = 14,7$, $p < 0,001$) calculés sur l’ensemble de l’élevage. Les ANOVAs réalisées aux différentes dates de filtration montrent que le coefficient de variation des longueurs moyennes diffère entre traitements à partir du 10^{ème} jour d’élevage ($F = 12,6$; $p < 0,001$), même chose pour la taille des larves mais à partir du 13^{ème} jour ($F = 12,5$; $p < 0,001$). La taille moyenne larvaire qui en résulte est de $222,7 \pm 16,7$ μm (coefficient de variation = 7,5%) pour la condition sélective contre $204,1 \pm 29,3$ μm (coefficient de variation = 14,4%) pour le témoin (tableau 10)

Pour les deux conditions, les premières larves pédivéligères apparaissent 20 jours a.f.. La mortalité larvaire reste négligeable après cette date dans tous les bacs. Dans les bacs avec tamisage, les larves ont atteint le stade pédivéligère dans le temps moyen de 21 jours a.f. contre 24 jours a.f. pour les larves des bacs témoins.

En accord avec la tendance observée pour le coefficient de variation sur la taille (figure 9 A), le tamisage sélectif mène à définir une fenêtre temporelle de fixation plus courte (5 jours contre 11 ; figure 9 B). D’autre part, les trois premiers jours de fixation représentent environ 89% des larves pédivéligères pour la condition sélective. Pour le témoin, les effectifs de larves arrivant à fixation suivent un schéma beaucoup plus progressif, étalé sur une durée plus longue.

Le nombre total moyen de larves atteignant le stade pédivéligère est logiquement plus faible avec tamisage (164 860 contre 240 000). Cependant, le nombre relatif de larves présentes le premier jour qui atteignent ce stade est plus élevé (61,1% contre 48,8%). Finalement, le succès à la métamorphose est aussi plus élevé en condition de tamisage ($61,8 \pm 3,9\%$ contre $48,6 \pm 16,0\%$), menant à un nombre de juvéniles quasi-équivalent entre les conditions dix jours après fixation (figure 10).

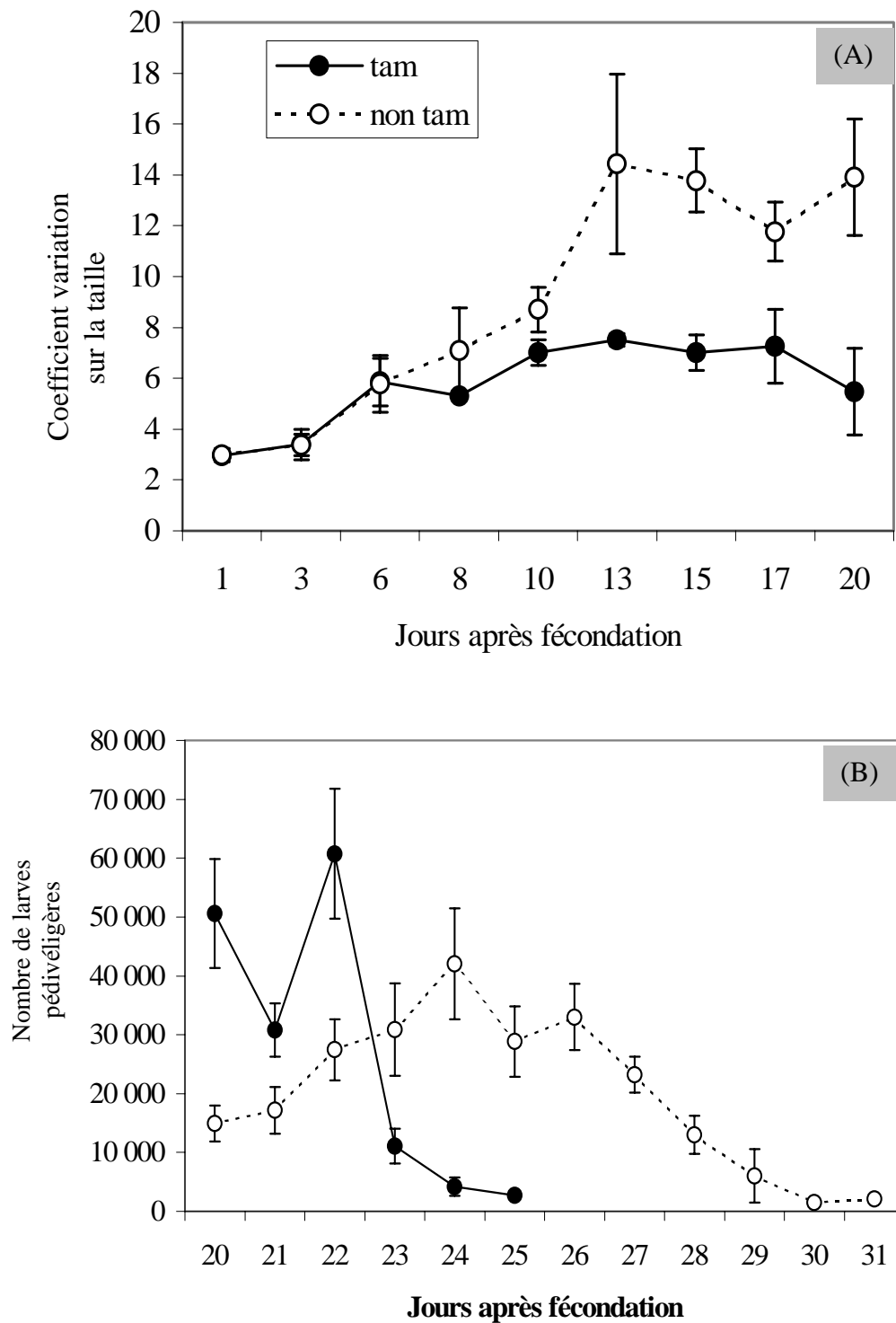


Figure 9 : Effets phénotypiques du tamisage : (A) effets sur l'évolution des coefficients de variation des diamètres maximums mesurés au cours de l'élevage larvaire, (B) effets sur les effectifs de larves pédivéligères.

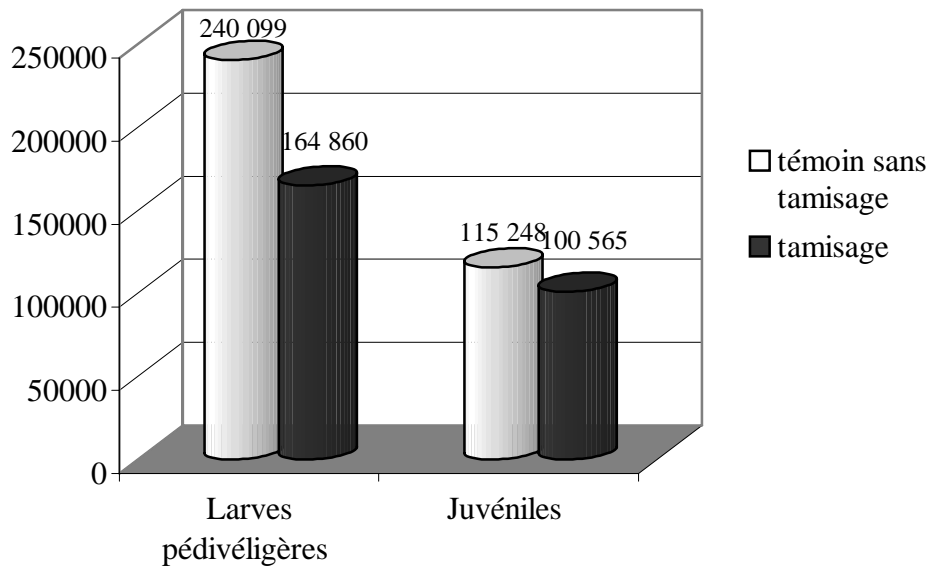


Figure 10 : Effectifs comparés du nombre moyen de larves pédivéligères et de larves après métamorphose pour les deux conditions.

2. Contributions parentales : diversité génétique des cohortes de fixation

L'ensemble de l'échantillonnage pour analyse des contributions parentales représente 1440 larves. En effet, 96 larves par réplicat de chaque condition ont été génotypées et ce pour trois dates : 20, 25 et 28 jours a.f.. Ainsi 90% des larves ont été assignées à un couple parental (tableau 11). Les génotypes complets des 13 parents sont récapitulés dans le tableau 12. Ce tableau est suivi d'une illustration visuelle des électrophérogrammes obtenus sur lesquels se base l'assignation de parenté (figure 11).

Il est à noter que les dates correspondants aux derniers jours de fixation (30 et 31) pour le témoin ont aussi été échantillonnées. Il n'a pas été possible d'amplifier ces prélèvements, en cause, un problème de conservation des larves dans l'éthanol.

Tableau 11 : Pourcentage d'assignation de parenté pour les trois dates échantillonnées (entre parenthèse le nombre larves assignées sur le nombre de larves génotypées).

	20 ^{ème} jour a.f.	25 ^{ème} jour a.f.	28 ^{ème} jour a.f.
Lots tamisés	88,54% (256/288)	90,28% (260/288)	94,79% (273/288)
Lots non tamisés	94,09% (271/288)	81,94% (236/288)	

Tableau 12 : Génotypes aux trois loci des 13 parents à l'origine des croisements.

	CG49	L10	CG108
femelle_2	161/165	152/161	130/152
femelle_3	128/140	132/177	120/131
femelle_1	157/163	142/165	121/127
mâle_1	136/149	134/146	125/131
mâle_2	132/159	130/159	120/145
mâle_3	136/145	138/159	125/144
mâle_4	153/163	177/179	148/153
mâle_5	142/155	142/144	132/145
mâle_6	138/145	118/144	117/127
mâle_7	161/165	146/157	132/155
mâle_8	138/157	138/157	129/138
mâle_9	138/192	120/134	123/138
mâle_10	136/149	112/130	130/134

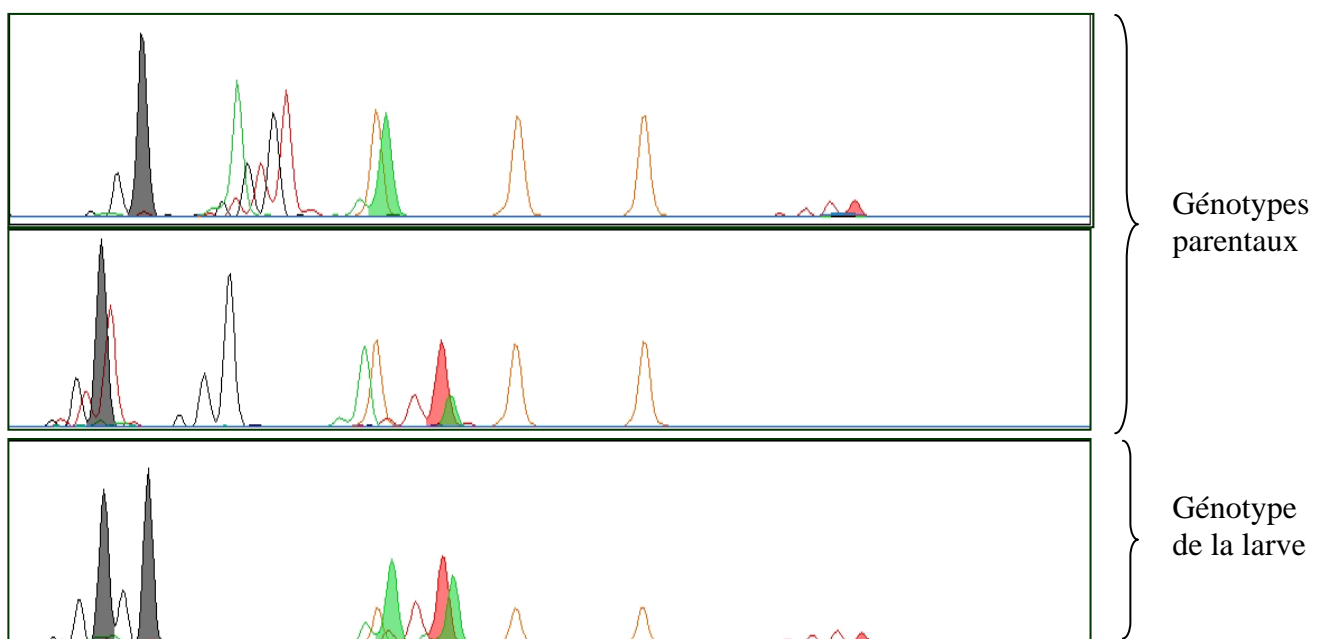


Figure 11 : Exemple d'assignation de parenté sur la base des allèles portés par les larves et le couple de géniteurs potentiels (en abscisse, les tailles d'allèles en nombre de base). A chaque couleur correspond un locus ; les pics en couleur pleine sont partagés par la larve et les parents (la ligne orange correspond à un marqueur de taille référent).

La structuration temporelle des contributions maternelles et paternelles (20, 25 et 28 a.f.) est représentée en figure 12.

L'analyse statistique de cette figure est donnée par les tableaux 13, 14, 15 et 16. Toutes ces analyses sont basées sur des valeurs corrigées par les taux d'éclosion différentiels (notamment entre femelles). Là encore, l'effet *réplicat* n'a pu être mis en évidence, de façon simple ou en interaction dans le modèle complet. Les valeurs de réplicat ont donc été groupées. Le tableau 13 détaille les résultats du modèle complet. Au travers des effets significatifs d'interaction *mâle*temps* et *femelle*temps* (respectivement $\chi^2 = 28,6$; $p < 0,001$ et $\chi^2 = 17,7$; $p < 0,001$), les contributions parentales ont une évolution significative dans le temps. D'après la triple interaction significative *mâle*temps*traitement* ($\chi^2 = 4,7$; $p = 0,03$), chaque contribution paternelle évolue différemment dans le temps et selon les conditions de tamisage. D'autre part, les effets *mâle* et *femelle* sont significatifs (respectivement $\chi^2 = 32,3$; $p < 0,001$ et $\chi^2 = 10,3$; $p = 0,001$). Des modèles sous-jacents permettent de spécifier les effets soulignés par le modèle complet. Ainsi, le tableau 14 résume les résultats du sous-modèle se focalisant sur l'**effet traitement** entrevu dans le modèle complet, en tenant compte des données de contribution indépendamment à chaque date d'échantillonnage. Au 20^{ème} jour a.f., les interactions *mâle*traitement* et *femelle*traitement* ne sont pas significatives ($\chi^2 = 1,3$; $p = 0,25$; $\chi^2 = 3,2$; $p = 0,07$). Autrement dit, à cette date, le tamisage n'a pas d'effet significatif sur les contributions. A contrario, au 25^{ème} jour a.f., le tamisage a un effet sur les contributions paternelles (*mâle* × *traitement*, $\chi^2 = 5,8$; $p = 0,016$).

En ligne avec ces résultats, le tableau 15 spécifie l'**effet parental** à l'intérieur de chaque condition pour chacune des trois dates. Ainsi au 20^{ème} jour a.f., que ce soit en condition de tamisage sélectif ou pour le témoin, il existe une différence significative entre contributions paternelles ($\chi^2 = 16,7$; $p < 0,001$ en condition tamisage ; $\chi^2 = 8,3$; $p < 0,004$ pour le témoin) et maternelles ($\chi^2 = 30,3$; $p < 0,001$ en condition tamisage ; *female* $\chi^2 = 4,2$; $p < 0,04$ pour le témoin). Pour le 25^{ème} jour a.f., le différentiel de contributions précédemment décrit disparaît, pour laisser place à une relative homogénéisation des valeurs. Le tableau 16, qui s'intéresse à la mise en évidence d'**effet temporel**, confirme le modèle complet, révélant une évolution significative des contributions dans le temps, montrée au travers des interactions significatives *temps*mâles* pour les deux traitements.

Tableau 13 : résultats du modèle global (GLIMMIX) incluant tous les effets.

<i>Effets fixes</i>		valeur de F	Pr>F
Traitement		0,0	0,98
Jour		1,1	0,49
<i>Effets aléatoires</i>		Chi ²	valeur de P
Jour x Mâle x Femelle x Traitement		10,4	0,001 ***
Jour x Traitement x Mâle		4,7	0,030 *
Jour x Traitement x Femelle		0,0	1,000
Traitement x Mâle		1,6	0,206
Traitement x Femelle		0,0	1,000
Mâle x Femelle		8,9	0,003 **
Jour x Mâle		32,1	0,000 ***
Jour x Femelle		14,3	0,000 ***
Jour x Traitement		0,1	0,752
Mâle		32,3	0,000 ***
Femelle		10,3	0,001 ***

Tableau 14 : résultats du sous-modèle (GLIMMIX) focalisé sur l'effet traitement (tamisage) en tenant compte des données de contributions parentales data indépendamment à chaque date d'échantillonnage.

	Jour 20		Jour 25	
	valeur de F	Pr>F	valeur de F	Pr>F
Traitement	0,23	0,67	0,15	0,73
	Chi ²	valeur de P	Chi ²	valeur de P
Traitement x Mâle x Femelle	7,1	0,008 **	3,3	0,069
Mâle x Traitement	1,3	0,254 ns	5,8	0,016 *
Femelle x Traitement	3,2	0,07	~0	0,99
Mâle x Femelle	37,2	<0,001 ***	~0	0,99
Mâle	28,6	<0,001 ***	20,4	<0,001 ***
Femelle	10,4	0,001 **	41,1	<0,001 ***

Tableau 15 : résultats du sous-modèle (GLIMMIX) focalisé sur les effets mâle et femelle pour les deux conditions d'élevage à chaque date d'échantillonnage.

		Jour 20		Jour 25		Jour 28	
		Chi ²	valeur de P	Chi ²	valeur de P	Chi ²	valeur de P
Tamisage	Mâle	16,7	<0,001 ***	274	<0,001 ***	-----	-----
	Femelle	30,3	<0,001 ***	1,1	0,294	-----	-----
Témoin	Mâle	8,3	0,004 **	~0	0,99	17,9	<0,001 ***
	Femelle	4,2	0,04 *	1,6	0,206	~0	0,99

Tableau 16 : résultats du sous-modèle (GLIMMIX) focalisé sur l'effet temporel considérant les contributions pour les deux conditions d'élevage au cours du temps.

	Tamisage		Témoin	
	valeur de F	Pr>F	valeur de F	Pr>F
Temps	0,43	0,57	0,64	0,57
	Chi ²	valeur de P	Chi ²	valeur de P
Temps x Mâle x Femelle	10,5	0,001	12,5	<0,001 ***
Mâle x Temps	29,9	<0,001 ***	6,6	0,01 **
Femelle x Temps	3,3	0,069	20,6	<0,001 ***
Male x Femelle	7,1	0,008 **	0	0,99
Mâle	9,2	0,002 **	17,8	<0,001 ***
Femelle	0,1	0,752	6,6	0,01 **

3. Taille efficace de population

L'évolution temporelle des cohortes de fixation, estimée par la taille efficace de population relative à la valeur initiale de fécondation est reportée dans la figure 13. En effet, ce 'Ne' a été initialement pondéré en fonction des taux d'éclosion. Trente familles ont été produites dans l'expérience. Idéalement, chaque couple possède un taux d'éclosion égal. Hors, le calcul de ces derniers a montré une inégalité entre femelles. En réalité, la somme des pourcentages d'éclosion de chaque couple est égale à 2026 au lieu de 3000 si tous les taux avaient été de 100%.

Au 20^{ème} jour a.f., la taille efficace de population atteint seulement $31,3 \pm 12,4\%$ et $40,6 \pm 4,5\%$ de la valeur initiale de référence, respectivement pour le témoin et la condition sélective. Au 25^{ème} jour a.f., la valeur de Ne augmente jusqu'à $75,2 \pm 6,4\%$ pour l'élevage sans tamisage contre $56,5 \pm 10,9\%$ avec tamisage. Au dernier point d'échantillonnage, seul le témoin reste, affichant une valeur de l'ordre de la précédente date ($78,3 \pm 7,8\%$).

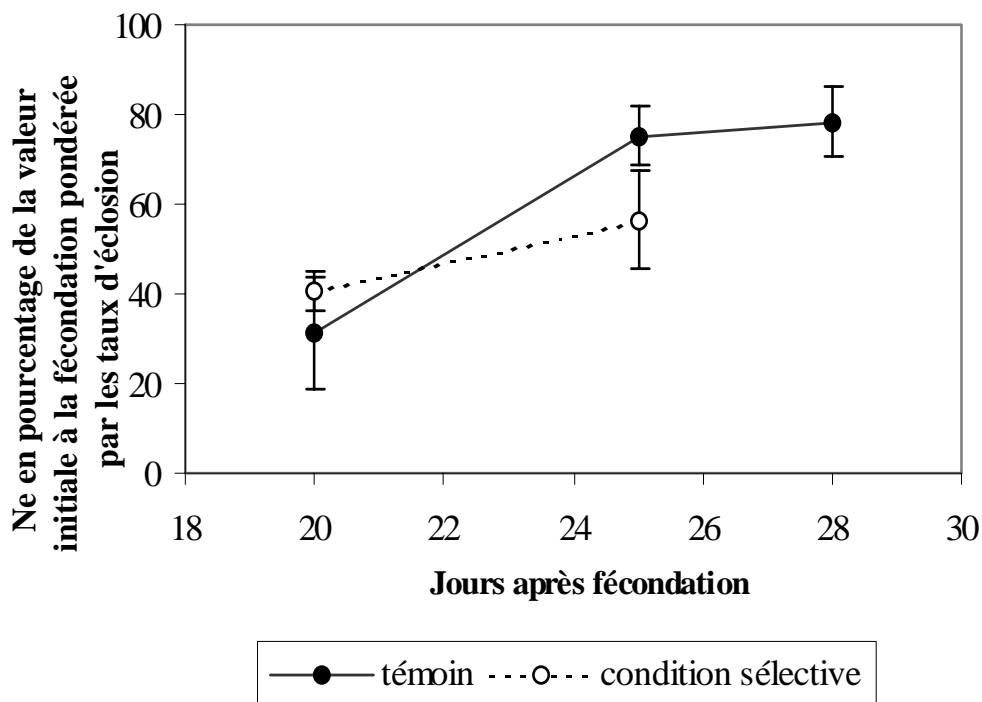


Figure 13 : Effets génétiques du tamisage : évolution de l'effectif efficace, exprimé en pourcentage de la valeur initiale à la fécondation.

IV. Discussion

1. Assignation de parenté

Le développement de marqueurs moléculaires hypervariables, tels que les microsatellites utilisés lors d'analyse de parenté au sein de populations naturelles ou expérimentales, se généralise en aquaculture (Jerry et al., 2004). Au cours de cette expérience, le multiplexage « trois loci » décrit dans le chapitre 1 a été utilisé. Au final, 90% des 1440 larves échantillonnées ont été assignées sans ambiguïté à un couple de parents. D'une manière générale, les 10% restants ne sont pas liés à la méthode d'assignation mais plutôt aux étapes précédentes, depuis la conservation des larves jusqu'à l'électrophorèse des produits PCR.

La conservation des larves dans l'éthanol est essentielle. L'éthanol 70 a été choisi pour notre étude, l'éthanol 100 ayant été écarté au cours d'essais préliminaires, ce dernier n'offrait pas la même garantie de résultat. Cependant, même en utilisant l'éthanol 70, les dernières cohortes de fixation pour la condition sans tamisage n'ont pu être amplifiées (jour 30 et 31).

Il se peut également que l'ADN ne soit pas accessible quand l'étape d'écrasement de la coquille de la larve n'a pas été correctement effectuée. Ensuite, lors de la mesure des larves et de leur individualisation, une erreur de manipulation peut avoir pour conséquence l'absence de larves dans le tube donnant *a posteriori* un électrophérogramme vierge. Une autre cause possible est un mauvais alignement ou une absence de marqueur de taille sur l'électrophérogramme qui le rend illisible.

Par ailleurs, la quantité d'ADN total contenu dans une larve d'huître est relativement faible et se situe souvent juste en limite de détection des méthodes de quantification employées (dosage par spectrométrie). La technique d'extraction mise au point en parallèle du multiplexage, conçue pour allier efficacité, rapidité et moindre coût, ne permet parfois pas de s'affranchir des contaminations protéiques. Il peut alors être difficile de catégoriser un allèle lorsque sa faible intensité est confondue avec le bruit de fond inhérent à l'électrophorèse.

La présence d'allèles nuls (allèles non détectés en PCR dus à une mutation dans la séquence homologue de l'amorce) a été rapportée chez *C. gigas* (Mc Goldrick et al., 2000 ; Huvet et al., 2004). Les géniteurs utilisés pour le croisement, ont été choisis de manière à être hétérozygotes, les allèles nuls ne sont pas, *a priori*, présents dans la descendance étudiée.

Le pourcentage d'assignation obtenu atteint 90%. Comparé aux études ayant utilisé une démarche similaire de familles en mélange puis de reconstruction rétrospective de parenté

(tableau 2), ce pourcentage est élevé, d'autant plus si l'on considère la difficulté d'extraction des larves.

2. Conséquences du tamisage sélectif

Du fait d'une forte fécondité, le nombre de gamètes des bivalves n'est généralement pas un facteur limitant dans la production de naissain en écloserie. Aussi, compte tenu du caractère aléatoire des taux d'éclosion et de la survie larvaire, le nombre initial d'embryons fécondés est souvent largement supérieur au besoin de production. D'où une pratique d'élimination des larves qui consiste à réduire leur densité au cours de l'élevage (Lipovsky, 1984 ; Loosanoff & Davis, 1963). Autre aspect pour lequel le tamisage est également préconisé, l'élimination des particules susceptibles de « pourrir » le milieu comme les coquilles de larves mortes. Enfin, conserver les larves ayant la croissance la plus rapide permet de réduire considérablement le temps d'élevage et semble s'inscrire dans une démarche volontaire de sélection afin d'améliorer les stocks sur le critère croissance (Losee, 1979). Pour toutes ces raisons, l'élimination des plus petites larves par tamisage est une pratique courante en écloserie commerciale. Cependant, l'impact de cette sélection artificielle d'un point de vue phénotypique et génétique restait inexploré.

2.1 Aspects phénotypiques

L'effet d'une élimination progressive des individus les plus petits sur la moyenne et le coefficient de variation des tailles de larves dépend de la variation existante entre individus et de sa stabilité dans le temps. Contrairement aux stades plus tardifs (e.g. Boudry et al., 2003b), le phénomène est peu documenté, le marquage physique direct des larves étant impossible. Si, au cours de la période de développement larvaire, la performance de croissance individuelle varie beaucoup entre individus dans le temps, l'élimination des plus petits individus n'affectera que peu la moyenne et la variation de ce caractère dans la population. Dans l'expérience que nous avons menée, l'élimination de 50% des larves a conduit à une augmentation de la moyenne des tailles de 24,4 μm (+9,7%) par rapport à la condition "témoin" et à une diminution de son coefficient de variation de 11,8 à 7,3 (soit -38,1%) au 17^{ième} jour. Il apparaît alors que la sélection sur la taille a un effet plus important sur la variabilité des tailles de larves, homogénéisant ces dernières, que sur la croissance moyenne larvaire. Cette prépondérance de l'effet sur la variabilité plus que sur la moyenne était déjà

observée pour les jours 13 et 15 (respectivement +9,1% contre -47,9% et +10,3 contre -48,9%). Il est également remarquable qu'une différence dans les coefficients de variation sur la taille entre les deux conditions, soit présente dès le 10^{ième} jour, lorsque la sélection est relativement faible et malgré une différence entre les vides de maille déjà importante (60 contre 110 μ m). Un effet significatif entre les moyennes de taille des deux conditions n'est observé qu'un peu plus tard, soit à partir du 13^{ième} jour après fécondation. Dans les bacs soumis à sélection artificielle, le coefficient de variation de la taille cesse d'augmenter au 10^{ième} jour, atteignant une valeur maximale de 7,5. A l'opposé, dans les bacs sans tamisage, le coefficient de variation augmente considérablement jusqu'au 13^{ième} jour (valeur de 14,4) pour ensuite se stabiliser.

Autre effet important de la sélection sur la taille, la fenêtre temporelle d'apparition des larves pédivéligères est plus réduite et plus précoce. Comme pour la croissance larvaire, l'impact sur la variabilité dans la date de mise à fixation (5 contre 11 jours) est plus important que sur sa moyenne (date moyenne de fixation établie à 21 jours contre 24, soit +14%).

Les larves à croissance lente atteignant le stade de fixation plus tardivement que celles à croissance rapide, la variabilité dans la croissance larvaire et le timing d'apparition des pédivéligères sont directement reliés. Ceci semble démontrer que, due à la forte variabilité dans le rythme de croissance, une sélection faible à modérée sur la taille en phase larvaire peut avoir un effet très important sur la variabilité de taille et la fenêtre temporelle de fixation, et un effet moindre sur les moyennes.

La densité de population peut se révéler être un facteur prépondérant, ayant une influence négative sur la survie et la croissance d'organismes (pour revue, voir Rodriguez-Muñoz et al., 2003). Dans notre expérience, la nourriture a été distribuée de façon à ce qu'elle soit toujours en excès par rapport au besoin des larves. Ainsi, on peut penser que les effets densité dépendant sont négligeables. Ceci est conforté par le fait que les premières larves pédivéligères apparaissent à la même date pour les deux conditions.

Bien que 50% des larves aient été éliminées en condition sélective, le nombre de juvéniles après fixation n'est réduit que de 15% par rapport au témoin. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de définir un ratio optimal d'élimination, qui pourrait à la fois minimiser la perte relative de naissain et maximiser la réduction de variabilité dans la fenêtre temporelle de fixation. La répétabilité des résultats présentés ici reste également à démontrer.

D'un point de vue phénotypique, les résultats suggèrent que le tamisage sélectif des petites larves en éclosion soit une procédure permettant un gain de temps, puisque aboutissant à une

réduction de production limitée, due à une meilleure survie relative et un meilleur succès à la fixation des larves à croissance rapide.

2.2 Aspects génétiques

Suivre la variabilité génétique des stocks d'écloserie et maintenir cette variabilité au cours des cycles d'élevage sont deux points fondamentaux pour une gestion d'écloserie réussie (Primmer et al., 1999). Les facteurs génétiques déterminent (partiellement) la valeur sélective ("fitness") et l'adaptabilité des organismes (Taniguchi, 2003). Maintenir un large panel de génotypes assure à une population d'écloserie une flexibilité dans sa réponse aux changements environnementaux et reste donc important dans un contexte de sélection et d'amélioration génétique à moyen et long terme. Une variabilité génétique réduite dans les stocks d'écloserie a souvent été décrite pour les mollusques (Gosling, 1982 ; Wada, 1986 ; Dillon & Manzi, 1987 ; Hedgecock & Sly, 1990 ; Paynter & DiMichele, 1990 ; Vrijenhoek et al., 1990 ; Gaffney et al., 1992 ; Durand et al., 1993). Il a été montré qu'une forte fécondité combinée à une forte variabilité du succès reproducteur pouvait aboutir à une importante dérive génétique (Boudry et al., 2002). Notre jeu de données ne nous permet pas d'estimer directement l'impact global du tamisage sélectif sur la diversité génétique. Cependant, les résultats montrent que l'élimination des plus petites larves a un effet significatif sur la variabilité génétique des cohortes de larves prêtes à se fixer.

Premièrement, les larves échantillonnées dans les bacs des deux conditions d'élevage présentent des contributions parentales relatives similaires au 20^{ième} jour après fécondation (= premier jour de fixation) mais pas au 25^{ième}. Deuxièmement, avec ou sans tamisage, les contributions parentales sont plus équilibrées pour les cohortes tardives que précoces. En conséquence, l'impact génétique du tamisage sélectif semble agir au travers de son effet sur la fenêtre temporelle de fixation. Cela illustre clairement l'importance des cohortes tardives pour minimiser les effets de dérive génétique dans les stocks d'écloserie. Ce constat confirme les travaux de Laing & Earl (1998) qui proposent un maintien de l'ensemble de la population larvaire pour la production de naissain. Pour ces auteurs, les cohortes tardives méritent attention puisqu'elles fournissent un naissain de qualité acceptable. Notre étude montre que ces cohortes sont importantes afin de minimiser la variabilité du succès reproducteur et de fait, de maximiser la variabilité génétique des stocks.

Le tamisage tel qu'il est pratiqué en écloserie peut également avoir un effet génétique direct en sélectionnant des génotypes à croissance rapide en stade larvaire. Ces aspects ont

jusque là rarement été évoqués dans la littérature. Ernande et al. (2003) ont étudié la variabilité génétique ainsi que les corrélations génétiques pour des caractères d'histoire de vie précoces chez *C. gigas*. D'après ces auteurs, le polymorphisme génétique semble être défini entre deux stratégies extrêmes ayant une base génétique : taux de croissance larvaires et tailles élevées à la métamorphose mais faibles succès à la métamorphose, croissance et survie après fixation *contre* taux de croissance larvaires plus faibles, fixations tardives (plus petites tailles) mais succès à la métamorphose, croissance et survie supérieurs après fixation. Ceci implique que la sélection sur la taille par élimination des plus petites pourrait réduire le succès de fixation, la croissance et la survie post-métamorphose. Toutefois, Newkirk et al. (1977) pour *C. virginica* et Collet et al. (1999) pour *C. gigas* ont montré l'existence d'une corrélation phénotypique positive entre la croissance larvaire et post-larvaire. Nos résultats appuient également l'existence d'une corrélation phénotypique positive entre croissance larvaire, survie et succès à la fixation, et montrent qu'une variabilité génétique existe pour ces caractères chez *C. gigas*. D'autres études sont nécessaires à la validation des corrélations génétiques observées par Ernande et al. (2003), et si tel est le cas, à l'étude des mécanismes responsables pour leur réciproque au niveau phénotypique. Des comparaisons de caractères de stades de développement précoces entre stocks issus de domestication et de populations sauvages pourraient aider à déterminer l'existence d'une sélection différentielle en éclosion commerciale.

Bilan-synthèse

✓ Ce second chapitre consacré au tamisage sélectif aboutit à un double enseignement dont les significations peuvent être divergentes.

✓ A l'échelle phénotypique, le tamisage se justifie puisque assurant un gain de temps dans la production, les larves ainsi sélectionnées ayant de meilleures survies par rapport au reste de la population larvaire. En ce sens, nos résultats appuient l'existence d'une corrélation phénotypique positive entre croissance larvaire, survie et succès à la fixation.

✓ A l'échelle génotypique, ces données supportent l'hypothèse qu'il existe une composante génétique significative aux caractères de développement larvaire (croissance, temps à la fixation...).

Par ailleurs l'effet significatif sur la variabilité génétique des cohortes de larves prêtes à se fixer, ne semble pas plaider en faveur d'une pratique de tamisage sélectif. Les larves à croissance rapide, arrivant donc précocément à l'étape de fixation présentent une variabilité génétique moindre. Les larves qui arrivent "plus" tardivement à fixation (= larves éliminées par le tamisage) sont également importantes afin de minimiser la variabilité du succès reproducteur et de fait, de maximiser la variabilité génétique des stocks.

CHAPITRE 3

**EFFETS ENVIRONNEMENTAUX : Polymorphisme
génétique et phénotypique de caractères larvaires sous influence de la
température**

I. Introduction

L'environnement peut avoir une influence directe sur les paramètres génétiques quantitatifs qui sous-tendent les traits d'histoire de vie (Sgrò & Hoffmann, 2004). Les voies métaboliques et de développement sont influencées à différents degrés par l'environnement (Lynch & Walsh, 1998). Les conséquences de l'environnement sur la variance phénotypique peuvent être subtiles et complexes, particulièrement si l'on considère le cas où un même génotype peut répondre différemment en fonction de l'environnement auquel il est confronté (on parle alors d'interaction Génotype x Environnement). L'ensemble des phénotypes produits par un génotype donné dans différentes conditions d'environnement est alors défini comme la norme de réaction du génotype (Falconer & Mackay, 1996). La variation dans les normes de réaction parmi les génotypes peut mener à des interactions entre facteurs environnementaux et génétiques considérables. Ainsi, les différences phénotypiques entre variants génotypiques peuvent ne pas être identiques d'un environnement à l'autre.

Pour des espèces aquacoles, on peut aisément imaginer la difficulté de prédire l'expression phénotypique de descendants en condition artificielle, lesquels peuvent être issus de parents dont la filiation est inconnue. Chez *Crassostrea gigas*, les traits d'histoire de vie (notamment ceux associés à la phase larvaire) sont connus pour avoir une base génétique suggérant qu'ils puissent être modifiés par sélection (Ernande et al., 2003). Le stade larvaire peut aussi largement être influencé par l'environnement et plus particulièrement par le facteur température (Gosling, 2003 ; Helm et al., 2004). Souvent étudié au même titre que la salinité (Kinne, 1963), la température semble cependant avoir une influence prépondérante (Hoegh-Guldberg & Pearse, 1995) ayant une implication plus ou moins directe dans la régulation du rythme de développement, la durée de la phase pélagique ainsi que la mortalité larvaire de bon nombre d'invertébrés benthiques marins (Aldana-Aranda et al., 2001). Pour la majorité des animaux ectothermes, la température affecte surtout la croissance (Stillwell & Fox 2005).

De nombreuses études ont porté sur l'étude des réponses phénotypiques face à la température aux différents stades de vie de *C. gigas* (Calabrese & Davis, 1970 ; His et al., 1989 ; Millican & Helm, 1973 ; Abdel-Hamid et al., 1992 ; Helm & Millican, 1977 ; Shpigel et al., 1992 ; Flores-Vergara et al., 2004 ; Helm et al., 2004). Les travaux plus précisément dédiés au stade larvaire se sont attachés à définir les conditions thermiques optimales de développement. Selon ces dernières, l'optimum de développement larvaire est observé pour des températures comprises entre 25 et 30°C (associées à une salinité de 25‰ et 30‰). En éclosion commerciale, les températures utilisées sont généralement constantes et supérieures

à 25°C. Elles contrastent de fait avec les températures relevées en milieu naturel, inférieures et plus variables (exemple d'une station de prélèvement localisée en zone « est » du Bassin d'Arcachon où entre 1987 et 2003, les températures moyennes sur la période de développement larvaire ont fluctué entre 21 et 23°C (à l'exception de l'année 2003 où une température moyenne de 26,2°C a été relevée), Auby & Maurer, 2004).

Aucun travail n'a été mis en œuvre afin d'étudier l'effet de la température sur le développement précoce via une approche assistée par marqueurs en laboratoire. Cette approche est une opportunité unique afin d'examiner la réponse génétique (plasticité phénotypique) face à un facteur environnemental comme la température.

Ernande et al. (2003) ont montré qu'il existait une composante génétique aux variations de survie et de croissance larvaire et des corrélations génétiques négatives entre taux de développement larvaire et succès à la métamorphose, permettant la coexistence de différentes stratégies de développement précoce. L'influence des conditions environnementales (en particulier la température) sur ce polymorphisme, son expression phénotypique et d'éventuelles interactions génotype - environnement restait inconnue.

Dans ce chapitre, nous présentons une expérience dont l'objectif est la compréhension de l'influence des conditions de température sur le développement des larves (et donc la production de naissain) en comparant la diversité génétique de populations de larves élevées en conditions intensives (~26°C) et extensives (~20°C). L'expérience, comme la précédente (effet sélectif du tamisage), repose sur un croisement factoriel impliquant cette fois 4 femelles et 12 mâles, dont les génotypes microsatellites sont choisis afin de maximiser l'assignation parentale rétrospective. A l'identique, les paramètres « survie » et « croissance » ont été suivis. Des prélèvements aux stades larvaire et post-larvaire pour analyse génotypique ont également été pratiqués au cours de l'élevage. Les individus génotypés ont été mesurés donnant ainsi accès à des données individuelles de croissance.

Les données ainsi recueillies ont pour objectif d'étudier la réponse phénotypique et génétique (approche assistée par marqueurs) des descendants des différentes familles (48) pour la survie et la croissance en fonction de la température.

Cette expérience s'inscrit, à l'image de l'étude sur l'effet du tamisage, dans une compréhension globale des pressions sélectives afin, à moyen terme, de pouvoir intégrer les résultats dans l'optimisation (en terme génétique) des pratiques de reproduction en éclosion.

II. Matériel et méthodes

1. Reproduction

1.1 Choix des géniteurs

Sur un ensemble de 200 individus adultes issus de reproduction en milieu naturel (Port des Barques, Charente-Maritime), une sélection a été effectuée en vue de conserver des mâles et des femelles présentant un maximum d'hétérozygotie afin de faciliter l'assignation de parenté. Ces 200 huîtres ont été sexées et génotypées aux 3 loci microsatellites utilisés dans cette étude. La méthode de sélection est la même que celle utilisée pour l'expérience du chapitre précédent. Les individus sélectionnés ont été placés dans un raceway alimenté par de l'eau de mer filtrée et maintenus dans des conditions trophiques et de température optimales, dans l'attente de leur maturation sexuelle durant environ 2 mois.

1.2 Obtention des gamètes

Les gamètes ont été obtenus par stripping ou scarification de la gonade. A l'aide d'un scalpel, la gonade est dilacérée et rincée à l'eau de mer afin de récupérer les gamètes. Ainsi, gamètes mâles et femelles ont été récupérés séparément puis filtrés sur un tamis de 25 μ m pour les mâles et de 60 μ m pour les femelles. Enfin, un comptage pour déterminer la concentration optimale de gamètes à utiliser lors de la fécondation a été effectué. Ce comptage a été réalisé grâce à des cellules de Malassez pour les ovocytes et de Thoma pour les spermatozoïdes (assisté par le logiciel IPS de l'analyse d'images SAMBA™).

1.3 Fécondation

Le nombre d'ovocytes souhaité a été mis en suspension dans de l'eau de mer (objectif : obtenir 15 millions de larves dans chaque bac d'élevage, soit une densité de 100 larves/ml). Cette concentration élevée a été maintenue pour faciliter le rapprochement des gamètes pendant les premières minutes suivant la fécondation. Puis, la quantité de suspension de sperme nécessaire pour avoir un ratio de 100 spermatozoïdes par ovocyte a été ajoutée. Un croisement factoriel avec 12 mâles et 4 femelles a été réalisé. Les 48 croisements ont été effectués séparément dans des béciers de 500ml, évitant la compétition spermatique. Les embryons n'ont été mélangés que 3 heures après la fécondation constituant ainsi des familles en mélange.

Afin de déterminer le taux d'éclosion, trois prélèvements post-fécondation pour chaque croisement ont été réalisés à 24 h et chacun des prélèvements a été compté trois fois. Ce taux est déterminé par le ratio Nombre de larves / Nombre total d'ovocytes.

2. Elevage larvaire

Une fois mélangés et homogénéisés, les embryons ont été répartis de manière égale dans 6 jarres contenant 150 litres d'eau de mer filtrée (1µm). Trois jarres (ou répliquats) ont été placées dans une salle à 20°C, et les trois autres placées dans une autre salle à 26°C. La température de l'eau a été maintenue constante par chauffage de l'air ambiant dans les salles. Le régime alimentaire distribué était composé d'un mélange de trois algues phytoplanctoniques habituellement utilisées dans le cadre des élevages au sein de l'écloserie de La Tremblade. Il s'agit d'une ration journalière évolutive au cours de l'élevage (tableau 17).

Tableau 17 : Description de la ration alimentaire distribuée.

Phase d'élevage	Espèces d'algues distribuées (nb de Cellules/mL/j)			Volume distribué par espèce (en L)	Diamètre des larves d'huîtres (µm)
	<i>Isochrysis tahiti</i>	<i>Chaetoceros calcitrans forma pumilum</i>	<i>Gracilis galbana</i>		
1- Jour1 à J6	18	25	16	0,34/ 0,125/ 0,19	40
2- J7 à J12	20	26	12	1,7/ 0,76/ 0,97	110
3- J13 à Fin	20	25	18	2,6/ 1,315/ 1,82	210

Au bout des 24h d'incubation, les larves ont été récupérées sur un tamis de maille de 45µm, rincées à l'eau de mer filtrée puis remises en suspension dans une éprouvette pour réaliser un échantillonnage (par bac : mesure du diamètre maximum de 100 larves et estimation par comptage sous binoculaire du nombre total de larves). A cette même date, pour tous les lots, la densité larvaire a été ramenée à 10 larves/ml. La remise en eau a ensuite été effectuée à 26°C ou 20°C selon la salle d'élevage. Pour la suite de l'élevage, une filtration identique à celle précédemment décrite a été réalisée tous les 2-3 jours (avec mesure et comptage). Une maille de tamis non sélective a été maintenue afin de retenir le maximum de variabilité phénotypique.

Sur l'ensemble de la période d'élevage larvaire, la température de l'eau a régulièrement été relevée afin de maintenir une différence de température d'au moins 6°C entre les salles d'élevage.

Quelques jours avant la fin de la phase larvaire, les larves sont dites pédivéligères et mesurent environ 300µm. Lorsqu'elles ont atteint ce stade, la fraction de la population retenue sur un tamis de 220µm a été placée en micro-nurserie pour fixation. Les larves ont été alors disposées dans des tamis de 150µm, dont le fond est tapissé de microbrisure de coquilles d'huîtres, constituant un substrat adéquat pour la fixation.

Chaque cohorte quotidienne de fixation a été ainsi dirigée vers la micro-nurserie et disposée dans des tamis avec un effectif maximal de 50 000 individus par tamis. Ces tamis ont été disposés dans des raceways dont l'alimentation est assurée par un flux continu d'eau de mer filtrée et enrichie en phytoplancton (conditions identiques pour toutes les cohortes, issues de l'élevage à 20 ou à 26°C).

Environ 10 jours après la fixation, une estimation de l'effectif du naissain a été réalisée. Une règle de trois a été réalisée à partir du poids total de la cohorte et du poids moyen de 3 échantillons dont les effectifs ont été mesurés. Enfin, l'ensemble des cohortes a été réduit à un effectif de 5 000 individus par tamis. En comparant le nombre de juvéniles fixés au nombre de larves placées en micro-nurserie, le succès à la métamorphose a pu être calculé.

L'ensemble des paramètres phénotypiques suivis au cours de l'élevage larvaire et de la période de micronursage peut être résumé comme suit (figure 14) :

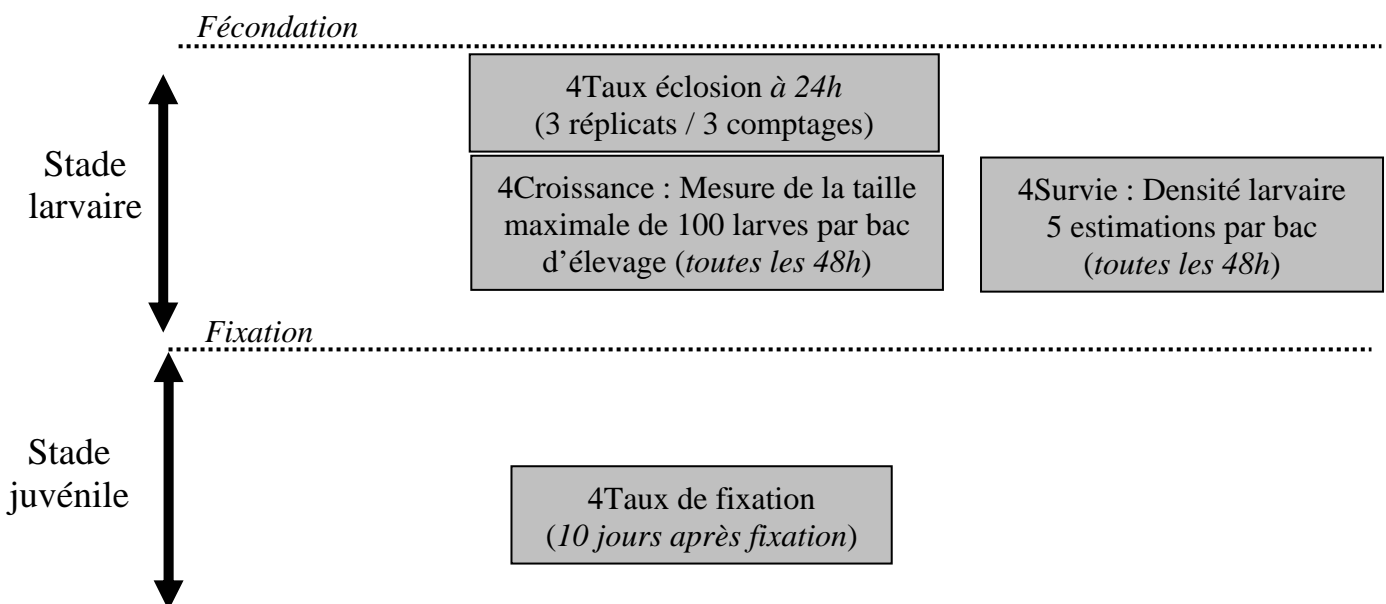


Figure 14 : Ensemble des données phénotypiques larvaires recueillies.

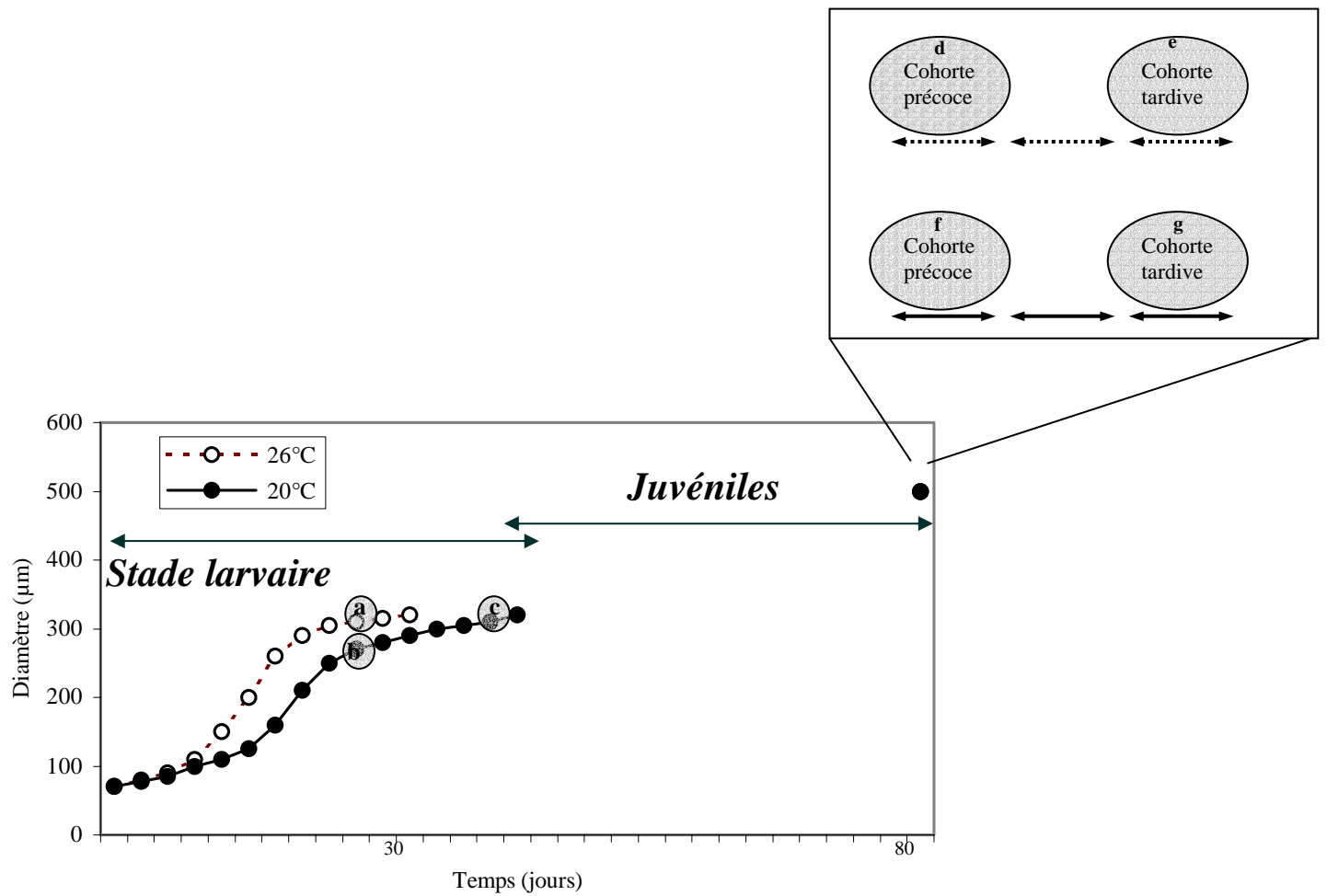


Figure 15 : Récapitulatif des points d'échantillonnage pour mesure et génotypage individuel (en grisé) : 3 au stade larvaire (a,b,c) et 4 au stade juvénile (d,e,f,g) (80 jours après fécondation, chaque cohorte correspondant à 3 jours de fixation).

3. Mesures individuelles de larves et de juvéniles

En plus de l'ensemble des mesures précédemment décrites, des larves ont été prélevées pour analyses de parenté. Trois points d'échantillonnage ont été effectués en phase larvaire. Pour chacun des trois bacs dont l'eau a été maintenue à 26°C, 288 larves de la première cohorte de larves pédivéligères (prêtes à se fixer) ont été mesurées (taille maximale) et génotypées pour les trois marqueurs microsatellites. A la même date, de façon identique, 288 larves issues de chacun des trois bacs à 20°C ont aussi été analysées. Enfin, un troisième point de prélèvement (toujours 288 larves), encore pour les larves élevées à 20°C a été réalisé correspondant à la première cohorte de larves pédivéligères de cette condition.

Techniquement, ces larves ont été individualisées à l'aide d'une pipette puis mesurées précisément (dixième de micron) grâce à un projecteur de profil (Nikon) équipé de vis micrométriques. Ensuite, elles ont été placées dans 3µL d'éthanol à 70%, en attente de l'extraction de l'ADN.

Par ailleurs, les larves fixées quotidiennement ont été regroupées (1 groupe correspondant à 3 jours de fixation) pour des raisons logistiques. Ainsi nous avons disposé de 3 cohortes pour chaque condition (fenêtre de fixation d'environ 9 jours). Un échantillonnage 80 jours après fécondation a été réalisé pour les groupes extrêmes, soit les cohortes correspondant aux 3 premiers et 3 derniers jours de fixation. Cet échantillonnage comprend la mesure de la longueur maximale de coquille des juvéniles ainsi qu'un prélèvement de branchie pour génotypage. La figure 15 ci-contre récapitule l'ensemble des points d'échantillonnage en phase larvaire et post-larvaire. Au total, 2592 larves et 1152 juvéniles ont été mesurés puis génotypés.

4. Analyses de données

4.1 Inférences statistiques pour analyses phénotypiques

4.1.1 Taux d'éclosion

La proportion du nombre d'embryon développé 24 heures a.f. (après fécondation) (= taux d'éclosion) a été traitée comme donnée binomiale en utilisant une fonction de lien logistique (logit).

$$\text{Logit (taux d'éclosion)} = \log(\text{taux d'éclosion}/(1-\text{taux d'éclosion}))$$

La variation du taux de fécondation entre mâles et entre femelles a été testée en ajustant un modèle prenant en compte de ces deux effets ainsi que leur interaction.

Modèle : $\text{Logit}(\text{taux d'éclosion}) = \text{m\^a\^l}e + \text{femelle} + \text{r\^e}p\text{l}i\text{c}a\text{t} + \text{m\^a\^l}e * \text{femelle} + \text{m\^a\^l}e * \text{r\^e}p\text{l}i\text{c}a\text{t} + \text{femelle} * \text{r\^e}p\text{l}i\text{c}a\text{t} + \text{m\^a\^l}e * \text{femelle} * \text{r\^e}p\text{l}i\text{c}a\text{t} + \text{r\^e}s\text{i}d\text{u}e\text{l}\text{l}e$

4.1.2 Taille des larves et taille de population

La taille des larves a été analysée comme donnée normale (normalité préalablement testée via le test de Shapiro-Wilk). La taille de population ou survie (= nombre de larves comptées à chaque jour de filtration) a été analysée comme données de type Poisson en utilisant une fonction de lien log. Les données collectées sur l'ensemble de la durée d'élevage larvaire ont d'abord été étudiées avec le *temps* en covariable, le *traitement* et *réplicat* (imbriqué dans le *traitement* que l'on peut simplifier par la notation : *réplicat / traitement*) (ainsi que les interactions associées) comme variables. Il s'agit donc d'une analyse de co-variance visant à mettre en évidence s'il en est, un premier effet global du *traitement* sur l'ensemble de la durée d'élevage (*traitement*temps*).

Modèle : $\text{Log}(\dots) = \text{traitement} + \text{temps} + \text{r\^e}p\text{l}i\text{c}a\text{t}(\text{traitement}) + \text{traitement} * \text{temps} + \text{temps} * \text{r\^e}p\text{l}i\text{c}a\text{t}(\text{traitement}) + \text{r\^e}s\text{i}d\text{u}e\text{l}\text{l}e$

Par la suite, pour chaque date d'échantillonnage, des analyses de variance ont été effectuées avec le *traitement* et *réplicat / traitement* comme variable. L'objectif ici est de préciser la date d'apparition de différence significative entre conditions de température (*traitement*).

Modèle : $\text{Log}(\dots) = \text{traitement} + \text{r\^e}p\text{l}i\text{c}a\text{t}(\text{traitement}) + \text{r\^e}s\text{i}d\text{u}e\text{l}\text{l}e$

4.2 Inférences statistiques pour analyses génotypiques

Pour les 7 points d'échantillonnage réalisés (figure 15), les paramètres étudiés ont été : contribution parentale et taille. Afin d'étudier les différences de contribution entre conditions et leur évolution dans le temps, nous avons utilisé la macro GLIMMIX de SAS. Concernant les données individuelles de taille, la procédure MIXED de SAS a également été mise en oeuvre.

(1998). Le lien entre variances du modèle et variances génétiques est décrit au travers des formules suivantes :

$$\begin{aligned}\sigma^2 s &= \frac{1}{4}\sigma^2 A \\ \sigma^2 d &= \frac{1}{4}\sigma^2 A + \sigma^2 m \\ \sigma^2 d*s &= \frac{1}{4}\sigma^2 D \\ \sigma^2 s*E &= \frac{1}{4}\sigma^2 GxE/A \\ \sigma^2 d*E &= \frac{1}{4}\sigma^2 GxE/A + \sigma^2 GxE/m \\ \sigma^2 s*d*E &= \frac{1}{4}\sigma^2 GxE/D\end{aligned}$$

où $\sigma^2 s$ = variance mâle
 $\sigma^2 d$ = variance femelle
 $\sigma^2 A$ = variance génétique additive
 $\sigma^2 m$ = variance due aux effets maternels
 $\sigma^2 D$ = variance génétique de dominance.

L'héritabilité au sens strict (h^2_{ns}) de la croissance larvaire a ainsi été calculée selon la formule suivante :

$$h^2(ns) = 4 \sigma^2 s / \sigma^2 P(\text{variance phénotypique})$$

L'écart-type a été déterminé par la formule de Becker (1984). L'héritabilité de la croissance larvaire a été estimée aux trois points d'échantillonnage précédemment décrits.

4.2.2 Juvéniles

Pour étudier les points d'échantillonnage concernant les juvéniles (80 jours après fécondation), les mêmes modèles que précédemment décrits ont été utilisés. Ainsi deux types de comparaisons ont été effectuées : entre cohortes précoces et tardives pour une même condition de température et entre conditions de température pour les cohortes précoces et tardives. Ceci a été réalisé pour les mesures individuelles (via la Proc MIXED) et les données de contribution (via la Macro GLIMMIX de SAS).

4.2.3 Larves/juvéniles

Là encore, la même démarche statistique a été mise en œuvre, dans le but cette fois-ci de comparer sur la base des données de mesure individuelle et de contribution, les échantillons de larves des premières fixations avec les échantillons juvéniles des cohortes précoces.

III. Résultats

1. Données phénotypiques

1.1 Taux d'éclosion

Une fois le comptage réalisé, les résultats obtenus sont les suivants (voir figure 16) : pour les mâles, les taux d'éclosion sont compris entre 66,2% et 75,8% et pour les femelles, entre 27,8% et 84,4%.

Parmi les quatre femelles, une présente un taux d'éclosion largement inférieur ($27,7 \pm 8,2\%$). Ceci est confirmé par l'analyse statistique ($\chi^2=947,7$; $p<0,001$). De même, il existe une différence significative entre les mâles ($\chi^2=64,4$; $p<0,001$) et entre les familles ($\chi^2=24,6$; $p<0,001$).

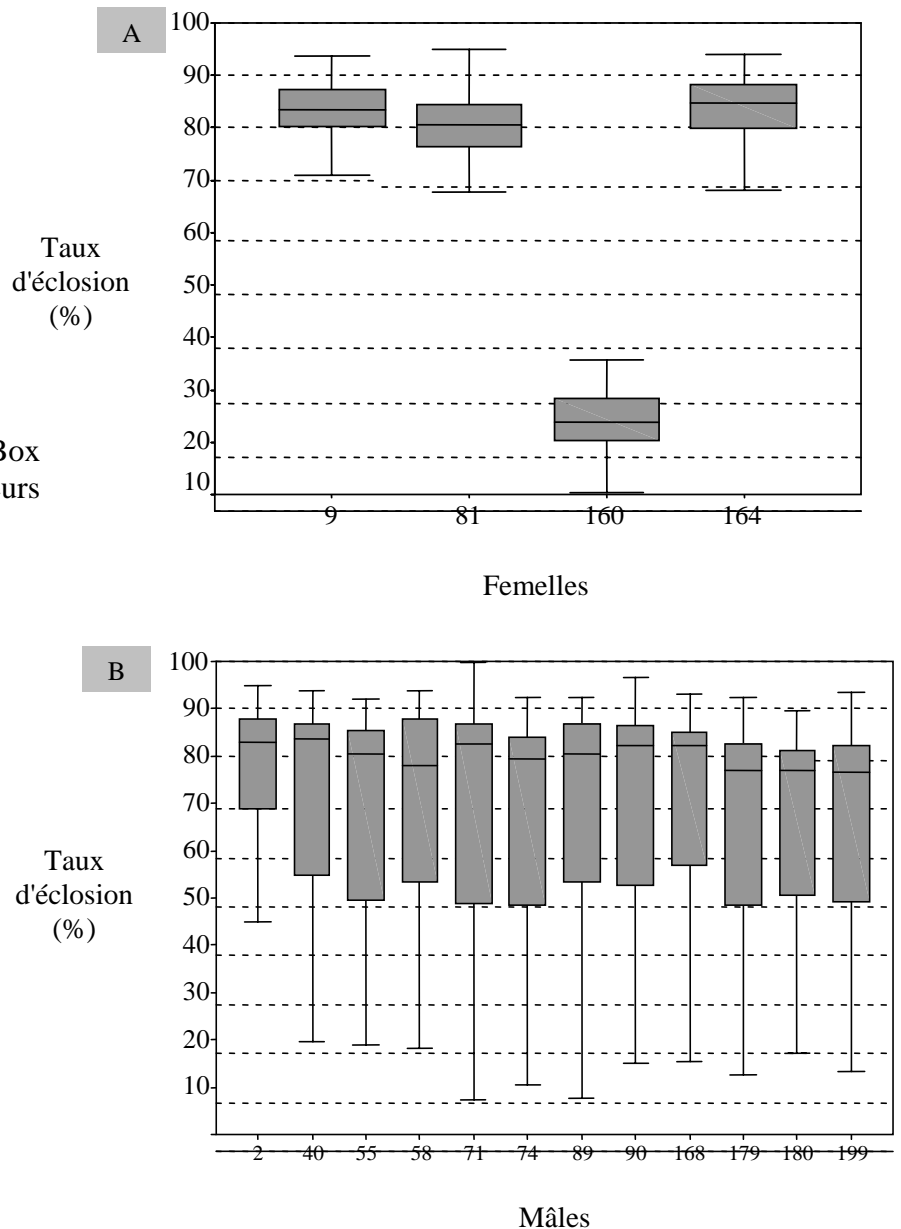


Figure 16 : Représentations en Box plots des taux d'éclosion des géniteurs (A. femelles, B. mâles).

1.2 Caractères larvaires

1.2.1 Croissance larvaire

Dès le premier jour d'élevage, la température influence de manière significative le taux de croissance larvaire ($F=182,8$; $p<0,001$). Durant l'élevage, le diamètre moyen des larves placées à 26°C a toujours été supérieur à celui des larves placées à 20°C (figure 17). Cela est confirmé par l'analyse de covariance. En effet, il existe un effet significatif du traitement sur le taux de croissance larvaire pour l'ensemble de la période d'élevage (*traitement*temps*, $\chi^2 = 401,4$; $p < 0,001$). Sur la figure 17, les tracés de différents lots (réplicats) ne sont pas groupés par condition de température, l'effet réplikat étant significatif ($\chi^2 = 942,8$; $p < 0,001$).

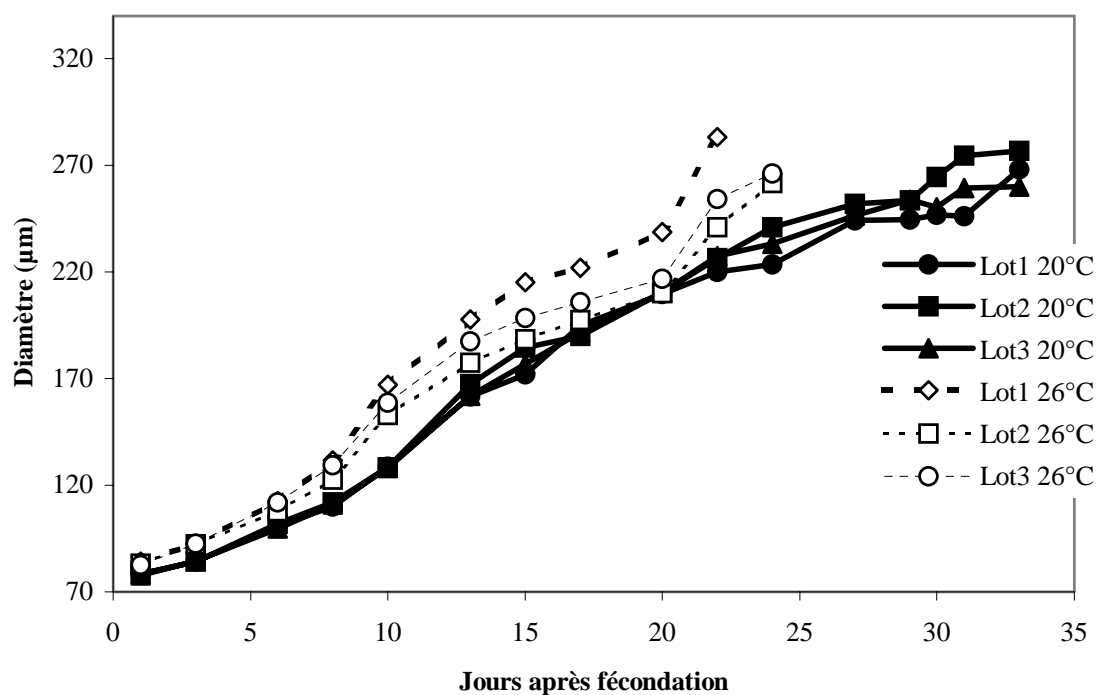


Figure 17 : Evolution du diamètre maximum des larves par réplikat selon chaque condition (en pointillés, les bacs maintenus à 26°C ; en trait plein, ceux à 20°C).

1.2.2 Taille de population et taux de fixation

L'effet du *traitement* (température) est significatif sur la taille de population pour l'ensemble de la durée d'élevage ((*traitement*temps*, $\chi^2 = 8,1$; $p = 0,004$), résultat ANCOVA). Cependant, il existe une forte variabilité entre lots (effet *réplicat*, $\chi^2 = 22,1$; $p < 0,001$), modérant de fait l'interprétation statistique. La figure 18 permet de suivre la décroissance des effectifs de larves. La variabilité entre lots d'une même condition est remarquable et explique la significativité de l'effet *réplicat*. L'analyse de variance effectuée pour chaque date d'échantillonnage ne permet pas de conclure clairement à propos d'un effet de la température sur la taille de population tant les effets répliqués sont également significatifs.

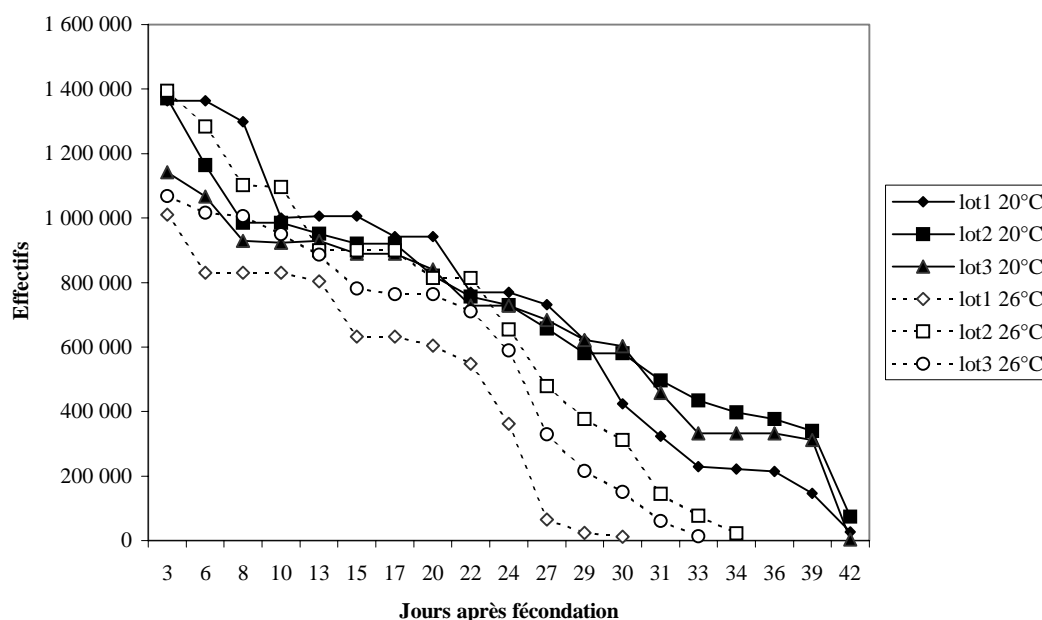


Figure 18 : Evolution de la taille de population par répliquat selon chaque condition (en pointillé, les bacs maintenus à 26°C, en trait plein ceux à 20°C).

A 26°C, les premières cohortes de larves pédivéligères sont apparues au 23^{ème} jour d'élevage. La fenêtre temporelle de fixation s'est étendue sur 9 jours selon les lots. Nous avons groupé l'ensemble de larves mises en fixation en 3 cohortes de 3 jours. Les premières pédivéligères à 20°C ne sont apparues que 33 jours après fécondation. Pour chaque lot, 9 jours de mise à fixation ont également été observés (divisés également en 3 cohortes de 3 jours).

Pour la condition 26°C, $44,0 \pm 4,8\%$ des larves présentes 3 jours après fécondation ont été mises en fixation, contre $5,4 \pm 4,2\%$ pour la condition 20°C.

A 26°C, le taux moyen de fixation (sur l'ensemble des trois cohortes temporelles) est de $38,1 \pm 6,0$ %. Ces taux sont relativement stables d'une cohorte à l'autre (figure 19). A 20°C, le taux moyen est de $6,8 \pm 5,2$. Cette fois-ci, il existe une tendance à la décroissance dans le temps puisque la cohorte précoce présente un taux de $10,3 \pm 9,0$ et la cohorte tardive de $1,9 \pm 1,2$.

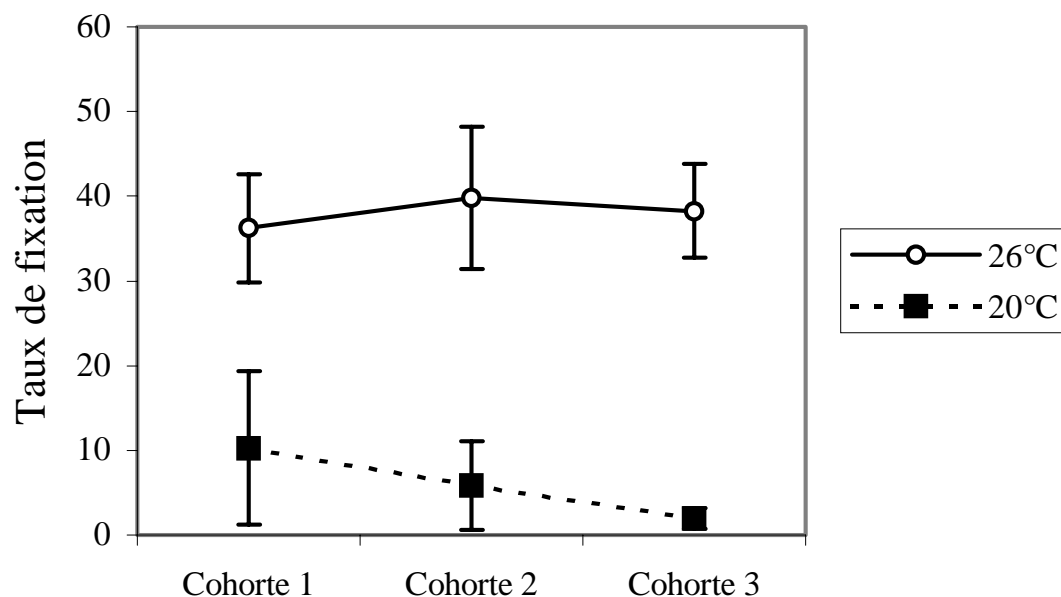


Figure 19 : Taux de fixation moyens pour les cohortes temporelles mises en micronurserie selon chaque condition, chaque cohorte correspond à 3 jours (en pointillés, les bacs maintenus à 26°C ; en trait plein, ceux à 20°C).

2. Données génétiques individuelles

2.1 Génotypage et assignation (génotypes parentaux en tableau 18)

Sur les 2592 larves et 1152 juvéniles, respectivement 2073 et 737 ont été génotypés et assignés sans ambiguïté à un couple de parents (80% et 64% d'assignation).

Tableau 18 : Génotypes aux trois loci des 16 parents à l'origine des croisements.

	CG49	L10	CG108
femelle-81	161/196	133/163	154/161
femelle154	128/159	117/172	123/146
femelle-9	137/145	138/156	139/150
femelle-164	145/184	136/145	125/141
mâle-168	126/148	112/172	125/141
mâle-199	159/173	127/170	125/177
mâle-90	132/140	131/147	119/150
mâle-74	132/142	120/171	133/146
mâle-179	167/176	125/129	117/151
mâle-71	152/167	126/137	131/153
mâle-2	145/147	129/163	135/149
mâle-180	155/176	148/188	125/135
mâle-40	142/167	145/145	131/138
mâle-89	136/165	115/135	127/163
mâle-55	145/165	141/152	133/141
mâle-58	145/192	143/154	127/135

2.2 Points d'échantillonnage en phase larvaire

2.2.1 Données de contribution

Les figures 20 et 21 (ci-contre) fournissent une première information quant à l'évolution des contributions individuelles au travers des points échantillonnés en phase larvaire. Ces figures représentent le différentiel des contributions parentales entre valeurs observées et valeurs attendues corrigées en fonction des taux d'éclosion calculés un jour après fécondation. Concernant la figure 20 (contributions maternelles), à l'exception des contributions de la femelle 160, l'observé diffère de l'attendu. De cela, il résulte une différence significative entre les contributions femelles de chacun des trois points (J22-20°C : $\chi^2 = 92,3$; $p < 0,001$; J30-20°C : $\chi^2 = 54,8$; $p < 0,001$; J22-26°C : $\chi^2 = 68,1$; $p < 0,001$). A noter que les données ont été groupées entre bacs (réplicats) faute d'effet significatif. Une autre tendance remarquable est la similitude d'évolution entre valeurs de contributions aux points J22 26°C et J30 20°C. Le troisième point semble se distinguer des deux autres (notamment au travers des contributions des femelles 81 et 9). La tendance observée en figure 21, (contributions paternelles) est plus complexe à décrypter compte tenu du nombre plus important de mâles impliqués dans le croisement initial. Cependant, les mâles 40 et 90 se différencient largement des autres pour le point J22-20°C ($\chi^2 = 83,8$; $p < 0,001$), présentant des valeurs de contributions bien supérieures à l'attendu. La tendance visuelle de ces figures, selon laquelle les contributions des points pré-métamorphoses sont proches (isolant de fait le point J22-20°C), est conforté par l'analyse statistique (figure 22). Cette figure résume les principaux effets (mâle et femelle) tirés de l'analyse complète des modèles statistiques (les tableaux des tests complets sont reportés en annexe 4.2). Les contributions (mâles et femelles) sont distinctes pour le point J22-20°C des deux autres (comparaison J22-20°C vs J22-26°C : mâles*traitement $\chi^2=22,8$; $p<0,001$, femelles*traitement $\chi^2=8,6$; $p<0,001$; comparaison J22-20°C vs J30-20°C : mâles*traitement $\chi^2=39,6$; $p<0,001$, femelles*traitement $\chi^2=8,2$; $p<0,001$). Les deux échantillons précédant la phase de fixation sont beaucoup plus proches en terme de contribution (mâles*traitement $\chi^2=4,1$; $p<0,04$, femelles*traitement $\chi^2=0$; ns).

Figure 20 : Différentiel des contributions maternelles entre valeurs observées et attendues en fonction des taux d'éclosion

No=contribution observée
Na=contribution attendue

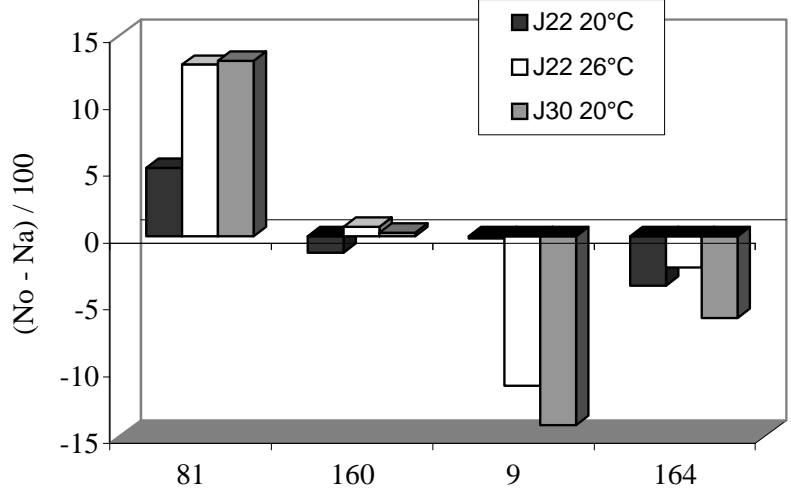


Figure 21 : Différentiel des contributions paternelles entre valeurs observées et attendues en fonction des taux d'éclosion

No=contribution observée
Na=contribution attendue

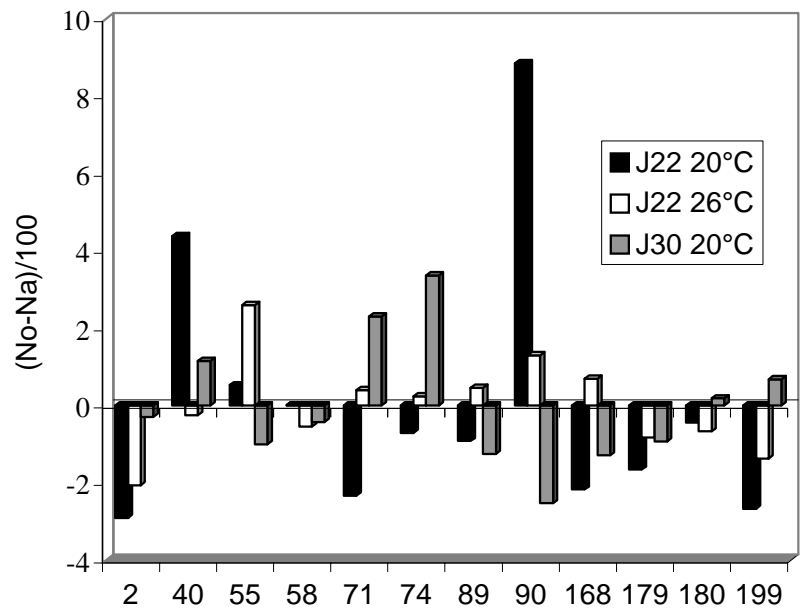
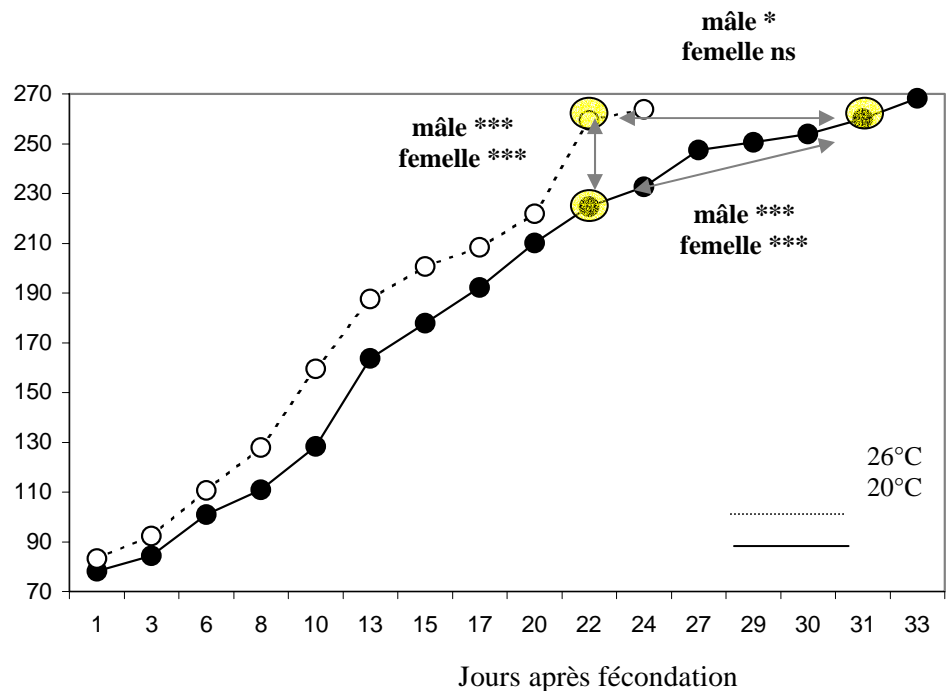


Figure 22 : Comparaison statistique des valeurs de contributions parentales (mâle et femelle) entre points de prélèvements au stade larvaire



2.2.2 Données de croissance

A l'instar de la figure 22, la figure 23 résume les principaux effets d'intérêt (mâles et femelles) issus des comparaisons statistiques des valeurs individuelles de taille de larves génotypées (tableaux complets en annexe 4.1). Comme pour les valeurs statistiques des contributions, il n'existe pas de différence entre les points précédents la phase de fixation dans les deux conditions (mâles*traitement $\chi^2 = 0,1$; $p = 0,75$, femelles*traitement $\chi^2 = 3$; $p = 0,08$; annexe 4.1.2). Autrement dit, il n'y a pas de réarrangements majeurs dans les rangs des familles suivant ces deux points. A contrario, le point J22-20°C se distingue du point J22-26°C via une différence significative par la voie mâle ($\chi^2 = 11,7$; $p < 0,001$, annexe 4.1.1) et du point J30-20°C via une différence significative par la voie maternelle ($\chi^2 = 10,8$; $p < 0,01$, annexe 4.1.3).

De surcroît, il existe une forte variabilité intra-échantillon pour les points J22-26°C et J30-20°C puisque les valeurs de taille entre familles de demi-frères sont significativement différentes (J22-26°C voie paternelle $\chi^2 = 17,6$, $p < 0,001$ (figure 24 A), voie maternelle $\chi^2 = 12,9$; $p < 0,001$; J30-20°C voie paternelle $\chi^2 = 7,3$; $p < 0,01$ (figure 24 B), voie maternelle $\chi^2 = 46,0$; $p < 0,001$).

Concernant le calcul d'héritabilité stricte pour la croissance larvaire, les valeurs suivantes ont été obtenues :

- au point J22-20°C, $h^2(\text{ns}) = 0,007 \pm 0,007$
- au point J30-20°C, $h^2(\text{ns}) = 0,038 \pm 0,014$
- au point J22-26°C, $h^2(\text{ns}) = 0,117 \pm 0,019$

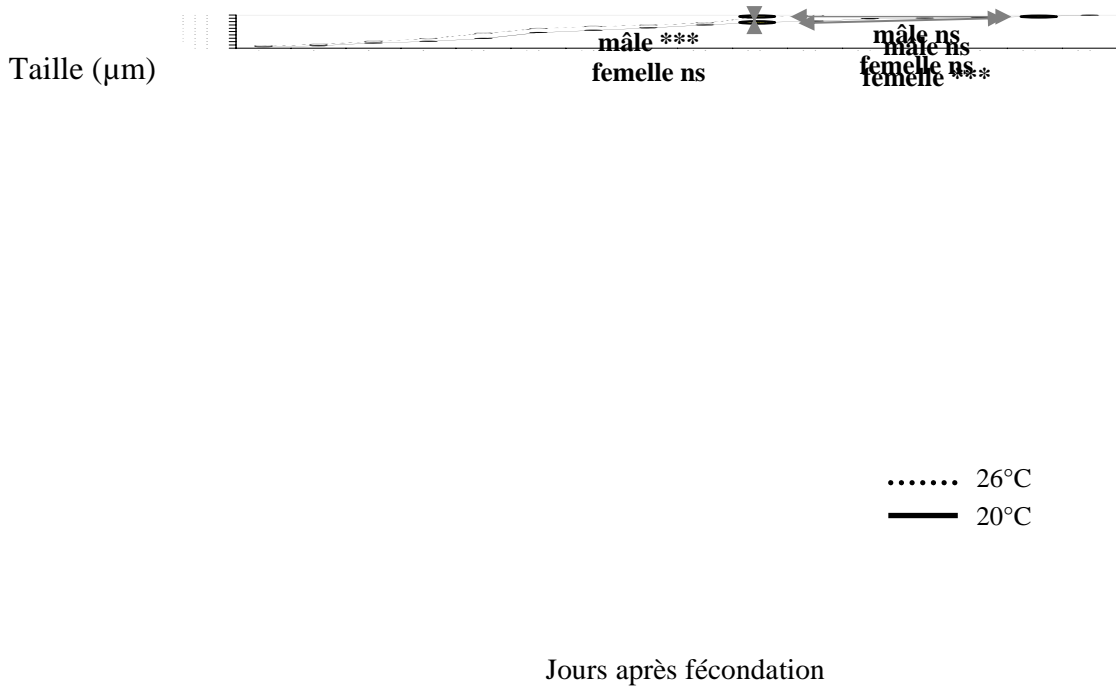


Figure 23 : Comparaison statistique des tailles individuelles de larves génotypées (assignées à un couple) ; (ns) correspond à des valeurs non significatives de p , * de $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

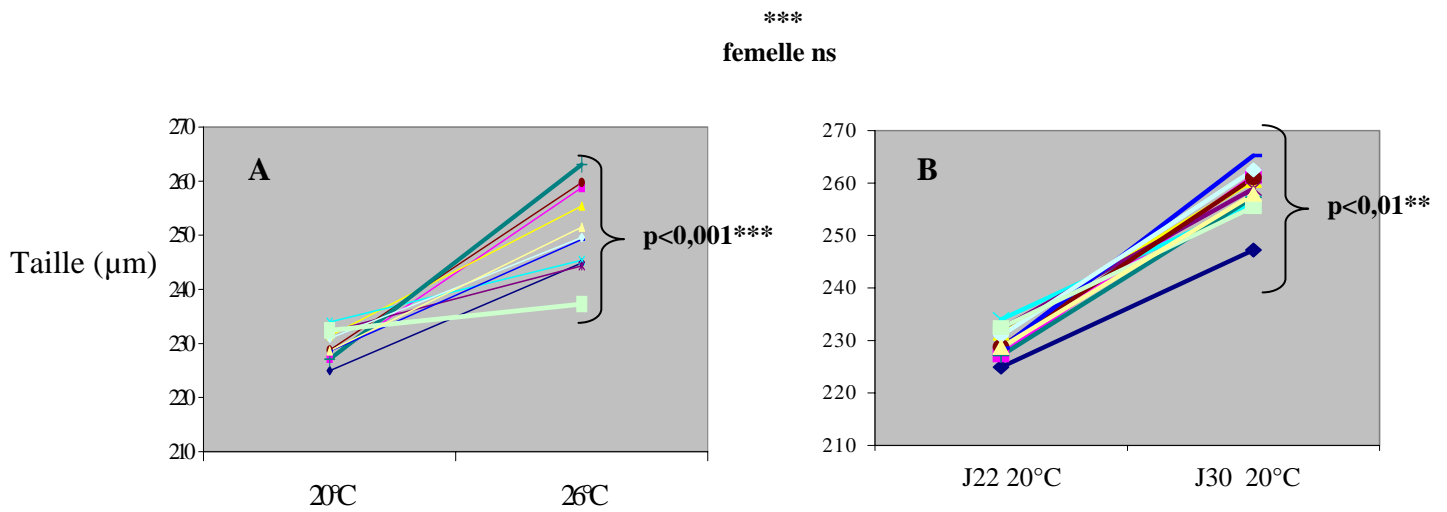


Figure 24 : Normes de réaction des tailles de larves par famille de demi-frères (voie mâle) : (A) comparaison des échantillons 22 jours a.f., (B) comparaison des échantillons à 20°C.

2.3 Points d'échantillonnage du naissain 80 jours après fécondation

Concernant ces quatre points d'échantillonnage, nous avons procédé au même type d'analyse que précédemment, à savoir une étude des contributions et des tailles maximales sur larves assignées. Par souci de clarté, la figure 25 résume les principales informations concernant les contributions (paternelles dans le cas présent, mais la tendance pour les contributions maternelles est similaire) (tests statistiques complets en annexe 4.3). Pour la condition 20°C, malgré les contributions des mâles 58, 71, 90, 168, 179 et 180 qui semblent suivre une tendance similaire pour les cohortes précoces et tardives, l'analyse statistique indique une différence significative (femelles $\chi^2 = 25,9$; $p < 0,001$, mâles $\chi^2 = 25,3$; $p < 0,001$) sur l'ensemble des contributions (figure 25 a). La condition 26°C non représentée montre également une différenciation entre cohortes. Une analyse a aussi été réalisée pour différencier les contributions entre cohortes précoces des deux conditions (figure 25 b). Malgré des tests montrant des contributions significativement différentes, il est intéressant d'observer que la répartition des contributions est relativement semblable (exception faite pour les contributions des mâles 40, 74 et 90). Ce n'est pas le cas pour les cohortes tardives (figure 25 c). La figure 26 donne des informations complémentaires sur les mesures individuelles des huîtres qui composent les cohortes (tests statistiques complets en annexe 4.4). D'une manière générale, les cohortes tardives sont plus petites. Cependant, à 26°C, la différence entre cohorte tardive et précoce n'est pas statistiquement significative ($\chi^2 = 0,01$; ns). Par contre, à 20°C, le retard reste significatif ($\chi^2 = 21,1$; $p < 0,001^{***}$).

2.4 Comparaison larves/juvéniles

A 20°C, la comparaison entre contributions des larves échantillonnées à 30 a.f. et des cohortes de fixation précoces ne montre aucune différence, que ce soit par la voie mâle ($\chi^2 = 2,4$; ns) ou la voie femelle ($\chi^2 = 1,2$; ns). A 26°C, pour les mêmes échantillonnages, les contributions paternelles sont différentes ($\chi^2 = 10,9$; $p < 0,001$, annexe 4.5).

Les valeurs comparatives sur les données individuelles de taille apportent le même type d'information (annexe 4.6). A 20°C, les différences de tailles entre familles sont les mêmes aux deux points. A 26°C, les différences de valeurs de taille entre familles ne sont pas les

mêmes entre les deux prélèvements, via la voie maternelle (voie maternelle $\chi^2 = 14,9$; $p < 0,001$, voie paternelle $\chi^2 = 0$; ns).

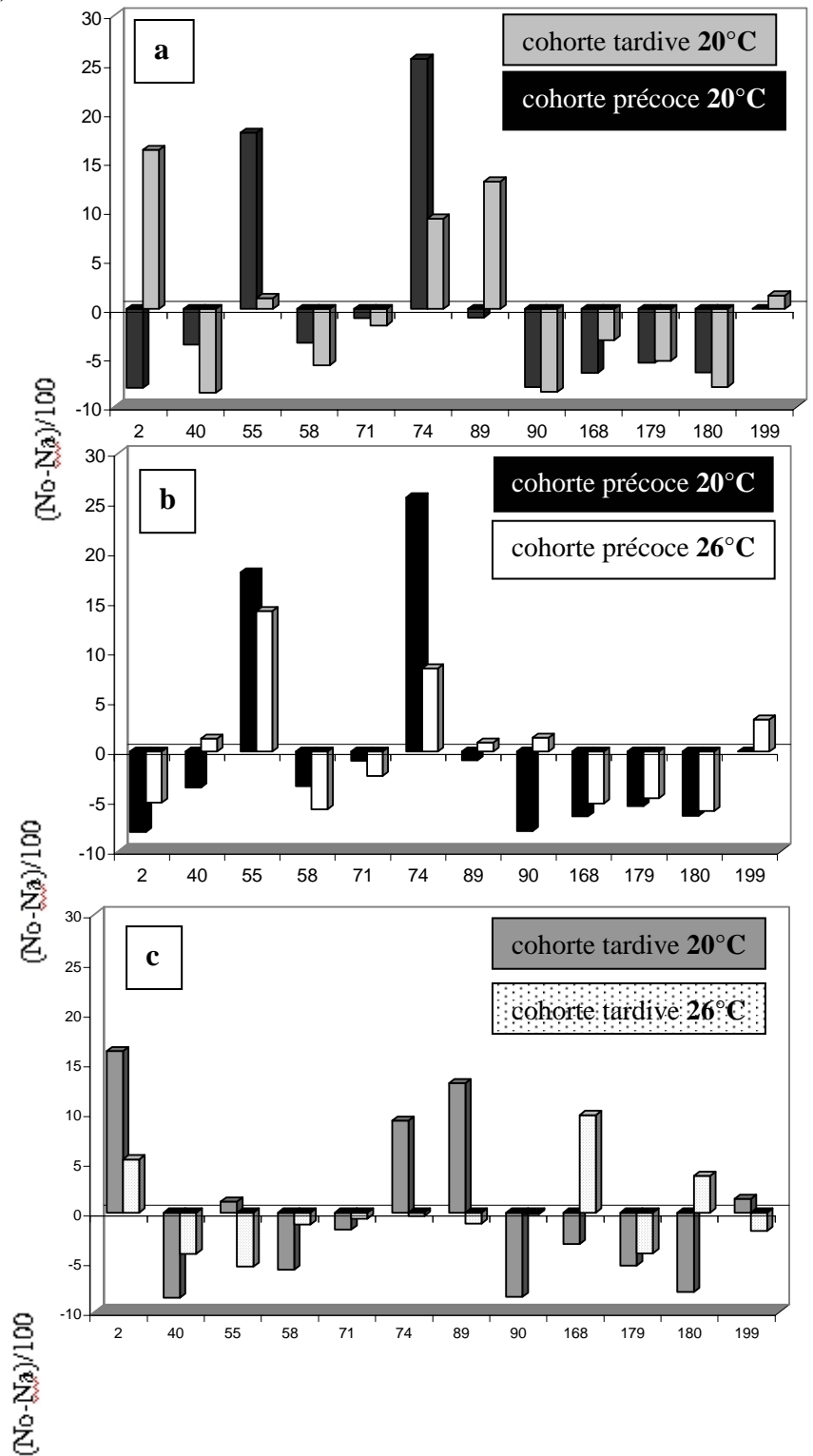
Figure 25 : Différentiel 80 jours après fécondation des contributions paternelles entre valeurs observées et attendues en fonction des taux d'éclosion

No=contribution observée
Na=contribution attendue

a : entre cohorte tardive et précoce à 20°C

b : entre cohorte précoce à 20 et 26°C

c : entre cohorte tardive à 20 et 26°C



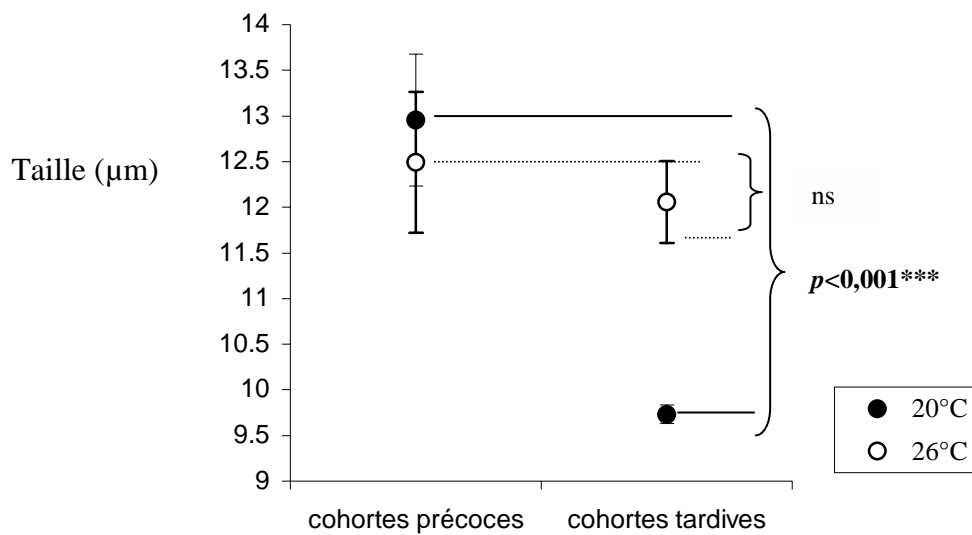


Figure 26 : Taille moyenne du naissain par cohortes de fixation et température (« cohortes précoces », correspond à des individus fixés durant les premiers 3 jours de la période de fixation (sur 9 jours au total) ; « tardives », correspond à des individus fixés durant les derniers 3 jours)

IV. Discussion

1. Déroulement de l'élevage larvaire

La première étape de cette étude était de mener un élevage larvaire sous deux conditions de température (20 et 26°C) afin d'induire des différences sur les caractères suivis (survie et croissance). Suite au croisement factoriel impliquant 4 femelles et 12 mâles, le taux d'éclosion moyen a été relativement élevé (69,5%) puisque supérieur à ceux habituellement observés au sein de l'écloserie de La Tremblade (moyenne de $59,2 \pm 3,2\%$ entre 1992 et 1996, Robert & Gérard, 1999) et par ailleurs comparable à celui de l'expérience sur les effets du tamisage (67,4%). Dans notre étude, seule la femelle 160 a présenté un faible taux d'éclosion (27,8%). Ce résultat s'expliquerait plus vraisemblablement par une mauvaise qualité des gamètes produits par cette femelle plutôt qu'un effet génétique. En effet, le taux d'éclosion est essentiellement déterminé par la qualité et la quantité de réserves conditionnées pendant la période de maturation (Collet, 1998). En conséquence, le taux de fécondation moyen, relativement constant pour les mâles, varie fortement en fonction des femelles (figure 16).

Suite à cette reproduction, les croissances larvaires observées ont été plus lentes qu'attendues. Il est généralement admis que la phase larvaire de l'espèce dure entre 15 et 28 jours pour des températures comprises entre 20°C et 28°C (Helm et al., 2004). Comme il a déjà été noté précédemment, Collet et al. (1999) ont obtenu des fixations dès le 17^{ème} jour d'élevage à une température de 23°C. Dans l'expérience réalisée ici, en dépit de la température élevée, les larves placées à 26°C se sont fixées plus tard que ce qui était attendu (en référence à l'expérience sur les effets du tamisage, chapitre précédent). En effet, ce n'est qu'à partir du 23^{ème} jour d'élevage que les larves les plus précoces ont commencé leur métamorphose. Le même constat a été effectué pour les larves placées à 20°C qui se sont fixées à partir du 34^{ème} jour. Cette métamorphose tardive n'a pas affecté la taille des larves à la métamorphose (environ 300 µm). Nous pouvons supposer que la ration alimentaire a peut-être été limitante, ralentissant ainsi la vitesse de croissance des larves notamment aux 7^{ème} et 19^{ème} jours, qui correspondent aux changements de ration alimentaire (voir tableau 17). Cette

hypothèse est renforcée par la différence significative de diamètre maximum des larves qui existe entre les deux conditions notamment aux 8^{ème} et 20^{ème} jours ($p= 0,01$ et $p=0,002$). Ces dates correspondent à une nette reprise de la croissance des larves à 20°C et 26°C suite au passage à la ration alimentaire supérieure. Malgré la ration alimentaire supposée limitante à certains instants de l'élevage, une nette différence de croissance et d'âge à la métamorphose a été observée entre les deux traitements, permettant d'étudier les interactions génotype – environnement dans ces deux environnements.

2. Typage et assignation

Sur l'ensemble des larves dont l'ADN a été extrait, 80% ont pu être génotypées (et assignées) aux trois loci microsatellites. Ce pourcentage est inférieur aux 90% de l'expérience du chapitre 2 mais il reste globalement élevé compte tenu de la difficulté d'extraction inhérente aux larves. En revanche, pour les juvéniles, seuls 63,8% ont pu être génotypés sans ambiguïté. Les 36,2% manquants semblent s'expliquer là encore par la méthode d'extraction employée. La méthode a en effet été optimisée initialement pour les larves (et les adultes). Or les individus juvéniles analysés avaient des tailles relativement faibles, ne permettant pas d'isoler aisément un fragment de branchie ou de muscle adducteur pour l'extraction. Il s'agissait donc, dans de nombreux cas, d'une extraction sur organisme entier, or à ce stade de développement, les organes sont mis en place, généralement sources de contamination protéique.

3. Données génotypiques en phase larvaire

Par définition, une interaction génotype-environnement est caractérisée lorsqu'une condition du milieu affecte de façon différentielle un caractère chez des génotypes et donc que l'écart entre ces génotypes n'est pas le même selon les conditions du milieu. Si l'on se base sur les données de taille de notre expérience, considérant le point d'échantillonnage 22 jours après fécondation, nous observons ce type de phénomène pour les descendants de certains géniteurs notamment ceux du mâle n°74 ou de la femelle n°160 (figure 27, voir également figure 24). En effet, les larves de ces deux individus présentent des diamètres bien différents (30 à 40 μm) entre les deux traitements. Un tel écart de diamètre moyen n'est pas constaté pour tous les descendants des géniteurs.

Cependant, on ne peut arrêter l'analyse sur la comparaison de ces deux points. En effet, si l'on prend en considération le point J30 à 20°C, celui-ci ne se distingue pas de son homologue (J22) à 26°C, tous deux représentant la phase pré-métamorphique (figure 23). L'expression de la variabilité phénotypique (croissance) est aussi observée en fin de période larvaire en condition 'froide'. Cette expression souligne l'importance et la particularité de cette période au cours de laquelle les organes larvaires laissent place à ceux du futur organisme devenu benthique (Baker & Mann, 1994) et où, par conséquent, les changements physiologiques sont complexes (Garcia-Esquivel et al., 2001). La température semble donc jouer un rôle dans la précocité de l'expression phénotypique et non dans la définition même d'une interaction

Taille des larves
(μm)

génotype – environnement (données confirmées par les valeurs de contribution).

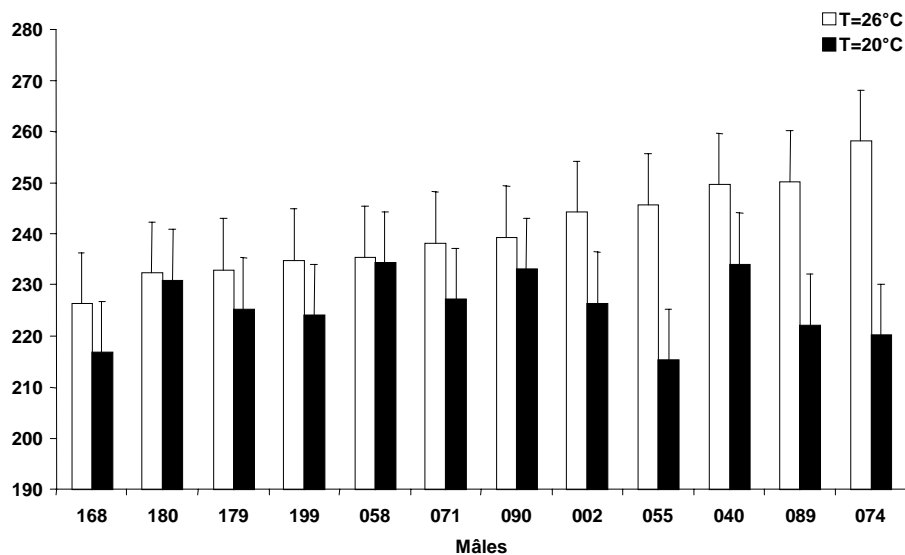


Figure 27 : Représentation graphique de la taille moyenne des larves issues de chaque mâle selon la condition d'élevage 22 jours après fécondation.

Comme il a déjà souvent été évoqué dans les chapitres précédents, Ernande et al. (2003) a proposé deux hypothèses explicatives au maintien de la variabilité génétique pour les caractères précoces chez *C. gigas*. La première hypothèse suppose que des compromis (« trade-offs ») entre caractères induisent le maintien d'un polymorphisme pour des caractères corrélés négativement, et la seconde suppose que le maintien du polymorphisme résulterait de stratégies plus ou moins favorisées sous différentes conditions (variable dans le temps ou dans l'espace). Il est difficile de savoir, à la vue des résultats, si l'une ou l'autre des hypothèses est renforcée.

D'autre part, nous avons déjà vu qu'en éclosion commerciale, dans le but d'homogénéiser les lots, le tamisage des larves est une pratique courante induisant l'élimination des individus à croissance lente. La variabilité génétique pour la croissance larvaire s'exprimant précocement à 26°C (température proche de celles appliquées en conditions contrôlées d'éclosion), le tamisage peut représenter une pression de sélection significative. Simulant un tamisage dans lequel 50% des larves les plus petites seraient éliminées, la perte en terme de pourcentage de *Ne* (Robertson, 1961) serait ainsi de 18% pour le point J22-26°C contre 4% à la même date à 20°C.

Nous avons également déterminé des valeurs d'héritabilité sur la croissance aux trois points. L'héritabilité de la croissance larvaire chez les huîtres a été étudiée à plusieurs reprises chez *Crassostrea virginica* (Haley et al., 1975 ; Longwell, 1976 ; Newkirk et al., 1977 ; Losee, 1978). Pour *C. gigas*, Ernande et al. (2003) ont également permis l'estimation de ce paramètre. Basées sur un faible nombre de famille, ces études indiquent que la croissance larvaire est « relativement » héritable (disparité des résultats, voir tableau 1, p.19). Dans notre expérience, les valeurs d'héritabilité au sens strict du diamètre de la coquille à J22 (20°C et 26°) puis à J30 (20°C) après fécondation, sont respectivement de $0,007 \pm 0,007$, $0,117 \pm 0,014$ et $0,038 \pm 0,019$. Cela confirme les valeurs déterminées par Dégremont (2003) montrant qu'à ce stade la croissance est faiblement héritable. Il est également intéressant de noter que les valeurs sont différentes selon les températures, la température 26°C offrant la valeur la plus élevée. Cela confirme l'influence de la température sur la composante génétique du diamètre maximum de la coquille dans le sens d'une augmentation de la variation génétique.

4. Données génotypiques pour juvéniles

A 20°C ou à 26°C, les cohortes temporelles sont génotypiquement différentes confirmant les structurations différentielles déjà observées au cours de l'expérience sur le tamisage. Concernant les compositions génotypiques des cohortes précoces des deux conditions, bien qu'une différence statistique existe, une observation plus minutieuse de la figure 25 b permet de constater que les différentiels de contribution suivent une même tendance. Ainsi deux pères sont en sur-représentation (mâles 55 et 74) pendant qu'un autre groupe est en sous-représentation (mâles 2, 58, 168, 179 et 180), et ce, pour les deux conditions de température.

Les cohortes tardives sont en revanche très différentes. La température a ici une influence particulière. Tout aussi intéressante est l'influence de la température sur la taille. Sur la base des données individuelles de taille, il ressort uniquement un effet cohorte pour la condition à 20°C. A 26°C, le retard de taille généré par des taux de croissance larvaire différents est comblé. Ce qui n'est pas le cas à 20°C où les larves à croissance lente donne des juvéniles ayant des tailles statistiquement inférieures.

Ceci conforte partiellement les études qui ont constatées une corrélation positive entre croissance larvaire et juvéniles (Collet et al., 1999). Partiellement en effet, car ce phénomène n'est observable qu'à 20°C.

Bilan-synthèse

✓ Ce troisième chapitre souligne la difficulté et l'intérêt d'étudier les interactions entre génotypes et facteurs environnementaux pour des organismes invertébrés aux histoires de vie complexes.

✓ La température exerce une influence sur le phénotype et le génotypique aux stades larvaires et juvéniles :

- la variabilité génétique pour la taille est exprimée plus précocément durant l'élevage des bacs maintenus à 26°C.

- la température interagit également sur la croissance des juvéniles. A 26°C, la taille des juvéniles est similaire entre cohortes de fixation tardives et précoces alors qu'à 20°C, les cohortes précoces gardent une taille supérieure. L'hypothèse d'une corrélation positive entre croissance larvaire et juvénile est donc partiellement soutenue (à 20°C).

✓ Nous avons déjà vu qu'en éclosion commerciale, dans le but d'homogénéiser les lots, le tamisage des larves est une pratique courante induisant l'élimination des individus à croissance lente. La variabilité génétique pour la croissance larvaire s'exprimant précocément à 26°C (température habituellement appliquée en éclosion), le tamisage peut représenter une pression de sélection significative dans le sens d'une réduction de la diversité génétique.

CHAPITRE 4

MISE EN EVIDENCE D'UNE REPONSE A LA SELECTION PRECOCE ?

I. Introduction

Au travers de la sélection de caractères comme la croissance, la survie ou la résistance aux maladies, les programmes de sélection aquacoles ont pour objectifs de produire des stocks sains dont les performances sont améliorées (Keys et al., 2004). Cependant, telle qu'elle a été précédemment décrite, la sélection artificielle (intentionnelle le plus souvent) a tendance à favoriser les phénotypes extrêmes (comme c'est le cas pour la croissance), homogénéisant de fait le panel des performances des individus (sélection directionnelle). Cela peut également affecter d'autres caractères, cette fois de façon non intentionnelle. Cet effet peut se produire lorsque deux caractères sont corrélés positivement ou négativement. L'étude menée par Pascual et al. (2004) a démontré l'effet significatif d'un programme de sélection par la taille sur le conditionnement du processus métabolique chez la crevette *Litopenaeus vannamei*. Autrement dit, les deux populations de crevettes étudiées (l'une sauvage, l'autre issue de sept générations de sélection sur la taille) présentent un régime métabolique différent, l'exploitation industrielle de l'espèce ayant indirectement sélectionné un type de métabolisme, alors même que la sélection était basée sur la taille.

Un autre effet à considérer de la sélection artificielle plus pernicieux, est le risque de consanguinité. Il a déjà été vu que pour les bivalves, le risque est d'autant plus important qu'elles ont un fort potentiel de réponse à la sélection compte tenu de leur niveau de variation génétique. En éclosion, parce que les bivalves ont une forte fécondité, le nombre de géniteurs nécessaire à la production de nouveaux stocks peut être relativement restreint. Une première image de la diversité génétique de populations d'éclosion (chapitre 1) a pu mettre en évidence une perte de diversité non négligeable (au moins pour l'une des deux éclosions étudiées). D'autres études ont déjà mis en évidence ce phénomène (Gosling, 1982 ; Hedgecock & Sly, 1990) pour *C. gigas*.

Une pratique classique en éclosion consiste à ne conserver que les larves à croissance rapide. Le second chapitre de cette thèse a été consacré à ce point. L'expérience a permis de confirmer l'existence d'une composante génétique pour les caractères de développement

précoce (variabilité des contributions parentales pour les cohortes de fixation). Du fait du fort différentiel de contribution pour les cohortes les plus précoces, la perte de diversité liée aux pratiques de tamisage pourrait être également non négligeable. Il ressort donc une diminution de la diversité des individus produits, lesquels peuvent, comme c'est le cas en éclosion, être réutilisés pour générer d'autres productions et ainsi perpétuer un effet de dérive.

Par ailleurs, l'expérience abordant l'influence de la température a aussi permis de constater l'importance de cet effet sur l'expression de la variabilité du caractère croissance. Aussi par conjonction des deux effets sélectifs, (tamisage et température) il est légitime de se poser la question de savoir si la sélection de larves à génotype « croissance rapide » est bien effective en éclosion commerciale.

Même si la croissance est généralement considérée comme un caractère à héritabilité faible ou modérée (Toro & Newkirk, 1990 ; Dégremont, 2003 ; voir également le chapitre précédent), la majorité des études (Haley et al., 1975 ; Longwell, 1976 ; Newkirk et al., 1977 ; Losee, 1978 ; Newkirk, 1980 ; Singh & Zouros 1981 ; Jones et al., 1996) montrent que la croissance larvaire est potentiellement héritable.

Aucune étude ne s'est par ailleurs intéressée à l'évolution des caractères larvaires sous l'influence double de dérive induite et neutre.

Ce quatrième chapitre présente une expérience impliquant des croisements entre huîtres issues du milieu naturel et huîtres provenant d'éclosion après sept générations de sélection sur la taille et la forme (aux stades adulte et juvénile, associée à un tamisage en phase larvaire). L'objectif est de comparer les caractères de stade de développement précoce des larves issues des deux stocks afin de déterminer l'existence d'une sélection différentielle en éclosion commerciale.

Les deux populations sont génotypées aux trois marqueurs microsatellites afin d'avoir une information de diversité initiale. Les larves produites selon quatre types de croisement (femelles sauvages X mâles sauvages, femelles domestiquées X mâles domestiqués, et les croisements hybrides correspondants) sont suivies à travers différents paramètres : biométriques, survie et succès à la fixation (ou métamorphose).

II. Matériel et méthodes

1. Choix des géniteurs

Deux populations de géniteurs ont été utilisées pour cette expérience : la première composée de 47 individus issus du milieu naturel (Charente-Maritime, France), la seconde représentée par 37 individus issus de sept générations de reproduction et sélection en écloserie commerciale.

2. Croisement

Quatre types de croisements (gamètes mélangés) ont été réalisés : entre individus à l'intérieur de chaque population ('Sauvage x Sauvage' =SxS, 'Éclosion x Éclosion' =ExE) et entre individus croisés de chaque population ('Sauvage x Éclosion' =SxE, 'Éclosion x Sauvage' =ExS). L'ADN de tous les individus participants a été extrait selon la méthode décrite au cours du chapitre 1.

Pour chaque population, les spermatozoïdes des mâles ont été collectés par dilacération (« stripping ») de la gonade puis mélangés. De la même façon, les ovocytes ont été mélangés pour chaque population. Pour le stock de géniteurs issus d'éclosion, les gamètes de 17 mâles et 20 femelles ont été collectés, même chose pour la population sauvage composée de 14 mâles et 33 femelles. Les concentrations de gamètes ont été estimées en utilisant des cellules de Thoma et Malassez couplées au logiciel IPS de l'analyseur d'image SAMBATM. La fécondation, comme dans les expériences précédentes a été faite à raison de 100 spermatozoïdes par ovocyte, un million d'ovocytes étant nécessaire pour chacun des quatre croisements. Trois heures après fécondation, les embryons issus de chacun des quatre croisements ont été divisés puis répartis selon trois bacs d'élevage larvaire (5 millions d'ovocytes par bac, 3 réplicats par condition soit un total de 12 bacs pour l'expérience).

3. Elevage larvaire

Les larves ont été élevées en bacs de 30 litres alimentés par de l'eau de mer filtrée (maille de filtration de 1 μm , température de 24°C, salinité comprise entre 28-30‰) et nourries selon un régime composé d'un mélange de deux micro-algues : *Chaetoceros gracilis* (30%) et *Isochrysis aff. galbana* (T-iso) (70%), (tableau 19).

Tableau 19 : Rationnement larvaire

Jours élevage	Ration en cell./ μL
J1-J4	10
J5-J8	20
J9-J12	40
J13-J15	80
J16-J19	140
J20-J23	200
J-24-fin	300

La densité larvaire a été réduite à 10 larves par ml un jour après fécondation. La taille de population (nombre de larves dans chaque bac) a été estimée par un quintuple comptage d'après la méthode décrite par Utting & Spencer (1991). Deux cent larves de chaque bac ont été collectées pour mesure individuelle de la longueur maximale de la coquille via le logiciel IPS de l'analyseur d'image SAMBATM. Cette étape de mesure a été appliquée tous les 2-3 jours. Lorsque les premières larves pédivéligères ont été observées, les fractions retenues sur un tamis de maille 220 μm ont été transférées en micronurserie pour fixation. Cette opération a été réalisée tous les deux jours après l'apparition des premières larves pédivéligères. Le succès à la métamorphose a été estimé 10 jours après fixation, correspondant au ratio entre nombre de juvéniles présents à cette date et nombre de larves pédivéligères initialement compté. Trois estimations des densités de juvéniles ont été réalisées pour chaque type de croisement. A noter enfin qu'aucun tamisage sélectif n'a été opéré au cours de l'élevage.

4. Analyses de diversité génétique

Le polymorphisme génétique aux trois marqueurs microsatellites a été estimé pour chaque géniteur des deux populations parentales. Le nombre d'allèles ainsi que l'hétérozygotie observée (H_o) ont été déterminés. Le logiciel GENETIX (Belkhir et al., 2004) a été utilisé afin

d'obtenir les valeurs d'hétérozygotie attendue (H_e) selon Nei (1987) par locus et par population.

5. Analyse d'apparentement

Classiquement, en l'absence d'information de parenté *a priori* (information généalogique), il existe différentes approches basées sur les marqueurs moléculaires permettant de faire des inférences sur les relations génétiques entre individus au sein d'une même population. Ces approches sont classiquement divisées en deux groupes (Blouin, 2003). Le premier correspond à des estimateurs déterminant la parenté entre paire d'individus. Il est possible de distinguer deux sous-groupes au sein de ces méthodes dites « pairwise » (Butler et al., 2004) : celui des estimateurs de parenté « relatedness », laquelle parenté est une quantité continue définie en terme de probabilité d'identité par descendance (au sens de Malécot (1948)). Ces techniques (Ritland, 1996 ; Lynch & Ritland, 1999 ; Queller & Goodnight, 1989 ; Wang, 2002) reposent le plus souvent sur une méthode des moments. L'autre sous-groupe définit des techniques « de vraisemblance » permettant une classification des paires d'individus en classe de relation donnée (Thompson, 1975 ; Herbringer et al., 1997 ; Mousseau et al., 1998).

Le second grand groupe réunit les méthodes dites de partition (Smith et al., 2001 ; Wang, 2004 ; Butler et al., 2004) qui reconstruisent le « pedigree » de toute la population sur une génération, permettant d'évaluer qui est plein-frère, demi-frère et non apparenté parmi les individus (partition en groupe de relation).

Le nombre de marqueurs que nous avons utilisé dans notre étude (3) est relativement faible pour obtenir une image claire des parentés via les méthodes de partition. Six à huit loci avec une huitaine d'allèles semblent préconisés pour un minimum de précision (Butler et al. 2004). Les estimateurs de la méthode des moments présentent moins de contraintes statistiques pour les estimations à l'échelle de l'individu (Ritland, 1996) et intègrent potentiellement de l'information sur plusieurs générations antérieures. C'est pourquoi nous avons choisi de déterminer les parentés sur la base de cette méthode des moments.

Pour décrire plus précisément ces estimateurs, il convient de définir les génotypes respectifs d'un individu A_iA_j et d'un individu A_kA_l . Soit δ_{ij} défini comme variable « indicatrice » ou « opérateur Kronecker » (Ritland, 2000), qui prend la valeur 1 si $A_i=A_j$ et 0 dans le cas contraire. Entre deux individus (quatre allèles), il y a six δ possibles, un pour chaque comparaison d'allèles, à la fois entre individus et au sein d'un même individu. L'estimateur que nous avons utilisé est celui proposé par Ritland (1996) tel que pour 1 locus :

$$\hat{r} = \frac{[(\delta_{ik} + \delta_{il})/p_i] + [(\delta_{jk} + \delta_{jl})/p_j] - 1}{4(n - 1)}$$

où n est le nombre d'allèles au locus considéré, p_i la fréquence de l'allèle i dans la population. L'estimateur multilocus est la moyenne des estimateurs locus-spécifiques, chacun pondéré par la proportion $(n-1)$. Il existe d'autres estimateurs comme vu précédemment (Lynch & Ritland, 1999 ; Queller & Goodnight, 1989 ; Van De Castele et al. 2001 ; Wang, 2002) mais celui proposé par Ritland (1996) présente les variances statistiques les plus faibles. Les estimations de parenté ont été calculées grâce au programme « Mark » (Genetic Marker Analysis Program, 2004). La parenté entre tous les couples potentiels de géniteurs a ainsi pu être déterminée (340 paires dans le cas de la population d'écloserie (20 femelles, 17 mâles) et 462 pour la population sauvage (33 femelles, 14 mâles)). La fréquence de distribution de ces valeurs de parenté a ensuite été examinée.

Un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (PROC NPARWAY1 sous SAS) a enfin été appliqué afin de comparer la valeur moyenne des coefficients de parenté entre les deux populations.

6. Procédures d'analyse des données

La distribution des fréquences de taille des larves a été examinée par analyse des progressions modales. La décomposition modale a été déterminée sur la base des méthodes de Bhattacharya (Bhattacharya, 1967) et NORMSEP (Hasselblad, 1966) via le logiciel Fisat (2002). Ces méthodes reposent sur le principe d'une décomposition des distributions composites de fréquences de taille en composantes normales.

Plus précisément, la méthode de Bhattacharya est fondée sur la linéarisation de la courbe des fréquences de la distribution normale. Elle a été utilisée pour obtenir une première valeur pour les moyennes des modes, lesquelles sont ensuite affinées via la méthode NORMSEP reposant sur le concept du maximum de vraisemblance (NORMSEP pour SEParation des composants de la NORMalité) (figure 28). Les modes ont été validés lorsque ces derniers étaient séparés par un index de séparation supérieur à 2. Au préalable, les histogrammes ont été lissés selon la méthode de la moyenne mobile centrée d'ordre 3 (Frontier & Pichod-Viale, 1991). Chaque effectif N_i d'une classe de taille i a été transformé selon la formule suivante :

$$N'_i = (N_{i-1} + 2N_i + N_{i+1}) / 4$$

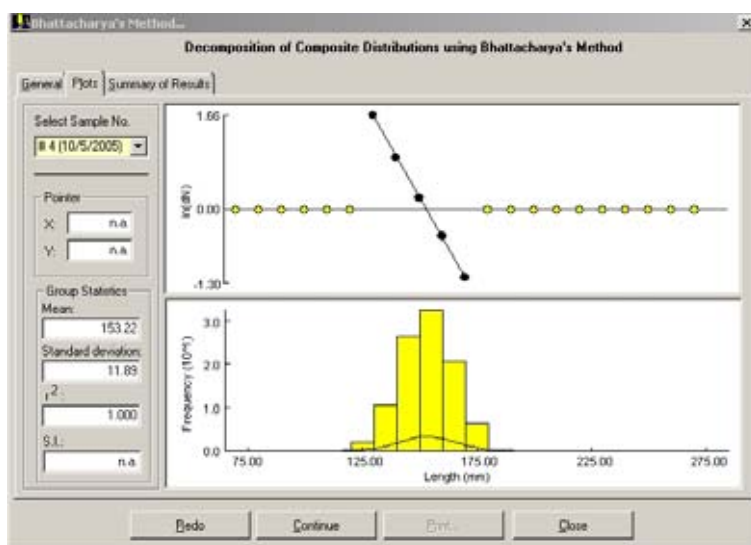
En effet, l'inconvénient d'un histogramme fondé sur l'observation d'un échantillon, de taille obligatoirement petite par rapport à celle de la population, est que les classes sont inégalement représentées. Le lissage permet justement de s'affranchir des aléas d'échantillonnage correspondant selon le cas à des sur ou sous-estimations.

L'intervalle de classe de taille choisi a été de 10µm. Cet intervalle a été défini ainsi car supérieur à l'erreur de mesure et permettant de minimiser le nombre de classes de taille adjacentes vides (Jollivet et al., 2000 ; Thiébaud et al., 2002). Initialement la normalité des distributions de taille avait été testée via le test de Kolmogorov-Smirnov sous SAS®.

Le coefficient de variation des tailles maximales de larves a été aussi analysé (PROC MIXED, SAS/STAT® Software, SAS Institute Inc.,1999) afin de déterminer d'éventuelles différences entre croisements à chaque date d'échantillonnage. La survie, calculée comme le rapport entre le nombre de larves 3 jours a.f. (après fécondation) et 20 a.f., a également été suivie et analysée comme donnée de type Poisson en utilisant une fonction de lien log (SAS

(a) macro GLIMMIX ; Littell et al., 1996). Les tests de significativité pour ces deux paramètres sont basés sur une statistique F concernant les effets fixes (= effet "croisement"). Comme décrit dans les chapitres précédents, afin de tester les effets aléatoires (= effet "réplicat"), nous avons utilisé des tests de ratio de vraisemblance (« likelihood ratio tests ») entre modèles dit 'hiérarchisés' lesquels suivent de manière asymptotique une

distribution du χ^2 .



(b)

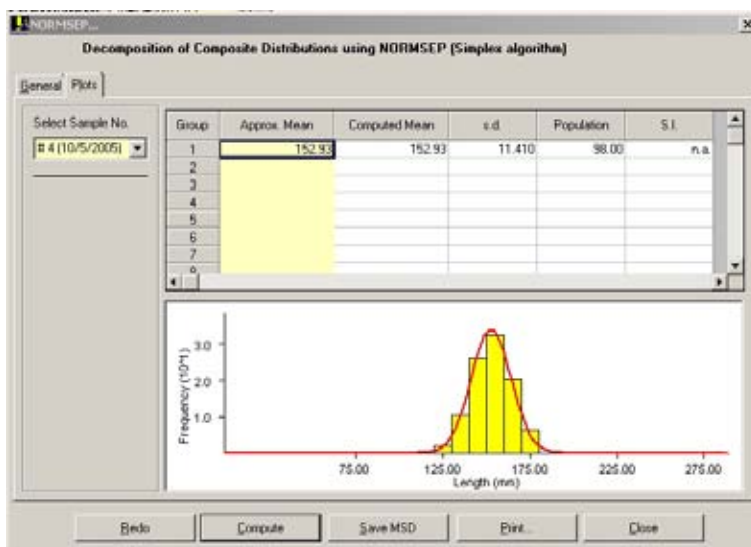


Figure 28 : Illustration des méthodes utilisées pour les décompositions modales (logiciel Fisat) : la première interface (a) correspond à la méthode des différences logarithmiques de Bhattacharya (1967), la seconde interface représente l'étape où la moyenne des modes est affinée via la méthode NORMSEP (Hasselblad 1966).

Tableau 20 : Génotypes aux trois loci des deux populations à l'origine des croisements

Population sauvage	Population sauvage			Population d'éclosion	Population d'éclosion		
	CG108	CG49	L10		CG108	CG49	L10
femelle-1	129/139	133/145	130/145	femelle-1	140/149	130/134	162/172
femelle-2	126/141	130/180	146/150	femelle-2	129/149	132/132	170/170
femelle-3	131/142	133/166	161/172	femelle-3	131/133	130/142	162/172
femelle-4	114/155	147/163	130/146	femelle-4	133/149	134/149	154/162
femelle-5	000/000	133/161	103/148	femelle-5	149/149	146/146	137/154
femelle-6	116/135	128/133	112/162	femelle-6	140/149	130/134	162/172
femelle-7	158/164	128/163	134/134	femelle-7	149/149	129/146	154/154
femelle-8	132/141	147/174	120/130	femelle-8	131/149	129/162	118/162
femelle-9	122/155	146/170	130/162	femelle-9	129/149	129/146	154/172
femelle-10	137/160	170/182	139/154	femelle-10	144/149	131/149	154/172
femelle-11	100/138	145/145	120/134	femelle-11	129/149	131/131	154/154
femelle-12	121/129	139/163	124/132	femelle-12	133/149	129/131	137/162
femelle-13	118/140	144/160	156/168	femelle-13	133/149	142/142	137/162
femelle-14	112/124	139/139	121/161	femelle-14	149/149	130/132	139/154
femelle-15	135/145	144/166	148/148	femelle-15	133/146	142/146	137/137
femelle-16	146/146	000/000	134/136	femelle-16	129/135	131/134	137/154
femelle-17	122/141	148/153	150/165	femelle-17	149/149	146/162	162/162
femelle-18	133/147	140/146	120/141	femelle-18	133/149	144/162	162/162
femelle-19	138/144	135/153	126/128	femelle-19	129/135	131/149	154/172
femelle-20	119/142	133/147	128/148	femelle-20	133/149	146/162	162/162
femelle-21	131/135	161/161	139/143	mâle-1	149/149	130/153	154/172
femelle-22	142/155	131/157	162/166	mâle-2	149/149	131/146	154/162
femelle-23	140/160	148/170	126/174	mâle-3	149/149	131/146	154/154
femelle-24	143/143	139/157	134/140	mâle-4	149/149	153/153	137/137
femelle-25	128/132	000/000	154/194	mâle-5	149/149	132/153	172/172
femelle-26	142/151	142/148	148/176	mâle-6	129/149	132/132	118/162
femelle-27	112/141	139/145	134/174	mâle-7	116/149	142/142	154/162
femelle-28	153/153	147/147	146/182	mâle-8	149/149	131/153	118/162
femelle-29	131/135	133/133	124/128	mâle-9	149/149	130/137	137/172
femelle-30	105/142	131/162	110/141	mâle-10	129/140	129/129	139/154
femelle-31	144/149	174/174	120/141	mâle-11	149/149	131/146	162/162
femelle-32	122/137	133/170	163/170	mâle-12	149/149	130/153	154/172
femelle-33	176/176	144/168	126/132	mâle-13	116/135	132/149	152/154
mâle-1	135/144	133/154	165/172	mâle-14	135/140	162/162	154/172
mâle-2	122/153	137/170	143/159	mâle-15	149/149	131/153	162/162
mâle-3	135/135	142/161	141/152	mâle-16	140/149	132/151	139/139
mâle-4	105/144	131/161	166/174	mâle-17	149/149	131/131	162/172
mâle-5	126/137	148/170	139/194				

mâle-6	122/169	131/154	118/154
mâle-7	141/143	137/139	148/148
mâle-8	114/137	133/157	124/152
mâle-9	138/147	144/178	148/161
mâle-10	133/151	131/145	112/112
mâle-11	116/128	133/133	134/146
mâle-12	118/132	133/133	143/154
mâle-13	122/126	148/166	141/141
mâle-14	153/155	131/144	128/148

Tableau 21 : Variabilité génétique des populations parentales aux trois loci microsatellites (N = taille d'échantillon; A = nombre d'allèles; H_o = hétérozygotie observée; Hnb = hétérozygotie attendue non biaisée d'après Nei (1987)).

Locus	Paramètre	Populations	
		Ecloserie	Sauvage
Cg108	N	37	46
	A	9	37
	H_o	0,59	0,89
	Hnb	0,61	0,97
L10	N	37	47
	A	8	37
	H_o	0,65	0,89
	Hnb	0,80	0,97
Cg49	N	37	46
	A	13	28
	H_o	0,73	0,80
	Hnb	0,91	0,94
Multilocus	N	37	46
	A	10	34
	H_o	0,66	0,86
	Hnb	0,77	0,96

III. Résultats

1. Analyse génétique des populations parentales (génotypes parentaux en tableau 20)

1.1 Diversité génotypique (tableau 21)

Le nombre d'allèles pour la population d'écloserie est compris entre 9 et 13 suivant le locus considéré. A contrario pour la population sauvage, nous observons une moyenne de 34 allèles par locus correspondant à une diversité allélique supérieure de 70,6% à la population d'écloserie (entre 53,6 et 78,4% selon les loci). Les valeurs d'hétérozygotie observée et attendue (H_o et $H_n.b.$) pour la population sauvage sont systématiquement supérieures (valeur multilocus moyenne supérieure de 20% pour les deux types d'hétérozygotie).

1.2 Coefficients de parenté

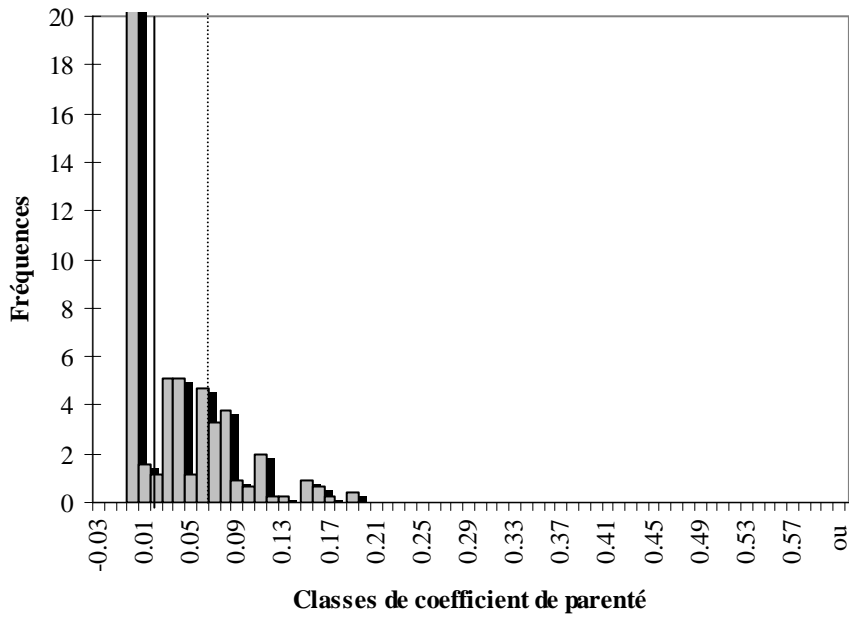
Utilisant la méthode des moments de Ritland (1996), nous avons calculé les coefficients de parenté pour chaque paire ou couple possible d'individus dans chacune des populations. D'après la distribution des fréquences de ces coefficients (figure 29), on peut constater que pour la population sauvage, près 86,7% des valeurs de r sont inférieures à $1/16$, valeur classiquement assimilée à une relation de parenté entre cousins germains (Jacquard, 1970). La population d'écloserie présente 57,7% des valeurs de r inférieures à $1/16$. Pour cette même population, 20,8% sont compris entre $1/16$ et $1/8$ (relation demi-frères), 18,7 % entre $1/8$ et $1/4$ (relation pleins-frères) et 2,7% supérieur à $1/4$ contre respectivement 10,9%, 2,4% et 0 % pour la population sauvage.

La valeur maximale observée pour un couple est de 0,28 pour le groupe sauvage et de 0,57 pour le groupe d'écloserie. La parenté moyenne est significativement supérieure (près de six fois) dans la population issue d'écloserie ($r = 0,068 \pm 0,005$ contre $r = 0,012 \pm 0,001$, $z = 18,1669$, $p < 0,001$).

68%



(a) population sauvage



(b) population d'écloserie

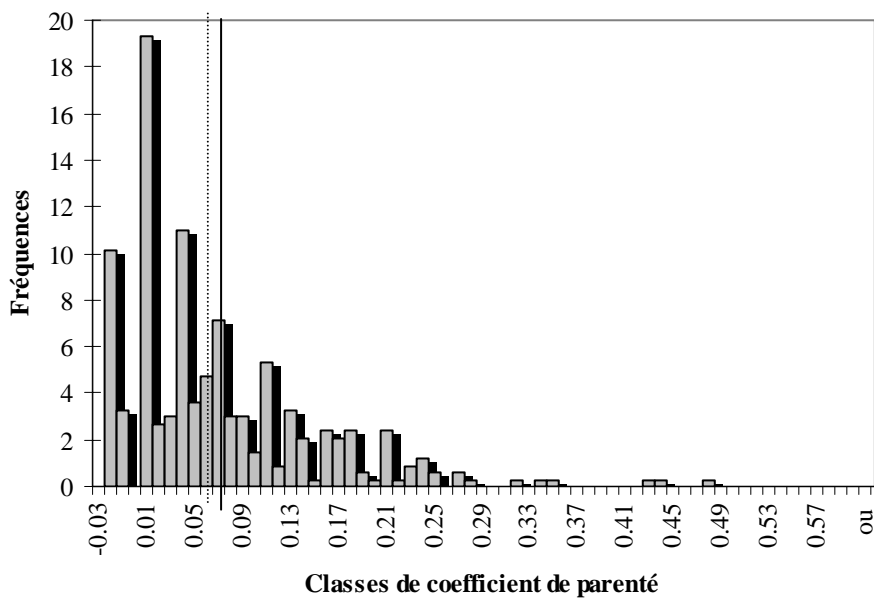



Figure 29 : Distribution des fréquences des coefficients d'apparenté par paire déterminés selon la méthode des moments de Ritland (1996) pour (a) la population sauvage (r moyen = $0,012 \pm 0,001$, nombre de couples = 462) et (b) la population d'écloserie (r moyen = $0,068 \pm 0,005$, nombre de couples = 340). Pour les deux populations, la valeur moyenne de r est représentée par une ligne pleine, la ligne pointillée correspondant à la valeur théorique de r pour des cousins germains ($r = 1/16$).

2. Croissance et survie larvaire

2.1 Evolution temporelle des distributions de taille des larves

La  distribution des fréquences de taille des larves varie nettement au cours de l'élevage larvaire en fonction de l'origine du croisement. Afin d'éviter le biais dû à un effet de densité, nous avons choisi de ne représenter que les réplicats de chaque condition dont les nombres de larves étaient équivalents 3 jours a.f. (figure 30). Ainsi, nous avons choisi un réplicat par condition dont les tailles de population respectives sont les suivantes : 380 000 (ExE), 394 400 (ExS), 388 800 (SxE), 395 600 (SxS).

Le test de Kolmogorov-Smirnov montre une forte déviation à la normalité au cours du temps pour le réplicat représentatif de la descendance ExE, et ce, à partir du 10^{ème} jour a.f. ($p < 0,05$). Ceci est appuyé par les résultats générés par le logiciel Fisat permettant une décomposition modale de la distribution des fréquences de taille (tableau 22). Le lot ExE tient une place particulière dans la mesure où une décomposition bimodale de la distribution de classe de taille dès le 10^{ème} jour a.f. est observable. Cette plurimodalité se distingue encore plus nettement trois jours après, chaque mode représentant respectivement 28% et 72% de l'effectif total. A la même date d'échantillonnage, les larves issues des trois autres types de croisements montrent une distribution unimodale. La structure plurimodale est confirmée pour le reste des dates d'échantillonnage pour le croisement ExE. Ainsi après 20 jours, trois modes sont observables. Cependant, malgré la présence de ces trois modes, il semble que deux groupes se démarquent visuellement. Le premier groupe correspond à des larves dont les tailles sont comprises entre 110 et 175 μ m (32% de l'effectif total). Du 10^{ème} au 17^{ème} jour, le taux de croissance de ce groupe est quasiment nul. Le second groupe, majoritaire puisque représentant 68%, détermine la présence de larves de taille comprise entre 195 et 295 μ m et montre un taux de croissance journalier d'environ 15 μ m depuis le 10^{ème} jour. La structure plurimodale, sauf exception pour le lot SxS après 15 jours, n'est pas observée pour les autres populations larvaires.

2.2 Coefficient de variation de la taille maximale des larves

En relation avec les distributions de fréquence de taille précédemment décrites, l'évolution temporelle des coefficients de variation sur la taille démarque le croisement ExE des trois autres (figure 31). Dès le 6^{ème} jour d'élevage, les larves de ce croisement présentent des valeurs significativement supérieures ($F = 10,53$, $p < 0,001$). Les coefficients de variation de chaque groupe ne cessent d'augmenter au cours du temps. Les larves ExE atteignent, 17 jours a.f., une valeur maximale de 22,63. Les larves SxS terminent l'élevage avec une valeur

Figure 30 : Histogrammes de distribution des fréquences de taille pour les larves issues des quatre croisements (chaque flèche signale la présence d'un mode déterminé par le logiciel Fisat).

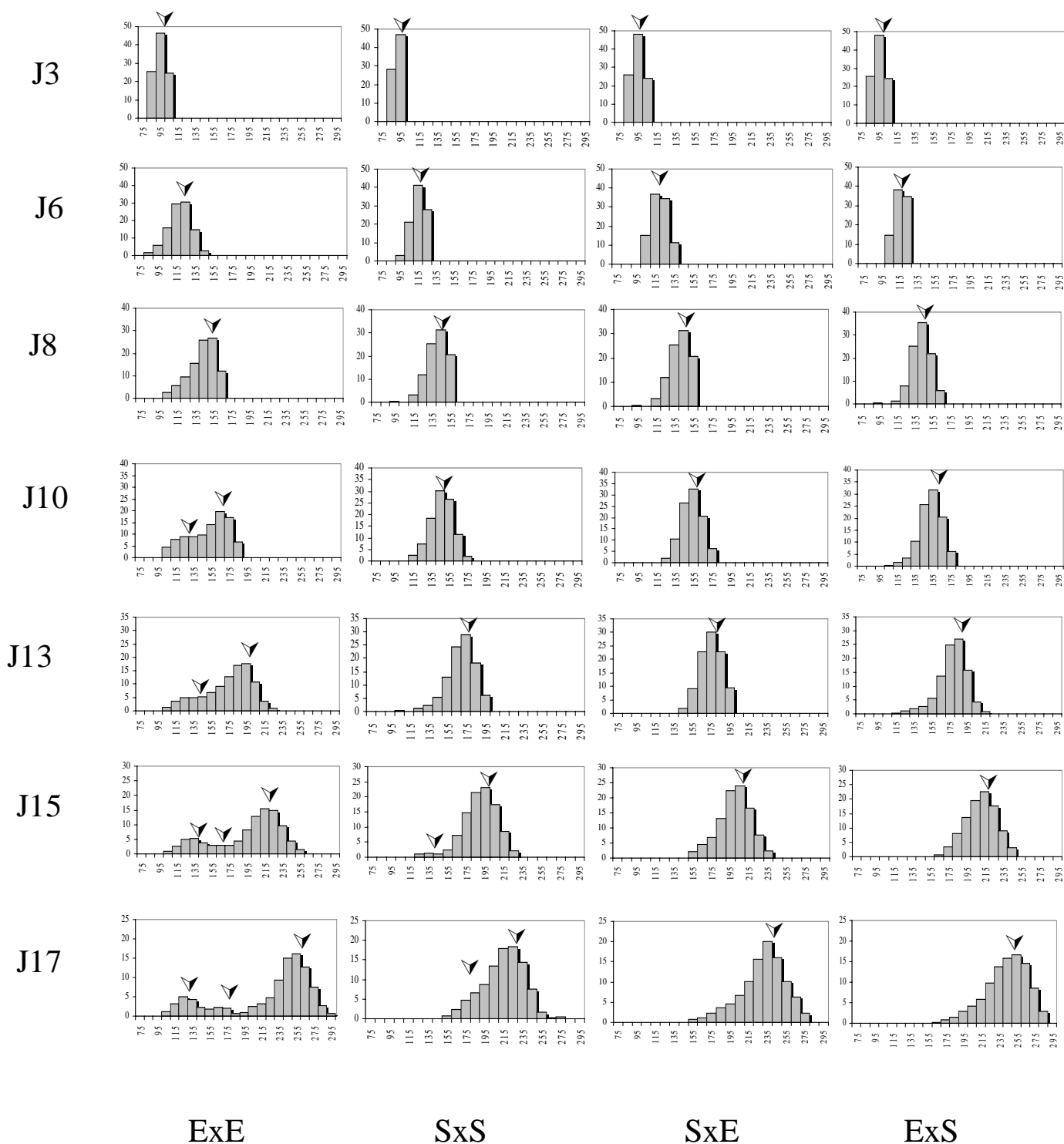


Tableau 22 : Décomposition modale des distributions de fréquence de taille pour les quatre types de croisement (pour les réplicats mentionnés).

Jour	Mode	Moyenne	SD	Effectif (%)	Mode	Moyenne	SD	Effectif (%)	Mode	Moyenne	SD	Effectif (%)	Mode	Moyenne	SD	Effectif (%)				
3	ExE	1	94,8	7,2	100,0	SxS	1	91,3	5,0	100,0	SxE	1	94,8	7,1	100,0	ExS	1	94,9	7,1	100,0
6		1	116,4	12,3	100,0		1	115,1	8,0	100,0		1	119,3	8,9	100,0		1	117,3	7,2	100,0
8		1	133,3	13,4	38,9		1	137,1	11,9	100,0		1	140,6	11,2	100,0		1	143,8	10,9	100,0
		2	152,4	8,5	61,2															
10		1	127,3	14,1	40,0		1	146,5	12,7	100,0		1	152,9	11,4	100,0		1	151,9	12,8	100,0
		2	166,5	11,1	60,0															
13		1	138,3	18,1	28,4		1	169,6	15,2	100,0		1	174,6	11,9	100,0		1	177,7	16,3	100,0
		2	187,6	15,5	71,6															
15		1	128,5	12,0	15,9		1	133,4	7,5	2,7		1	199,1	17,1	100,0		1	210,6	16,9	100,0
		2	164,7	20,9	15,9		2	190,5	16,1	97,8										
		3	217,2	16,7	68,2															
17		1	126,1	12,0	11,5		1	180,6	12,4	14,9		1	229,2	24,3	100,0		1	240,7	24,1	100,0
		2	173,5	29,2	20,7		2	223,7	16,9	82,6										
		3	247,1	18,0	67,8															

inférieure (CV = 15,37) mais intermédiaire aux valeurs de larves issues des croisements hybrides (CV = 12,69 (ExS); CV = 12,19 (SxE)).

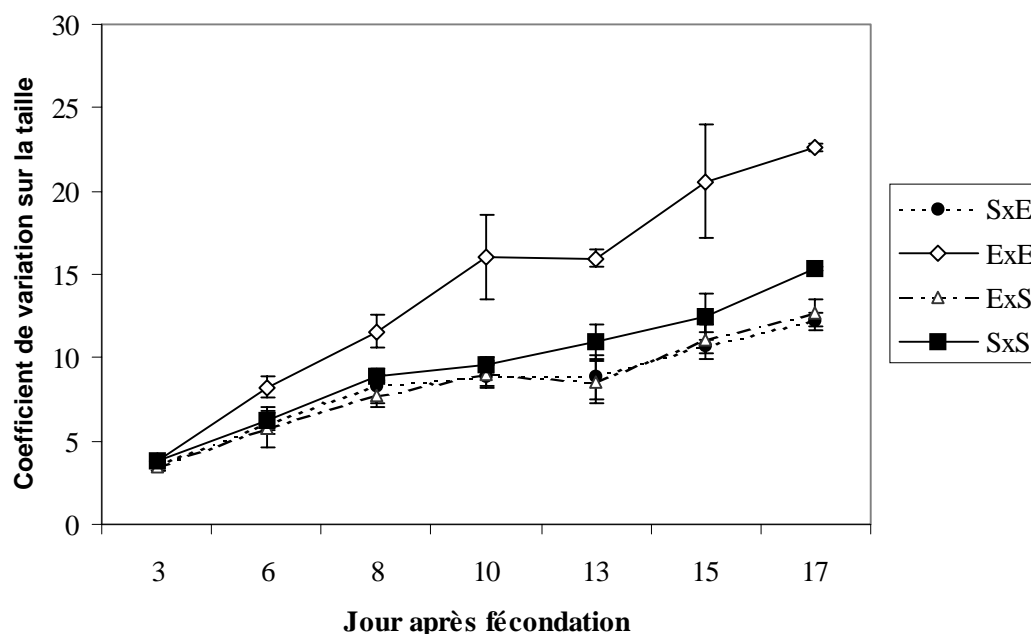


Figure 31 : Evolution temporelle des coefficients de variation sur la taille.

2.3 Survie

La survie des larves issues du croisement ExE est significativement plus faible (SxE, $F = 9,41$, $p = 0,05$; SxS, $F = 11,25$, $p = 0,028$), sauf comparée avec la survie des larves ExS (figure 32). Les larves SxS montrent le meilleur taux de survie à J20, mais ne diffèrent cependant pas statistiquement des valeurs obtenues pour les descendants hybrides ($p = 0,38$ et $p = 0,72$).

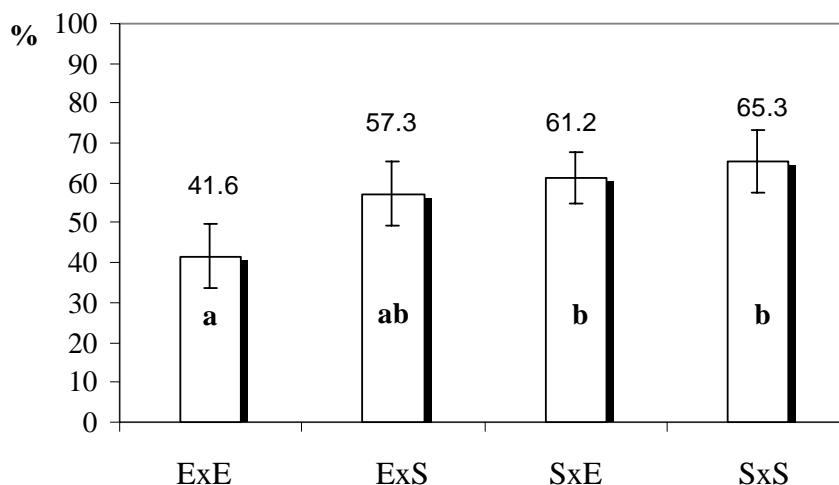


Figure 32 : Pourcentages moyens de survie 20 jours a.f. pour chaque type de croisement. Les histogrammes qui partagent une lettre ne sont pas significativement différents. Dans le cas contraire, ils diffèrent au risque $p < 0,05$.

2.4 Taux de fixation

Pour l'ensemble des lots, la fenêtre temporelle de fixation s'étend sur 12 jours (entre 20 et 32 jours a.f., figure 33). Pour le croisement ExE, 90% des larves pédivéligères sont présentes dans les six premiers jours. Les effectifs observés après cette période restent résiduels (moins de 10%). La population de larves à croissance plus lente décrite par la décomposition modale n'apparaît pas ici. La distribution des effectifs pour les autres croisements est plus progressive et se rapproche d'une normale. Par ailleurs, les résultats de l'estimation globale du taux de fixation donnent les valeurs respectives suivantes : 90,7% (ExE), 72,3% (SxS), 78,1% (ExS) et 68,7 (SxE).

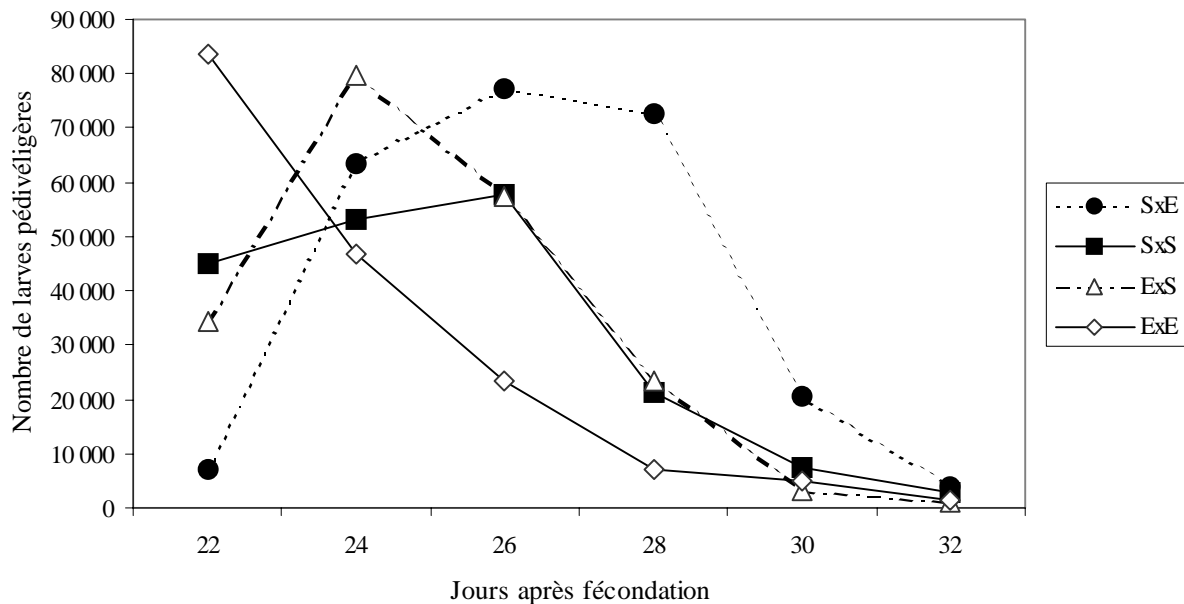


Figure 33 : Evolution temporelle des effectifs de larves pédivéligères.

IV. Discussion

Les pressions sélectives en phase larvaire peuvent être multiples, comme l'ont montré les chapitres précédents. Un des objectifs majeurs de l'aquaculture est de produire des organismes dont les performances sont améliorées. La majorité des études relatives à la sélection des huîtres porte sur l'évaluation des bases génétiques de la croissance, premier critère d'intérêt zootechnique (Sheridan, 1997). Une question que l'on peut se poser est de savoir si les écloséries commerciales sélectionnent des larves à croissance plus rapide, et ce de façon plus ou moins intentionnelle. Cet aspect est d'autant plus intéressant si l'on considère possible une sélection précoce ayant des effets sur des caractères ultérieurs en terme de croissance, survie et/ou succès reproducteur. Un autre aspect tout aussi important à considérer vient de la perte de diversité des stocks de géniteurs observés dans le chapitre 1 sur laquelle on peut également s'interroger en terme de performances de la descendance (c'est-à-dire expression de la dépression de consanguinité).

L'expérience dans ce quatrième chapitre, décrivant l'évolution phénotypique des caractères larvaires de croissance et de survie, permet d'avancer quelques éléments de réponse.

Tout d'abord, en se basant sur les histogrammes des fréquences de taille, nous avons observé deux types de motifs en fonction de l'origine du croisement entrepris. Ces motifs sont confirmés par l'évolution temporelle des coefficients de variation sur la taille au cours de l'élevage. Les descendants du croisement ExE présentent une plus grande variabilité dans la distribution des tailles. La bimodalité observée 10 jours a.f. se confirme dans le temps pour aboutir à la distinction de deux (voir trois) sous-groupes de population. A noter que les réplicats non représentés dans la figure 30 suivent une tendance similaire aux réplicats choisis pour symboliser chaque croisement. La distribution des fréquences de taille semble distinguer un groupe de larves à croissance lente, d'un groupe à croissance rapide. Ni les hybrides, ni les larves issues du croisement SxS ne montrent la même évolution.

Un autre point remarquable de cette expérience tient dans les valeurs de survie et de succès à la fixation observées. En effet, la survie 20 jours a.f. pour le croisement ExE est globalement inférieure aux trois autres. Seulement 41,6% des larves présentes 3 jours a.f. le sont encore 20 jours a.f., date précédant les étapes de fixation. En revanche, le succès à la fixation pour ces mêmes larves est largement supérieur puisque atteignant 90,7% contre des valeurs comprises entre 68,7% et 78,1%.

Les larves qui composent ce que l'on a précédemment nommé 'larves à croissance lente' pour les larves ExE (taille comprise entre 110 et 175 μ m) ne sont pas arrivées, au terme de l'élevage, à l'étape de fixation. Pour preuve, l'évolution des effectifs de larves pédivéligères qui compte tenu des distributions des fréquences de taille 17 jours a.f. devrait montrer une augmentation des effectifs en fin de fenêtre temporelle. Or seule la fraction de larves dites 'à croissance rapide' apparaît dans ces effectifs de fixation.

L'observation de l'évolution phénotypique des larves semble dégager deux tendances pour ce lot issu de géniteurs d'écloserie : présence d'une sous-population à croissance lente qui meurt progressivement avant d'arriver à fixation, contrastant avec une seconde sous-population, à croissance plus rapide, dont les taux de fixation sont supérieurs à ceux des autres lots.

Pour expliquer la première sous-population, l'hypothèse d'un effet de dépression de consanguinité peut être avancée. Ce phénomène de dépression a déjà été étudié par de nombreux travaux qui ont examiné les performances de descendants issus de croisement de plein-frères ou de lignées consanguines créées à partir d'hermaphrodites autoféconds ($0,25 < F < 0,5$), et a été observé aux stades larvaires pour différentes espèces de bivalves : Bierne et al. 1998, (*Ostrea edulis*) ; Longwell & Stiles, 1973 (*Crassostrea virginica*); Beaumont & Budd, 1983 (*Pecten maximus*); Ibarra et al., 1995 (*Argopecten circularis*)), et Hedgecock et al., 1995 (*Crassostrea gigas*). De surcroît, Launey & Hedgecock (2001) ont documenté l'existence d'un fardeau génétique important porté par *C. gigas*. L'évolution observée des caractères phénotypiques dans cette expérience pourrait être le résultat de l'expression de ce fardeau génétique déclenché par un croisement entre individus issus d'une petite population aux liens de parenté suffisamment importants.

C'est pourquoi nous avons déterminé la moyenne des coefficients de parenté ainsi que la distribution des fréquences pour les deux populations parentales. Il en ressort une valeur moyenne de r_{xy} pour la population domestiquée près de six fois supérieure à celle de la population sauvage (0,068 contre 0,012). A titre indicatif, pour des relations de parenté de type cousins germains, r_{xy} est égal à 1/16. Cela pourrait être suffisant pour mener à l'expression d'une dépression de consanguinité. La dépression de consanguinité résulte entre autre du fait que la consanguinité augmente la probabilité pour un individu d'être homozygote pour des allèles récessifs délétères (Lynch & Walsh 1998). Ces effets récessifs délétères sont connus pour être la cause principale de la dépression de consanguinité (Charlesworth & Charlesworth 1999), et plus spécialement chez *C. gigas* (Launey & Hedgecock 2001).

Evans et al. en 2004, après deux saisons de croissance, ont pu mettre en évidence un effet significatif sur le rendement et la croissance individuelle observés pour des familles avec de faibles valeurs de F (coefficient de consanguinité) ($F = 0,0625$; $p < 0,01$). Certes, il ne s'agit pas dans cette étude, d'effet au stade larvaire, mais cela souligne la possibilité d'observer les effets de la consanguinité avec des valeurs de F relativement faibles, en tout cas comparables au coefficient de parenté moyen de la population d'écloserie (0,068), sachant que le coefficient de consanguinité d'un individu est égal au coefficient de parenté de ses deux parents.

Il semble également plausible que la sous-population, à croissance plus rapide, mais surtout présentant les meilleurs taux de fixation, soit le résultat d'un effet de sélection. La mortalité de la sous population 'croissance lente' pourrait réduire la densité et par conséquent expliquer le fait que les larves subsistantes puissent croître plus vite. Cependant, cet éventuel effet densité n'explique pas le fait que le succès à la métamorphose soit plus élevé.

Pour illustrer cette possible sélection de larves à croissance rapide, une simulation basée sur l'« équation des sélectionneurs » peut être utilisée. Pour mémoire, cette équation montre que la réponse à la sélection est d'autant plus rapide que la variance génétique additive est élevée et que le gradient de sélection est fort. Prenons le cas des croissances observées au cours de l'expérience sur l'effet du tamisage. Soit, 17 jours après fécondation, la moyenne des tailles de larves de la condition avec tamisage sélectif qui est égale à $275,2\mu\text{m}$ ($=\mu^*(n)$) et celle des tailles de larves sans tamisage sélectif égale à $250,8\mu\text{m}$ ($=\mu(n)$). Soit $\mu(n+1)$ la taille moyenne de larves à la génération $n+1$ issues d'une population où 50% des plus petites larves ont été éliminées. Ainsi d'après l'« équation des sélectionneurs » :

$$\mu(n+1) - \mu(n) = h^2 (\mu^*(n) - \mu(n))$$

Si l'on fait l'hypothèse que h^2 (héritabilité stricte) est égale à 0,11 (valeur calculée en condition d'élevage à 26°C d'après le chapitre 3), on peut ainsi avoir une idée théorique du gain sur la taille des larves (avant fixation) que l'on pourrait observer après plusieurs générations. Après une génération de sélection par un tamisage similaire au chapitre 2 (ajoutée à une température d'écloserie avoisinant les 26°C), le gain est de $2,7\mu\text{m}$. Après 7 générations, ce gain serait de $13,6\mu\text{m}$. Dans ce chapitre 4, nous observons une différence d'une vingtaine de μm entre la sous-population de larves « à croissance rapide » issue du croisement ExE et la moyenne modale la plus élevée des larves issues du croisement SxS. Ce calcul permet de mettre en évidence, de façon numérique, le fait que des larves à croissance rapide puissent être sélectionnées et permet de valider notre observation.

Cette partie sur une réponse à la sélection mérite cependant d'être approfondie avec la mise en place de protocole incluant des points d'échantillonnage plus tardifs dans le temps, comme par exemple 1 an après métamorphose de façon à confirmer l'avantage sélectif sur la croissance (infirmant ou non les conclusions de Newkirk et Haley (1982) et Newkirk (1981b)).

Autrement dit, l'évolution phénotypique des larves ExE pourrait résulter de l'opposition de deux effets : d'une part l'expression du fardeau éliminant une partie de la population, d'autre part des larves à croissance relativement rapide ayant des taux de fixation meilleurs que les témoins. Il s'agit ici d'une description de l'évolution des paramètres à l'échelle phénotypique. Cela n'a pas été réalisé ici (le traitement de données de taille de larve n'a pu être réalisé en temps réel) mais il aurait été intéressant de connaître la composition génotypique des sous populations larvaires afin de confirmer ou non les hypothèses de consanguinité évoquées. Il serait également intéressant d'utiliser d'autres marqueurs afin d'accéder aux méthodes de partition susceptibles de fournir une image robuste des relations entre individus à l'intérieur des populations.

Bilan-synthèse

✓ Cette expérience a été menée avec l'intention d'étudier les conséquences de sélection différentielle en phase larvaire, compte tenu des résultats des expériences traitées dans les chapitres 2 et 3.

✓ L'évolution des courbes de survie et de croissance des larves issues de géniteurs d'un stock d'écloserie pourrait résulter de l'opposition de deux effets :

- d'une part l'expression du fardeau éliminant une partie de la population,
- d'autre part des larves à croissance relativement rapide ayant des taux de fixation meilleurs que les témoins.

✓ L'hypothèse d'expression du fardeau génétique est soutenue par les calculs des coefficients de parenté (Ritland, 1996) à l'intérieur de la population d'écloserie dont la valeur moyenne est près de cinq à six fois supérieure à celle de la population sauvage.

CONCLUSION-SYNTHESE

Synthèse

La question de la domestication des espèces est récurrente en aquaculture, du fait des enjeux économiques qu'elle représente à travers la mise en place de nouvelles productions ou la pérennisation et l'amélioration de production issue du milieu naturel.

Le terme domestication, appliqué à l'huître ou plus largement à toute espèce aquacole, signifie souvent la mise au point des méthodes d'élevage et la compréhension de ses besoins, devant aboutir à un cycle de production totalement maîtrisé. On pourrait qualifier cette approche de domestication zootechnique, qui est assez différente de la définition génétique généralement admise.

Les mollusques marins occupent une place originale parmi les animaux d'élevage, car la plupart des espèces sont encore peu, voire pas domestiquées. La particularité du cycle de vie, alternant phase larvaire libre et adulte benthique, ne permet pas toujours une maîtrise complète des cycles d'élevage et de reproduction. Pour *Crassostrea gigas*, les techniques de reproduction en milieu contrôlé sont relativement bien maîtrisées grâce à un savoir-faire acquis depuis maintenant plusieurs décennies, permettant désormais d'alimenter de manière croissante une production dominée en France par le captage naturel. Que la reproduction soit issue d'écloserie ou du milieu naturel, le reste du cycle d'élevage est réalisé dans le milieu naturel. La phase larvaire est la seule phase, par conséquent, particulièrement « sensible » aux effets potentiels de la domestication.

La question de la domestication se pose pour cette espèce, à la fois sur un plan très pratique de maintien de la variabilité génétique, nécessaire à un élevage performant, mais aussi en terme de sélection de caractères pour l'élevage et de la manière de l'orienter en fonction des objectifs.

La domestication dans sa dimension zootechnique s'accompagne de modifications dont les aspects génétiques ne sont peu ou pas maîtrisés. La phase larvaire tient une place toute particulière dans le cycle d'élevage. Cette dernière représente tout au plus une vingtaine de jours, soit une part minime à l'échelle d'un cycle complet de production (trois ans en moyenne). Cependant, c'est sûrement au cours de cette phase que les paramètres d'élevage sont les plus contrôlés et s'éloignent le plus de ceux existant dans le milieu naturel.

L'objectif général de ce travail de thèse a été donc d'identifier au travers de certaines pratiques zootechniques d'élevage en phase larvaire, les conséquences génétiques sous-

jaçentes d'une activité de production intensive. Il s'agit par conséquent d'une étape dans la compréhension globale du phénomène de domestication chez *C. gigas*.

Notre étude a plus particulièrement porté sur deux pratiques dont il semblait pertinent d'analyser les conséquences :

- l'effet des tamisages sélectifs (sélection sur le taux de développement larvaire).
- l'effet d'un facteur majeur de l'environnement d'élevage : la température.

Nous aurions légitimement pu envisager l'influence d'autres paramètres tel la nutrition, ou même la combinaison de plusieurs facteurs. La température a été choisie car il s'agit effectivement d'un des facteurs les plus prépondérants dans les processus de développement larvaire, mais aussi car plus accessible dans une approche expérimentale compte tenu du caractère aléatoire que peut revêtir un élevage de larves d'huîtres. La nutrition est un facteur plus délicat à maîtriser. Pour exemple, les trois expériences mises en œuvre au cours de cette thèse utilisent des rations alimentaires différents, en fonction de la disponibilité et de la qualité des souches phytoplanctoniques utilisées.

L'influence de la température a été abordée via une démarche qui se rapproche de la génétique quantitative, et ce afin d'aborder les réponses de la variance génétique face à un environnement particulier. La volonté d'étudier l'influence du tamisage sélectif a été évidente mais cette fois dans une démarche d'analyse de la diversité génétique donc plus dans un aspect descriptif de génétique des populations.

Pour parvenir à examiner ces différents aspects, l'approche consistant à élever en mélange des larves issues de géniteurs différents a initialement été mise au point. Enfin, la comparaison de larves issues de géniteurs sauvages et domestiques nous a permis de tenter de tester nos hypothèses concernant la réponse aux pressions de sélection en phase larvaire.

I. Pertinence de l'approche « famille en mélange »

L'élevage des larves en mélange constitue une approche originale de la problématique. Déjà fréquemment utilisée pour certaines espèces de poissons, elle est en revanche relativement nouvelle pour les bivalves. Malgré un coût initial lié aux génotypes, elle permet d'augmenter le nombre de familles étudiées (donc la puissance de l'analyse génétique) et de s'affranchir des hétérogénéités environnementales qui biaisent les estimations des effets

génétiques. Grâce à seulement trois marqueurs dont la variabilité allélique est d'environ 30 allèles en populations sauvages, l'assignation de parenté offre des résultats satisfaisants. Ainsi pour l'ensemble des expériences menées, sur les 4032 larves individualisées pour génotypage, 3369 ont pu être assignées avec certitude à un couple de géniteurs (soit 84%). La difficulté d'extraction d'ADN explique les 16% manquants. En cela, les méthodes de conservation des larves paraissent perfectibles, différents tampons de conservation pourraient ainsi être testés afin de remplacer l'éthanol classiquement utilisé. Malgré cela, la méthode d'extraction couplée au multiplexage permet une analyse simple et efficace pour optimiser les assignations de parenté. Cela est également dû au fait que nous avons choisi les génotypes des géniteurs impliqués dans les croisements des expériences des chapitres 2 et 3 (plutôt que de les prendre au hasard). Compte tenu de la courbe théorique d'assignation calculée au chapitre 1, il est clair que le pouvoir résolutif du jeu de marqueurs est moins performant dans le cas où les géniteurs ne seraient pas ainsi choisis. Cependant, il existe désormais un nombre de marqueurs microsatellites suffisamment abondant (Magoulas et al., 1998 ; Huvet et al., 2000 ; Li et al., 2003 ; Sekino et al., 2003a; Hubert & Hedgecock, 2004 ; Yamtich et al., 2005) pour déterminer aisément d'autres jeux de marqueurs afin d'améliorer cette résolution ; mais cela sera associé à un coût forcément supérieur. Concernant la capacité d'analyse de la diversité des stocks de géniteurs, ce jeu de marqueurs constitue également un outil précieux car rapide et informatif.

II. Conséquences pratiques des pressions de sélection en phase larvaire

Concernant les résultats obtenus à partir de ces outils, ils permettent d'en savoir plus sur l'évolution des paramètres génétiques et phénotypiques en phase larvaire.

Considérant dans un premier temps l'effet du tamisage, nous sommes confrontés à deux résultats, qui considérés l'un sans l'autre, peuvent mener à des interprétations différentes. Les résultats d'un point de vue phénotypique, montrent que la sélection sur la taille a un effet plus important sur la variabilité des tailles de larves, homogénéisant ces dernières, que sur la croissance moyenne. Ces résultats suggèrent que le tamisage sélectif induisant une élimination des petites larves, est une procédure permettant un gain de temps à la fixation, aboutissant à une réduction de production relativement limitée du fait de la meilleure survie relative et du meilleur succès à la fixation des larves à croissance rapide. D'un point de vue génétique, il y a cependant un risque substantiel de perte de diversité lié à cette pratique.

Laing & Earl (1998) ont déjà souligné de l'importance des cohortes tardives dans le but de minimiser les effets de dérive génétique dans les stocks d'écloserie et ont proposé le maintien de l'ensemble de la population larvaire pour la production de naissain. Nos données confirment leurs hypothèses. Le maintien de ces cohortes tardives est important car il permet de minimiser la variabilité du succès reproducteur entre géniteurs (que l'on sait importante chez *C. gigas*) et de fait, de maximiser la variabilité génétique des lots résultants.

Ces résultats font écho aux estimations de variabilité sur les stocks d'écloseries commerciales où l'on peut constater une diversité allélique faible, comparée à celle de la population témoin échantillonnée en milieu naturel (chapitre 1). Ils renvoient également à l'expérience du chapitre 4 révélant l'expression supposée d'un fardeau génétique en phase larvaire. Les effets négatifs de croisements entre apparentés (dépression de consanguinité) sont présumés, non plus cette fois dans des croisements expérimentaux visant à générer de la consanguinité, mais dans un cadre concret d'une population d'écloserie commerciale. Dans le cas décrit au cours du chapitre 4, l'effet positif de la sélection sur la taille (meilleur succès à la métamorphose) s'oppose à l'expression présumée du fardeau génétique. Par ailleurs, le bénéfice apparent de la sélection des larves à croissance rapide peut aussi être discuté. Différentes études rapportent une corrélation positive entre caractères au stade larvaire (croissance le plus souvent) et post-larvaire permettant d'envisager positivement une pratique de tamisage (*C. gigas* : Collet et al., 1999, *C. virginica* : Newkirk et al. 1977, Haley & Newkirk, 1978 ; Losee, 1979). Newkirk & Haley (1982) et Newkirk (1981b) discutent cependant le fait que cet avantage en phase précoce de développement tend à disparaître avec le temps, même si ce dernier peut se retrouver dans les premiers mois après métamorphose. De plus, l'existence d'une corrélation génétique négative entre croissance larvaire et succès à la métamorphose (Ernande et al., 2003), ne plaide pas en faveur d'un tamisage sélectif.

L'influence de la température, au travers d'une expression plus précoce (en condition chaude) de la variabilité génétique sur un caractère comme la croissance, doit également être prise en compte. La variabilité génétique pour la croissance larvaire s'exprimant précocément à 26°C (température proche de celles appliquées en conditions contrôlées d'écloserie), l'effet du tamisage au cours du développement larvaire est d'autant plus significatif sur la perte de diversité.

On peut conclure que le tamisage sélectif ne semble pas trouver de véritable appui en terme de pratique systématique, en tout cas du point de vue de diversité génétique. Car il est aussi évident que l'élimination des « queues de lot » peut, dans un contexte sanitaire, être utile

de façon à éviter le développement d'éléments pathogènes ou une dégradation du milieu d'élevage liés à la décomposition des larves mortes. Il reste à déterminer la limite entre un tamisage « trop sélectif » pour la diversité génétique des stocks et un tamisage préservant cette diversité et permettant aux écloséries de réaliser un élevage dans des délais compatibles avec les contraintes économiques et/ou zoosanitaires de production.

Considérant l'effet de la température, il semble plus difficile de tirer des conclusions claires. Nous avons vu que la variabilité génétique pour la taille est exprimée plus précocement durant l'élevage des bacs maintenus à 26°C. Cette température est, comme montré à de nombreuses reprises, favorable à un développement larvaire optimal de l'espèce. Ainsi, les taux de survies et de fixation à 20°C sont nettement plus faibles. De surcroît, la température en phase larvaire interagit avec la croissance des juvéniles et l'hypothèse d'une corrélation positive entre croissance larvaire et juvénile est partiellement soutenue puisque uniquement démontrée à 20°C. C'est incontestablement en association avec une pratique de tamisage sélectif que l'influence de la température est intéressante tant celle-ci permet une expression supérieure de la variabilité génétique (comme montré par les estimations d'héritabilité).

Perspectives

Comme souvent, cette thèse soulève plus de questions qu'elle n'en résout (Ernande, 2001). Cependant elle apporte des éclaircissements sur les processus sélectifs appliqués en éclosérie. Il apparaît de façon assez claire que les conséquences des pressions de sélection que nous avons envisagées sont importantes en terme de gestion de la variabilité. Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de définir un ratio optimal d'élimination, qui à la fois pourrait minimiser la perte relative de naissain et maximiser la réduction de variabilité dans la fenêtre temporelle de fixation. La répétabilité des résultats présentés dans le chapitre 2 reste également à examiner.

La partie concernant une réponse à la sélection mérite aussi d'être approfondie avec la mise en place de protocole incluant des points d'échantillonnage plus tardifs dans le temps, comme par exemple 1 an après métamorphose de façon à confirmer l'avantage sélectif sur la croissance.

Les résultats obtenus dans ce contexte très particulier de domestication pourraient également d'être confirmés et développés, suivant cette fois une approche plus fondamentale

de génétique quantitative, focalisée entre autre sur les bases génétiques (et leur plasticité) de caractères larvaires d'intérêt. L'approche famille en mélange doit permettre de considérer ces éléments dans un contexte environnemental « standard ».

De façon plus générale, il serait important d'envisager un effort supplémentaire sur le développement de jeux de marqueurs. Le jeu de trois marqueurs est un outil précieux mais on pourrait aisément le compléter par d'autres car plus d'une centaine sont aujourd'hui disponibles. Leur intérêt tiendrait notamment dans la possibilité de choisir au mieux les géniteurs à l'origine de nouveaux stocks en minimisant leur apparentement. Cela fait écho au concept de « parenté minimale » (« minimal kinship ») envisagé pour les élevages de poissons par de nombreux auteurs (Ballou & Lacy, 1995 ; Doyle et al., 2001 ; Taniguchi, 2003 ; Russello & Amato, 2004 ; Sekino et al., 2004). Le principe est de déterminer et de privilégier les individus présentant une « parenté » minimale, minimisant l'effet de dérive et de consanguinité. Cette approche repose sur le calcul des coefficients du type de ceux employés dans le chapitre 4.

Enfin, l'approche famille en mélange, qui dans ce projet a été focalisée sur le stade larvaire, pourrait cette fois-ci être mise en oeuvre pour des stades plus tardifs. Elle constituerait une première chez *C. gigas*, permettant de compléter les données issues des approches plus classiques d'élevage en familles séparées, même si des questions subsistent quant à sa faisabilité. A quel moment du cycle de vie est-il le plus judicieux de mélanger les familles en répartition égale, sans déséquilibrer cette répartition une fois les huîtres placées sur les parcs d'élevage ? Nous avons vu que l'espèce est caractérisée par une forte variance du succès reproducteur, associée à la possibilité d'expression du fardeau génétique. Il n'est pas sûr qu'un mélange en phase larvaire serait le plus approprié.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Hamid, M.E., Mona, M.H., Khalil, A.M., 1992. Effects of temperature and food concentrations on the growth of the larvae and spat of the edible oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of the Marine Biology Association, India*, 34 (1,2) : 195-202.
- Aldana-Aranda, D., Baqueiro, C., Suarez, V.P., 2001. Overview of temperatures used in larviculture of *Strombus* spp. *Proceedings Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 52 : 327-339.
- Amos, W., Sawcer, S.J., Feakes, R.W., Rubinztein, D.C., 1996. Microsatellites shows directional bias and heterozygote instability. *Nature Genetics*, 13 : 390-391.
- Anderson, E.C., 2005. An efficient Monte Carlo method for estimating N_e from temporally spaced samples using a coalescent-based likelihood. *Genetics*, 170 : 955 – 967.
- Anderson, E.C., Williamson, E.G., Thompson, E.A., 2000. Monte Carlo evaluation of the likelihood for N_e from temporally spaced samples. *Genetics*, 156 : 2109-2118.
- Auby, I., Maurer, D., 2004. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon- Rapport final. R.INT.DEL/AR 04.03, 201 p.+ Annexes.
- Baker, S.M., Mann, R., 1994. Description of metamorphic phases in the oyster *Crassostrea virginica* and effects of hypoxia on metamorphosis. *Marine Ecology Progress Series*, 104 : 91-99.
- Ballou, J.D., Lacy, R.C., 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed population. In Ballou, J.D., Gilpin, M., Foose, T.J. (Eds.), *Population Management for Survival and Recovery*. Columbia Univ. Press, New York, 76-111.
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N., 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11 : 155–165.
- Bardach, J.E., Ryther, J.H., McLarney, W.O., 1972. *Aquaculture, the farming and husbandry of freshwater and marine organisms*. New York, Wiley-Interscience.
- Barton, N.H., Turelli, M., 1989. Evolutionary quantitative genetics : How little do we know ? *Annual Review of Genetics*, 23 : 337-370.
- Beaumont, A.R., Budd, M.D., 1983. Effects of self-fertilisation and other factors on the early development of the scallop *Pecten maximus*. *Marine Biology*, 76 : 285-289.
- Becker, W.A., 1984. *Manual of quantitative genetics*. Fourth edition. Academic Enterprises. Pullman : 190 p.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

- Berthier, P., Beaumont, M.A., Cornuet, J.M., Luikart, G., 2002. Likelihood-Based estimation of the effective population size using temporal changes in allele frequencies : A genealogical approach. *Genetics*, 160 : 741-751.
- Bhattacharya, C.G., 1967. A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. *Biometrics*, 23 : 115-135.
- Bierne, N., Launey, S., Naciri-Graven, Y., Bonhomme, F., 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, 148 : 1893-1906.
- Blouin, M.S., 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 : 503-511.
- Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F., Gérard, A., 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226 : 279-291.
- Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., Hervouet, V., Bonhomme, F., 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, 204: 283-296.
- Boudry, P., Heurtebise, S., Lapègue, S., 2003a. Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* specimens : a new oyster species in Hong Kong ? *Aquaculture*, 228 : 15-25.
- Boudry, P., Collet, B., Heurtebise, S., Morand, B., Gérard, A., 2003b. Individual growth performance of juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): stability over time and interaction with survival. *Aquaculture International*, 11 : 429-448.
- Bougrier, S., Geairon, 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.
- Bougrier, S., Collet, B., Geairon, P., Geffard, O., Héral, M., Deslous-Paoli, J.M., 1998. Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219 : 205-216.
- Boulangé, F., Goyard, E., 1999. Fetii 1.0 Windows 9x based software for parentage analysis using codominant markers data and optional putative pedigree files. IFREMER, AQUACOP.
- Breese, W.P., Malouf, R.E., 1975. Hatchery manual for the Pacific oyster. *Oregon State Univ. Sea Grant Pub*, RE 54-4-75-002.
- Brookfield, J.F.Y., 1996. A simple new method for estimating null alleles frequency from heterozygote deficiency. *Molecular ecology*, 5 : 453-455.
- Brooks, W.K., 1879. Abstract of observations upon fertilization of oyster eggs and embryology of American oyster, *American Journal of Sciences*, New Haven, XVIII : 425-427.

- Buroker, N.E., Hershberger, W.K., Chew, K.K., 1979. Population genetics of the family Ostreidae : I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology*, 54 : 157-169.
- Busack, C.A., Currens, K.P., 1995. Genetic risks and hazards in hatchery operations : fundamental concepts and issues. *American Fisheries Society Symposium*, 15 : 71-80.
- Butler, K., Field, C., Herbinger, C.M., Smith, B.R., 2004. Accuracy, efficiency and robustness of four algorithms allowing full sibship reconstruction from DNA marker data. *Molecular Ecology*, 13 : 1589-1600.
- Caballerro, A., 1994. Developments in the prediction of the effective population size. *Heredity*, 73 : 657-679.
- Calabrese, A., Davis, H.C., 1970. Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve molluscs. *Helgoländer Wiss. Meeresunters*, 20 : 553-564.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C., Sutherland, G.R., 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52 : 922-927.
- Campton, D.E., 1995. Genetic effects of hatchery fish on wild populations of Pacific salmon and steelhead: what do we really know ? *American Fisheries Society Symposium*, 15 : 337-353.
- Carlson, B.K., 1982. Settlement and subsequent survival of commercially-reared eyed-pediveliger larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Shellfish Research*, 2 : 116.
- Cercueil, A., Bellemain, E., Manel, S., 2002. PARENTE : computer program for parentage analysis. *Journal of Heredity*, 93 : 458-459.
- Chakraborty, R., De Andrade, M., Daiger, S.P., Budowle, B., 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, 56 : 45-57.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T., 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16 : 11141-11156.
- Charlesworth, B., Charlesworth, D., 1999. The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research*, 74 : 329-340.
- C.N.C. Comité national de la Conchyliculture, organisation interprofessionnelle agricole, données 2004. <http://www.cnc-france.com>
- Collet, B., 1998. Etude des bases génétiques de la variabilité des caractères physiologiques impliqués dans la croissance de l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse d'université, INAPG.

- Collet, B., Boudry, P., Thebault, P., Heurtebise, S., Morand, B., Gérard, A., 1999. Relationship between pre- and post settlement growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 175 : 215-226.
- Comps, M., Duthoit, J.L., 1976. Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huitre portugaise *Crassostrea angulata*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 283 : 1595-1597.
- Crawford, A.M., Cuthbertson, R.P., 1996. Mutations in sheep microsatellites. *Genome Research*, 6 : 876-879.
- Crow, J.F., Denniston, C., 1988. Inbreeding and variance effective population numbers. *Evolution*, 42 : 482-495.
- Dakin, E.E., Avise, J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93 : 504-509.
- Danzmann, R.G., 1997. PROBMAX : a computer program for assigning unknown parentage in pedigree analysis from known genotypic pools of parents and progeny. *Journal of Heredity*, 88, 333.
- David, P., 1996. Structures génétiques et relation génotype-phénotype en milieu marin : le cas du bivalve *Spisula ovalis*. Mémoire de Thèse de Doctorat.
- Davis, G.P., Hetzel, D.J.S., 2000. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture Research*, 31 : 3-10.
- Dégremont, L., 2003. Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'hôte creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat de l'Université de Caen. 333 p.
- Denis, B., 2004. La domestication : un concept devenu pluriel. *Productions Animales*, 17 : 161-166.
- Deslous-Paoli, J.M., Héral, M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquatic Living Resources*, 1 : 239-249.
- Devakie, M.N., Ali, A.B., 2000. Effects of storage temperature and duration on the setting and post-set spat survival of the tropical oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino). *Aquaculture*, 190 : 369-376.
- Dillon, R.T., Manzi, J.J., 1987. Hard clam, *Mercenaria mercenaria*, broodstocks: Genetic drift and loss of rare alleles without reduction in heterozygosity. *Aquaculture*, 60 : 99-105.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B., 1994. Mutation processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91 : 3166-3170.
- Doyle, R.W., 1983. An approach to the quantitative analysis of domestication selection in aquaculture. *Aquaculture*, 33 : 167-185.

- Doyle, R.W., Herbinger, C.M., 1994. The use of DNA fingerprinting for high-intensity, within-family selection in fish breeding. In: *Proceedings of the Fifth World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Vol. 19. Dept. of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada : 364–371.
- Doyle, R.W., Perez-Enriquez, R., Takagi, M., Taniguchi, N., 2001. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genetica*, 111 : 291-304.
- Duchesne, P., Godbout, M.-H., Bernatchez, L., 2002. PAPA (package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Molecular Ecology Notes*, 2 : 191-193.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Chevassus, B., 2002. Optimization of factorial mating designs for inference on heritability in fish species. *Aquaculture*, 204 : 361-370.
- Dupuy, J.L., Windsor, N.T., Sutton, C.E., 1977. Manual for design and operation of an oyster seed hatchery for the American oyster *Crassostrea virginica*. Virginia Institute of Marine Science, *Special Report* No 142.
- Durand, P., Wada, K.T., Blanc, F., 1993. Genetic variation in wild and hatchery stocks of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, from Japan. *Aquaculture*, 110 : 27-40.
- Ellegren, H., 2004. Microsatellites : simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5 : 435-445.
- Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J., Klapper, P.E., 2000. Multiplex PCR: Optimisation and application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 : 1-12.
- Ernande, B., 2001. Développement, plasticité phénotypique et évolution. Thèse de Doctorat de l'Université de La Rochelle, 276 p.
- Ernande, B., Clobert, J., McCombie, H., Boudry, P., 2003. Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) : A quantitative genetics study. *Journal of Evolutionary Biology*, 16 : 399-411.
- Estoup, A., Largiader, C.R., Perrot, E., Chourrout, D., 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5 : 295-298.
- Estoup, A., Cornuet, J.M., 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data, pp. 50–65 in *Microsatellites : Evolution and Applications*, edited by D.B. Goldstein and C. Schlotterer. Oxford University Press, Oxford.
- Evans, F., Matson, S., Brake, J., Langdon, C., 2004. The effects of inbreeding on performance traits of adult Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 230 : 89-98.

- Evseev, G.A., Yakovlev, M., 1996. The anatomy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thurnberg) (Bivalvia : Ostreidae). *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 37 : 239-255.
- Ewens, W.J., 1979. Mathematical Population Genetics. *Springer-Verlag*, Berlin.
- Ewens, W.J., 1982. On the concept of effective population size. *Theoretical Population Biology*, 21 : 373-378.
- Fabioux, C., 2004. Origine et développement des cellules germinales de l'huître *Crassostrea gigas* : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale-Brest, 219 p.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edition, Harlow, England, Longman (Ed.), XV : 464p.
- FAO, 2004. Aquaculture production : quantities 1950-2003 Fishstat Plus.
<http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>
- Field, D., Wills, C., 1996. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 263 : 209-215.
- Fishback, A.G., Danzmann, R.G., Sakamoto, T., Ferguson, M.M., 1999. Optimization of semi-automated microsatellite multiplex polymerase chain reaction systems for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 172 : 247-254.
- FiSAT, 2002 (FAO-ICLARM Stock Assessment Tools). Gayanilo, F.C.Jr., Sparee, P., Pauly, D., Food and Agriculture Organization of the united nations, Rome.
<http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/fisat/downloads.htm>
- Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón-Ortiz, A.N., Arredondo-Vega, B.O., 2004. Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) spat. *Aquaculture Research*, 35 : 1131-1140.
- Frontier, S., Pichod-Viale, D., 1991. Ecosystèmes, structure, fonctionnement, évolution. *Masson*.
- Gaffney, P.M., Davis, C.V., Hawes, R.O., 1992. Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, 105 : 1-20.
- Gaffney, P.M., Allen, S.K., 1993. Hybridization among *Crassostrea* species : a review. *Aquaculture*, 116 : 1-13.
- Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull. U.S.*, 64 : 1-480.
- García-Esquivel, Z., Bricelj, V.M., González-Gómez, M.A., 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 263 : 77-103.

- Garcia de Leon, F.J., Canonne, M., Quillet, E., Bonhomme, F., Chatain, B., 1998. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 159 : 303-316.
- Gérard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launey, S., Heurtebise, S., Ledu, C., Phelipot, P., 1995. Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates. Relations « reproduction » et « génétique ». Groupe de travail sur la reproduction des mollusque, Nantes 14-15 novembre, 99-111.
- Gerber, S., Chabrier, P., Kremer, A., 2003. FaMoz: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers, *Molecular Ecology Notes*, 3 : 479-481.
- Gerdes, D., 1983. The Pacific Oyster *C. gigas*. Part 1 : feeding behaviour of larvae and adults. *Aquaculture*, 31 : 195-219.
- Giangrande, A., Geraci, S., Belmonte, G., 1994. Life-cycle and life-history diversity in marine invertebrates and the implications in community dynamics. *Oceanography & Marine Biology*, 32 : 305-333.
- Gill, P., Sparkes, R., Kimpton, C., 1997. Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *Forensic Science International*, 89 : 185-197.
- Ginot, F., Bordelais, I., Nguyen, S., Gyapay, G., 1996. Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. *Nucleic Acids Research*, 24 : 540-541.
- Gosling, E.M., 1982. Genetic variability in hatchery-produced Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 26 : 273-287.
- Gosling, E., 2003. Bivalve molluscs : biology, ecology and culture. *Fishing News Books*, Oxford, OX2 OEL, UK: 443 p.
- Gouletquer, P., 1997. Natural reproductive cycle of *Crassostrea gigas*. Proceedings : The natural and controlled reproduction of cultivated bivalves in France: *symposium report*, *Ifremer*, 7-19.
- Gouletquer, P., 2005. CABI Aquaculture Compendium. Chapter Culture aquatic animals species : *C. gigas*. CAB Publishers, 46p.
- Gouletquer, P., Wolowicz, M., Latala, A., Geairon, 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. *Aquatic Living Resources*, 12 : 271-277.
- Glover, K.A., Taggart, J.B., Skalla, Ø., Teale, A.J., 2001. Comparative performance of juvenile sea trout families in high and low feeding environments. *Journal of Fish Biology*, 59 : 105-115.

- Glover, K.A., Taggart, J.B., Skalla, Ø., Teale, A.J., 2004. A study of inadvertent domestication selection during start-feeding of brown trout families. *Journal of Fish Biology*, 64 : 1168-1178.
- Grassé, P.P., 1960. *Traité de zoologie. Mollusques Lamellibranches*, Tome V (2). Paris, Ed. Masson et Cie, 2219 p.
- Grizel, H., Héral, M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. Cons. int. Explor. Mer*, 47 : 399-403.
- Haag, W.R., Garton, D.W., 1995. Variation in genotype frequencies during the life history of the bivalve, *Dreissena polymorpha*. *Evolution*, 49 : 1284-1288.
- Haley, L.E., Newkirk, G.F., Waugh, D.W., Doyle, R.W., 1975. A report on the quantitative genetics of growth and survivorship of the american oyster, *Crassostrea virginica* under laboratory conditions. 10th European symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, 1 : 221-228.
- Haley, L.E., Newkirk, G.F., 1978. Selecting oysters for faster growth. *Proceedings of the World Mariculture Society*, 8 : 557-564.
- Harris, R.B., Allendorf, F.W., 1989. Genetically effective population size of large mammals : an assessment of estimators. *Conservation Biology*, 3 : 181-191.
- Harry, H.W., 1985. Synopsis of the supraspecific classification of living oysters (Bivalvia : Gryphaeida and Ostreidae). *Veliger*, 28 : 121-158.
- Hasselblad, V., 1966. Estimation of parameters for a mixture of normal distributions. *Technometrics*, 8 : 431-444.
- Haure, J., Huvet, A., Palvadeau, H., Nourry, M., Penisson, C., Martin, J.L.Y., Broudry, P., 2003. Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture*, 218 : 539-551.
- Haws, M.C., DiMichele, L., Hand, S.C., 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2 : 207-217.
- Hedgecock, D., 1988. Can the Pacific oyster be domesticated? In : West coast mollusc culture : a present and future perspectives (Amadei R. Ed). Sea Grant Program, California. 69-72.
- Hedgecock, D., 1994. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms ? In Beaumont A.R. (ed.) *Genetics and evolution of aquatic organisms*. London: Chapman and Hall : 122-134.
- Hedgecock, D., Sly, F., 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 88 : 21-38.

- Hedgecock, D., Chow, V., Waples, R.S., 1992. Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies. *Aquaculture*, 108 : 215-232.
- Hedgecock, D., McGoldrick, D.J., Bayne, B.L., 1995. Hybrid vigor in Pacific oysters : an experimental approach using crosses among inbred lines. *Aquaculture*, 137 : 285-298.
- Hedrick, P.W., 1999. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53 : 313–318.
- Helm, M.M., Millican, P.F., 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 11 : 1-12.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO, Fisheries Technical Paper No.471, Rome, 200 p.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR : critical parameters and step-by-step protocol. Research Reports, *Biotechniques*, 23 : 504-511.
- Héral, M., 1990. L'ostréiculture française traditionnelle. In Barnabé Edt., Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, Tec et Doc, VI : 347-397.
- Héral, M., Deslous-Paoli, J.M., 1990. Oyster culture in European countries. In: Estuarine and marine bivalve mollusk culture, W. Menzel, ed., CRC Press New York: 153-190.
- Herbinger, C.M., Doyle, R.W., Pitman, E.R., Paquet, D., Mesa, K.A., Morris, D.B., Wright, J.M., Cook, D., 1995. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture*, 137 : 245-256.
- Herbinger, C.M., Doyle, R.W., Taggart, C.T., Lochmann, S.E., Brooker, AL., Wright, J.M., Cook, D., 1997. Family relationships and effective population size in a natural cohort of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54 : 11-18.
- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flynn, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib reared families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture*, 173 : 105-116.
- Hill, W.G., 1981. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity*, 33 : 229-239.
- Hines, A.H., 1986. Larval problems and perspective in life histories of marine invertebrates. *Bulletin of Marine Science*, 39 : 506-525.
- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 100 : 455-463.

- His, E., Seaman, M.N.L., 1992. Effects of temporary starvation on the survival, and on subsequent feeding and growth, of oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Biology*, 114 : 277-279.
- Hoegh-Guldberg, O., Pearse, J.S., 1995. Temperature, food availability, and the development of marine invertebrate larvae. *American Zoologist*, 35 : 415-425.
- Hubert, S. Hedgecock, D., 2004. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 168 : 351-362.
- Hughes, J.R., 2002. *Crassostrea gigas*. Portuguese oyster. Marine Life Information network: Biology and sensitivity key information Sub-programme. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom.
- Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C., Bonhomme, F., 2000. Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the other cupped oyster species. *Animal Genetics*, 31 : 71-72.
- Huvet, A., Balabaud, K., Bierne, N., Boudry, P., 2001. Microsatellite analysis of 6-hour-old embryos reveals no preferential intraspecific fertilization between cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. *Marine Biotechnology*, 3 : 448-453.
- Huvet, A., Gérard, A., Ledu, C., Phélipot, P., Heurtebise, S., Boudry, P., 2002. Is fertility of hybrids enough to conclude that the two oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* are the same species? *Aquatic Living Resources*, 15 : 45-52.
- Huvet, A., Fabioux, C., McCombie, H., Lapègue, S., Boudry, P., 2004. Natural hybridization in genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine Ecology Progress Series*, 272 : 141-152.
- Ibarra, A., Cruz, P., Romero, B.A., 1995. Effects of inbreeding on growth and survival of self-fertilized catarina scallop larvae, *Argopecten circularis*. *Aquaculture*, 134 : 37-47.
- Jablonski, D., 1986. Larval ecology and macroevolution in marine invertebrates. *Bulletin of Marine Science*, 39 : 565-587.
- Jackson, T.R., Martin-Robichaud, D.J., Reith, M.E., 2003. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture*, 220 : 245-259.
- Jacquard, A., 1970. Structure génétique des populations, Masson, 399 p.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11 : 424-429.
- Jerry, D.R., Preston, N.P., Crocos, P.J., Keys, S., Meadows, J.R.S., Li, Y., 2004. Parentage determination of Kumura shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture*, 235 : 237-247.

- Jollivet, D., Empis, A., Baker, M.C., Hourdez, S., Comtet, T., Jouin-Toulmond, C., Desbruyères, D., Tyler, P.A., 2000. Reproductive biology, sexual dimorphism, and population structure of the deep sea hydrothermal vent scale-worm, *Branchipolynoe seepensis* (Polychaeta: Polynoidae). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 80 : 55-68.
- Jones, G., Jones, B., 1983. Methods for setting hatchery produced oyster larvae. Marine Resources Branch, Ministry of Environment, BC, Canada. Information report 4: 94 p.
- Jones, R., Bates, J.A., Innes, D.J., Thompson, R.J., 1996. Quantitative genetic analysis of growth in larval scallops (*Placopecten magellanicus*). *Marine Biology*, 124 : 671-677.
- Jones, A.G., Ardren, W.R., 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 12 : 2511-2523.
- Jørstad, K.E., Prodöhl, P.A., Kristiansen, T.S., Hughes, M., Farestveit, E., Taggart, J.B., Agnalt, A.-L., Ferguson, A., 2005. Communal larval rearing of European lobster (*Homarus gammarus*): Family identification by microsatellite DNA profiling and offspring fitness comparisons. *Aquaculture*, 247 : 275-285.
- Kashi, Y., King, D., Soller, M., 1997. Simple sequences repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics*, 13 : 74-78.
- Kashi, Y., Soller, M., 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein DB, Schlötterer C, eds. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, 10-23.
- Keys, S.J., Crocos, P.J., Burridge, C.Y., Coman, G.J., Davis, G.P., Preston, N.P., 2004. Comparative growth and survival of inbred and outbred *Penaeus (marsupenaeus) japonicus*, reared under controlled environment conditions: indications of inbreeding depression. *Aquaculture*, 241 : 151-168.
- Kimura, M., Crow, J.F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49 : 725-38.
- Kimura, M., Ohta, T., 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 75 : 2868-72.
- Kinne, O., 1963. The effects of temperature and salinity on marine brackish water animals. I. Temperature, *Oceanography and Marine Biology Rev.*, 1, 301-340.
- Kunzler, C.B., Matsuo, K., Schaffner, W., 1995. Pathological, physiological, and evolutionary aspect of short unstable DNA repeats in the human genome. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 376 : 201-211.
- Laing, I., Earl, N.H., 1998. The lipid content, spatfall and subsequent growth of early and late settling hatchery-reared Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg larvae. *Aquaculture Research*, 29 : 19-25.

- Lamouroux, M.-M., 2001. Contribution à l'optimisation du rationnement de phytoplancton élevage larvaire de *Crassostrea gigas*. BTSA, option aquaculture, 1ère année. Lycée de la mer et du littoral, Bourcefranc : 10 p.
- Lannan, J.E., 1972. Estimating heritability and predicting response to selection for the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, 62-66.
- Lannan, J.E., 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas* I. Genetic and environmental variation in survival in the larval rearing system. *Aquaculture*, 21 : 323-336.
- Launey, S., 1998. Marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. : Caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles. *Institut National Agronomique Paris Grignon*, Mémoire de Thèse de Doctorat, 214 p.
- Launey, S., Hedgecock, D., 2001. High genetic load in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 159 : 255-262.
- Leitão, A., Boudry, P., Labat, J.P., Thiriou-Quévieux, C., 1999. Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia*, 41 : 175-186.
- Leitao, A., Chaves, R., Santos, S., Guedes-Pinto, H., Boudry, P., 2004. Restriction enzyme digestion chromosome banding in *Crassostrea* and *Ostrea* species: comparative karyological analysis within Ostreidae. *Genome*, 47 : 781-788.
- Lemos, M.B.N., Nascimento, I.A., De-Araujo, M.M.S., Pereira, S.A., Bahia, I., Smith, D.H., 1994. The combined effects of salinity, temperature, antibiotic and aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. *Journal of Shellfish Research*, 13 : 187-192.
- Le Roux, S., 2004. Un marché très demandeur sur le naissain d'écloserie. *L'Ostréiculteur français*, 174.
- Levinson, G., Gutman, A.G., 1987. Slipped-Strand Mismatching : A major Mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4 : 203-221.
- Li, G., Hedgecock, D., 1998. Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55 : 1025-1033.
- Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V., Hedgecock, D., 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes* 3, 228-232.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11 : 2453-2465.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E., 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21 : 991-1007.

- Lipovsky, V.P., 1984. Oyster egg development as related to larval production in a commercial hatchery. *Aquaculture*, 39 : 229-235.
- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44 : 397-401.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W., Wolfinger, R.D., 1996. SAS system for mixed models. SAS Inst., Cary, NC.
- Longwell, A.C., 1976. Review of genetic and related studies on commercial oysters and other pelecypod mollusks. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33 : 1100-1110.
- Longwell, A.C., Stiles, S.S., 1973. Gamete cross incompatibility and inbreeding in the commercial American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Cytologia*, 38 : 521-533.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C., 1963. Rearing of Bivalve mollusks. *Advances in Marine Biology*, 1 : 1-136.
- Lopez-Flores, I., De la Herran, R., Garrido-Ramos, M.A., Boudry, P., Ruiz-Rejon, C., Ruiz-Rejon, M., 2004. The molecular phylogeny of oysters based on a satellite DNA related to transposons. *Gene*, 15 : 181-188.
- Losee, E., 1978. Influence of heredity on larval and spat growth in *Crassostrea gigas*. *Proceedings of the ninth annual meeting World Mariculture Society*, Atlanta, Georgia, January 3-6 : 101-107.
- Losee, E., 1979. Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, 16 : 123-126.
- Lowe, A.J., Harris, S.A., Ashton, P., 2004. Ecological Genetics: Design, Analysis and Application. Blackwells, Oxford. 326p.
- Lucas, A., 1981. Le rôle du naissain d'écloserie dans la culture des bivalves en 1980. *La Pêche Maritime*, 294-297.
- Luikart, G., Cornuet, J.M., 1999. Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics*, 151 : 1211-1216.
- Lutz, C.G., 2000. Genetics and breeding - Domestication selection. *Aquaculture Magazine*, 26 : 43-46.
- Lynch, M., Walsh, B., 1998. Genetics and Analysis of quantitative Traits. *Sinauer Associates, Sunderland, MA*.
- Lynch, M., Ritland, K., 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, 152 : 1753-1766.

- Magoulas, A., Gjetvaj, B., Terzoglou, V., Zouros, E., 1998. Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics*, 29 : 69-70.
- Malécot, G., 1948. Les Mathématiques de l'Hérédité. *Masson*, Paris.
- Mark, 2004. Genetic Marker Analysis Program, Kermit Ritland, Version 3.0.
<http://www.genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L., Pemberton, J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7 : 639-655.
- Masi, P., Spagnoletti, Zeuli, P.L., Donini, P., 2003. Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 11 : 303-313.
- Matthiessen, G.C., Toner, R.C., 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's County, Massachusetts. *Marine Research Foundation*, Inc.
- Mattiucci, S., Villani, F., 1983. Allozyme study in oysters classified as *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Ostreidae). *Parasitologia*, 25 : 21-27.
- McGoldrick, D.J., Hedgecock, D., English, L.J., Baoprasertkul, P., Ward, R.D., 2000. The Transmission of Microsatellite Alleles in Australian and North American stock of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research*, 19 : 779-788.
- Meagher, T.R., Thompson, E.A., 1986. The relationship between single and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology*, 29 : 87-106.
- Menzel, R.W., 1974. Portuguese and Japanese oysters are the same species. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31 : 453-456.
- Millican, P.F., Helm, M.M., 1973. Preliminary observations on the culture requirements of the larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Int. Council for the Exploration of the Sea*, C.M.
- Moran, N.A., 1994. Adaptation and constraint in the complex life cycles of animals. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 25 : 573-600.
- Mousseau, T.A., Ritland, K., Heath, D.D., 1998. A novel method for estimating heritability using molecular markers. *Heredity*, 80 : 218-224.
- Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R., 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129, 584-593.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29 : 1-10.
- Nell, J., 2002. The Australian oyster fishery. *World Aquaculture*, 33 : 8-10.
- Nell, J., Holliday, J.E., 1988. Effects of salinity on the growth and survival of sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) and pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae and spat. *Aquaculture*, 68 : 39-44.
- Neudecker, T., 1985. Inhibitory effect of low salinity on metamorphosis of *Crassostrea gigas* Thunberg larvae. *Int. Council for the Exploration of the Sea, C.M. F* :48 : 1-9.
- Newkirk, G.F., 1980. Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture*, 19 : 209-228.
- Newkirk, G.F., 1981a. Do fast growing oyster larvae produce fast growing adult oysters ? Annu. Meet. of the national Shellfisheries Association, Hyannis, MA(USA), *Journal of Shellfish Research*, 1 : 120.
- Newkirk, G.F., 1981b. On the unpredictability of bivalve growth rates: is a slow growing juvenile oyster a runt for life?, in : Claus, C. et al. (Ed.). Nursery Culturing of Bivalve Molluscs: Proceedings of the International Workshop on Nursery Culturing of Bivalve Molluscs Ghent, Belgium, 24-26 February 1981. *European Mariculture Society Special Publication*, 7, 211-218.
- Newkirk, G.F., Haley, L.E., Waugh, D.L., Doyle, R., 1977. Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 41 : 49-52.
- Newkirk, G.F., Haley, L.E., 1982. Phenotypic analysis of the European oyster *Ostrea edulis* L. : relationship between length of larval period and postsetting growth rate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 59 : 177-184.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P., 2000. Parentage and Relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo solar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, 182 : 73-83.
- Nunney, L., Elam, D.R., 1994. Estimating the effective size of conserved populations. *Conservation Biology*, 8 : 175-184.
- Ó Foighil, D., Gaffney, P.M., Wilbur, A.E., Hilbish, T.J., 1998. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Marine Biology*, 131 : 497-503.
- Olsen, J.B., Busack, C., Britt, J., Bentzen, P., 2001. The aunt and uncle effect: an empirical evaluation of the confounding influence of full sibs of parents on pedigree reconstruction. *Journal of Heredity*, 92 : 243-247.
- O'Reilly, P.T., Herbinger, C.M., Wright, J.M., 1998. An analysis of parentage determination in Atlantic salmon using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 29 : 363-370.

- Pascual, C., Arena, L., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Rosas, C., 2004. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels. *Aquaculture*, 230 : 405-416.
- Paynter, K.T., DiMichele, L., 1990. Growth of tray-cultured oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin) in Chesapeake Bay. *Aquaculture*, 87 : 289-297.
- Pechenik, J.A., 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology-Progress Series*, 177 : 269-297.
- Peel, D., Ovenden, J.R., Peel, S.L., 2004. NeEstimator: software for estimating effective population size, Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries.
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M., Taniguchi, N., 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement , based on microsatellite markers. *Aquaculture*, 173 : 413-423.
- Pollak, F., 1983. A new method for estimating the effective population size from alleles frequency changes. *Genetics*, 104 : 531-548.
- Primmer, C.R., Aho, T., Piironen, J., Estoup, A., Cornuet, J.-M., Ranta, E., 1999. Microsatellite analysis of hatchery stocks and natural populations of arctic charr, *Salvelinus alpinus*, from the nordic region: implications for conservation. *Hereditas*, 130 : 277-289.
- Pronnier, F., 1996. Le développement et l'alimentation de larves de bivalves d'écloserie. Thèse de Docteur Vétérinaire - Faculté de médecine de Nantes, 67 p.
- Pudovkin, A.I., Zaykin, D.V., Hedgecock, D., 1996. On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*, 144 : 383-387.
- Queller, D.C., Goodnight, K.F., 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43 : 258-275.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., Hughes, C.R., 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8 : 285-288.
- Ranson, G., 1948. Prodissoconques et classification des ostréides vivants. *Bulletin du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique*, 24 : 1-12.
- Ranson, G., 1960. Les prodissoconques (coquilles larvaires) des ostréides vivants. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco*, 1 : 1-41.
- Richards, R.A., 1998. Darwin, domestic breeding and artificial selection. *Endeavour*, 22 : 106-109.
- Ritland, K., 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research*, 67 : 175-185.

- Ritland, K., 2000. Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, 9 : 1195–1204.
- Robert, R., His, E., Dinet, A., 1988. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the european flat oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 97 : 95-100.
- Robert, R., Gérard, A., 1999. Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources* 12 : 121-130.
- Robertson, A., 1961. Inbreeding in artificial selection programmes. *Genetical Research*, 2 : 189–194.
- Rodríguez-Muñoz, R., Nicieza, A.G., Braña, F., 2003. Density-dependent growth of Sea Lamprey larvae: evidence for chemical interference. *Functional Ecology*, 17 : 403-408.
- Rose, M.R., 1982. Antagonistic pleiotropy, dominance and genetic variation. *Heredity*, 48: 63-78.
- Royle, N.J., Clarkson, R.E., Wong, Z., Jeffreys, A.J., 1988. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics*, 3 : 352-360.
- Rumrill, S.S., 1990. Natural mortality of marine invertebrate larvae. *Ophelia*, 32 : 163-198.
- Russello, M.A., Amato, G., 2004. *Ex situ* population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology*, 13 : 2829-2840.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Schard, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 : 487-491.
- Sancristobal, M., Chevalet, C., 1997. Error tolerant parent identification from a finite set of individuals. *Genetical Research*, 70 : 53–62.
- SAS Institute Inc., 1999. SAS/STAT User's Guide, Version 8, vol. 2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Kumagai, A., Hara, M., Yamashita, Y., 2003a. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, 221 : 255-263.
- Sekino, M., Hamaguchi, M., Aranishi, F., Okoshi, K., 2003b. Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 5: 227-233.
- Sekino, M., Sugaya, T., Hara, M., Taniguchi, N., 2004. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 233 : 163-172.

- Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Hara, M., Yamashita, Y., 2005. Genetic tagging of released Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers. *Aquaculture*, 244 : 49-61.
- Selvamani, M.J., Degnan, S.M., Degnan, B.M., 2001. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture. *Marine Biotechnology*, 3 : 478-85.
- Sgrò, C.M., Hoffmann, A.A., 2004. Genetic correlations, trade-offs and environmental variation. *Heredity*, 93 : 241-248.
- Sheridan, A.K., 1997. Genetic improvement of oyster production—a critique. *Aquaculture*, 153 : 165-179.
- Shpigel, M., Barber, B.J., Mann, R., 1992. Effects of elevated temperature, gametogenesis, physiology and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 161 : 15–25.
- Simm, G., Conington, J., Bishop, S.C., Dwyer, C.M., Pattison, S., 1996. Genetic selection for extensive conditions. *Applied Animal Behaviour Science*, 49 : 47-59.
- Singh, S.M., Zouros, E., 1981. Genetics of growth rate in oysters and its implications for aquaculture. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 23 : 119-130.
- Smith, B.R., Herbinger, C.M., Merry, H.R., 2001. Accurate partition of individuals into full-sib families from genetic data without parental information. *Genetics*, 158 : 1329-1338.
- Stillwell, R.C., Fox, C.W., 2005. Complex patterns of phenotypic plasticity: Interactive effects of temperature during rearing and oviposition. *Ecology*, 86 : 924-934.
- Strathmann, R.R., 1980. Why does a larvae swim so long ? *Paleobiology*, 6 : 373-376.
- Strathmann, R.R., 1985. Feeding and nonfeeding larval development and life-history evolution in marine invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16 : 339-361.
- Strathmann, R.R., 1993. Hypotheses on the origins of marine larvae. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24 : 89-117.
- Strathmann, R.R., Fenaux, L., Sewell, A.T., Strathmann, M.F., 1993. Abundance of food affects relative size of larval and postlarval structures of a molluscan veliger. *Biological Bulletin*, 185 : 232-239.
- Taniguchi, N., 2003. Genetic factors in broodstock management for seed production. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13 : 177-185.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17 : 6463–6471.
- Taylor, J.S., Sanny, P., Breden, F., 1999. Microsatellite alleles size homoplasy in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Journal of Molecular Evolution*, 48 : 245-247.

- Thiébaud, E., Huther, X., Shillito, B., Jollivet, D., Gaill, F., 2002. Spatial and temporal variations of recruitment in the tube worm *Riftia pachyptila* on the East Pacific Rise (9°50'N and 13°N). *Marine Ecology Progress Series*, 234 : 147-157, 2002.
- Thompson, E.A., 1975. The estimation of pairwise relationship. *Annals of Human Genetics*, 39 : 173-188.
- Thorson, G., 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews*, 25 : 1-45.
- Toro, J.E., Newkirk, G.F., 1990. Divergent selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*: response to selection and estimation of genetic parameters. *Marine Ecology-Progress Series*, 62 : 219-227.
- Tóth, G., GÁSPÁRI, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes : Survey and Analysis. *Genome Research*, 10 : 967-981.
- Utting, S.D., Spencer, B.E., 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles, Lab.-Leaflet.-Dir.-Fish.-Res.-G.B. 68, 31p.
- Van De Castele, T., Galbusera, P., Matthysen, E., 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, 10 : 1539-1549.
- Vandeputte, M., Prunet, P., 2002. Génétique et adaptation chez les poissons : domestication, résistance au stress et adaptation aux conditions du milieu. *INRA Productions Animales*, 15 : 365-371.
- Vandeputte, M., Launey, S., 2004. Quelle gestion génétique de la domestication chez les poissons? *INRA Productions Animales*, 17 : 237-242.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B., Linhart, O., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Aquaculture*, 235 : 223-236.
- Vitalis, R., Couvet, D., 2001. Estimation of effective population Size and migration rate From One- and Two-Locus Identity Measures. *Genetics*, 157 : 911-925.
- Vrijenhoek, R.C., Ford, S.E., Haskin, H.H., 1990. Maintenance of heterozygosity during selective breeding of oysters for resistance to MSX disease. *Journal of Heredity*, 81 : 418-423.
- Wada, K.T., 1986. Genetic variability at four polymorphic loci in Japanese pearl oysters, *Pinctada fucata martensii*, selected for six generations. *Aquaculture*, 59 : 139-146.
- Walne, P.R., 1965. Observations on the influence of food supply and temperature on the feeding and growth of the larvae of *Ostrea edulis*. Fish. Invest. Ser. II Mar. Fish, G.B., Minist. Agric., Fish Food No 24 : 45p.
- Walne, P.R., 1974. Culture of Bivalve Molluscs, Fishing News Books Ltd. England.

- Waples, R.S., 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, 121 : 379-391.
- Waples, R.S., 1999. Dispelling some myths about hatcheries. *Fisheries*, 24 : 12-21.
- Wang, J., 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160 : 1203-1215.
- Wang, J., 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, 166 : 1963-1979.
- Wang, J., Caballero, A., 1999. Developments in predicting the effective size of subdivided populations. *Heredity*, 82 : 212-226.
- Weber, J.L., Wong, C., 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2 : 1123-1128.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for analysis of population structure. *Evolution*, 38 : 1358-1370.
- Widdows, J., 1991. Physiological ecology of mussel larvae. *Aquaculture*, 94 : 147-163.
- Wilbur, H.M., 1980. Complex life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11: 67-93.
- Williams, G.C., 1975. Sex and Evolution. *Princeton University Press, Princeton, NJ*.
- Williamson, E.G., Slatkin, M., 1999. Using maximum likelihood to estimate population size from temporal changes in allele frequencies. *Genetics*, 152 : 755-761.
- Wilson, A.J., Ferguson, M.M., 2002. Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications, and practical considerations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 59 : 1696-1707.
- Winterø, A.K., Fredholm, M., Thompsen, P.D., 1992. Variable (dG-dT)_n-(dC-dA)_n in the porcine genome. *Genomics*, 12 : 281-288.
- Wolff, R.K., Plaetke, R., Jeffreys, A.J., Blanc, R., 1989. Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics*, 5 : 382-384.
- Wray, G.A., Raff, R.A., 1991. The evolution of developmental strategy in marine invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 45-50.
- Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16 : 96-159.
- Yamtich, J., Voigt, M.-L., Li, G., Hedgecock, D., 2005. Eight microsatellite loci for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Animal Genetics*, in press.
- Zhu, Y., Strassmann, J.E., Queller, D.C., 2000. Insertions, substitutions, and the origin of

microsatellites. *Genetical Research, Camb.*, 76 : 227-236.

SHORT COMMUNICATION

A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

Nicolas Taris¹, Sophie Baron², Timothy F Sharbel¹, Christopher Sauvage¹ & Pierre Boudry¹

¹Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), La Tremblade, France

²Laboratoire d'analyses génétiques GENINDEXE, La Rochelle, France

Correspondence: P Boudry, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17390 La Tremblade, France. E-mail: pboudry@ifremer.fr

Microsatellites are ideal markers for genetic mapping studies, analyses of population structure and the assessment of parentage (Jarne & Lagoda 1996). When analysed in a multiplex fashion, microsatellites provide rapid turnaround time with a relatively low material cost for the user (Neff, Fu & Gross 2000). In aquaculture research, they are especially powerful for parentage determinations in quantitative genetic studies (Mousseau, Ritland & Heath 1998; Vandeputte, Dupont, Chatain & Chevassus 2001) and for the assessment of genetic diversity in hatchery populations (e.g. Boudry, Collet, Cornette, Hervouet & Bonhomme 2002; Hara & Sekino 2003). The following technical note describes a high-throughput method composed of a boiling DNA extraction protocol, an optimized triplex microsatellite system and its application to parentage analyses of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas*). The three loci were taken from the literature (CG49 and CG108 from Magoulas, Gjetvaj, Terzoglou & Zouros 1998; L10 from Huvet, Boudry, Ohresser, Delsert & Bonhomme 2000), and were chosen because they were highly polymorphic (≈ 40 alleles per locus, Huvet, Fabioux, McCombie, Lapègue & Boudry 2004), and easily scored.

Considering the difficulty of larval DNA extraction due to their small size (from 70 to 300 μm) and the presence of a hard closed shell, our DNA extraction protocol represents a simple and inexpensive method for large-scale studies. It is based on a Chelex-boiling extraction procedure (Estoup, Largiader, Perrot &

Chourrout 1996; Launey & Hedgecock 2001), but does not require Chelex resin (Biorad, Hercules, CA, USA). Individual larvae that had been preserved in 70% ethanol were collected by pipetting 3 μL of ethanol into a 0.2-mL Eppendorf tube (Hamburg, Germany), crushed using the point of a clean needle under a dissection microscope, and then dried down in a vacuum centrifuge (Gyrovap; VA Howe, Banbury, UK) for 15 min at 35 °C or at ambient temperature, although this takes more time. Our initial trials using uncrushed larvae produced variable results, and the addition of the crushing step greatly increases the quality of the genotyping results. A 30- μL volume of lysate buffer (670-mM Tris-HCl pH 8.8, 166-mM ammonium sulphate, 0.1% Tween-20) and 5 μL of proteinase K ($1 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$) were added to each sample, followed by a short centrifugation step to ensure that the larvae were at the bottom of the tube. The tubes were incubated at 55 °C for 1 h in a polymerase chain reaction (PCR) machine (Programmable Thermal Controller-100TM; MJ Research, Waltham, MA, USA), centrifuged briefly and then heated again at 100 °C for 20 min. The samples were finally transferred from Eppendorf tubes to a 96-well microtitre plate, and stored at -20 °C before the PCR procedure. DNA of adult oysters was extracted from very small gill samples ($\sim 10 \mu\text{g}$) using the same protocol, but using 150 μL volume of lysate buffer.

Optimal conditions for a PCR-multiplex reaction may differ markedly from those developed for uniplex

Table 1 Test of variations in multiplex PCR conditions for (A) PCR reaction volume and annealing temperature and (B) primer concentration for markers CG108, L10 and CG49

(A)	Annealing temperature (°C)*	
	55	58
Final reaction volume (µL)		
25	++	+
20	++	+
15	++	+
10	+	–

(B)	CG108 (6-FAM)†	L10 (HEX)†	CG49 (NED)†
0.5-µM equimolar	o	o	o
0.2-µM equimolar	+	+	+
0.15/0.3/0.15 µM	++	++	++

* –, no amplification; +, non-specific amplification; ++, scorable genotype.

†o, PCR products saturation; +, scorable but uneven amplification; ++, scorable genotype.

PCR, Polymerase chain reaction.

reactions (Henegariu, Heerema, Dlouhy, Vance & Vogt 1997; Masi, Spagnoletti Zeuli & Donini 2003). Consequently, we tested a range of PCR–multiplex conditions by varying primer concentrations, annealing temperatures and reaction volumes (Table 1). Following our initial tests, we adopted the following protocol (reaction volume 15 µL): dNTP (200 µM), 1 × ThermoPol reaction buffer (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), MgCl₂ (2 mM), Taq DNA polymerase (New England Biolabs, 1.5 U 15 µL⁻¹) and template oyster DNA (100 ng of template DNA for adults and ~50 ng for larvae in volume of 1.2 µL). Initially, annealing temperatures were 53, 55 and 55 °C for CG49, CG108 and L10 pairs of primers. In the multiplex PCR reaction, the annealing temperature of 55 °C gave optimal resolution, although locus L10 could be amplified at 58 °C.

The cycling conditions used for the PCR amplification were as follows: pre-denaturation (94 °C for 2 min), followed by 30 cycles of denaturation–annealing–extension (94 °C for 1 min; *T_a* (optimal annealing temperature for each pair of primers) = 55 °C for 1 min; 72 °C for 1 min) and a final elongation step (72 °C for 30 min) in order to reduce the double peaks associated with ‘plus A’ phenomenon (Ziegler, Su, Corcoran, Mayrand, Hoff, Mcbride & Kronich 1992). Polymerase chain reaction products (1.0 µL) were finally mixed with 12-µL deionized formamide and 0.25-µL GeneScan™ ROX™ size standard (Applied

Biosystem, Foster City, CA, USA), denatured for 5 min at 95 °C and then flash-cooled in a water ice bath. All analyses were performed on an ABI Prism® 3100 automated sequencer (Applied Biosystem) using the POP-4 polymer with the 36-cm capillary.

The extraction–multiplex procedure was performed on 1318 ethanol-preserved larvae produced from a cross between 13 known adults (three females fertilized by 10 males in a factorial design). We chose highly heterozygous parental genotypes from a possible 88 potential adults. To test the resolving power of our three loci in relation to the 13 chosen parental genotypes, we used the Family Assignment Program (FAP) software (J. B. Taggart, University of Stirling, unpubl.). This program, based on exclusion principles, revealed that our three multiplexed loci provided 100% discrimination among the progeny of that cross (assuming no genotyping errors). In practice, we were able to unambiguously determine the parentage in 93% of the larvae (1224/1318). Dropouts in our genotyping procedure are likely to have been caused by DNA degradation of larvae preserved in ethanol or by human error during the initial larvae sampling, rather than assignment uncertainty.

Additionally, in order to test for the general resolving power of this three-locus multiplex system, i.e. without any prior selection of the parental genotypes, we used the simulation program CERVUS (Marshall, Slate, Kruuk & Pemberton 1998). This program uses allele frequencies of a population at a given locus to estimate its resolving power. The allele frequencies of 88 adult oysters were used to run the simulations according to the following parameters: 10 000 replication cycles, 100% of candidate parents sampled and genotyped. We tested a number of candidate parents ranging from two to 88 (Fig. 1). Assignment to the true parents was successful in 98.5% of

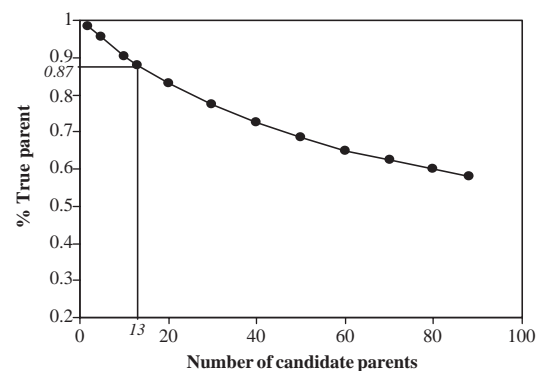


Figure 1 Assignment of offspring in parentage under a number of candidate parents from 2 to 88.

the cases when two parents were randomly chosen, and 57.9% when 88 parents were used. For 13 parents (i.e. our study case), the mean percentage of unambiguous parental assignment was 87% (not 100%). This illustrates that, when feasible, the selection of highly heterozygous parents can facilitate parentage analysis (e.g. Boudry *et al.* 2002).

Despite the inevitable dropout of a small percentage of genotypes due mostly to larval DNA quality factors, our method represents a significant step in the development of parentage studies in *C. gigas* genetics, and could be extended to the many other microsatellite markers that are now available for this species (Li, Hubert, Bucklin, Ribes & Hedgecock 2003).

Acknowledgments

This work was partially funded by the Bureau des Ressources Génétiques. We thank Dr J. Taggart for his comments and his help in using the software 'FAP'. We would also like to thank the Genindex lab team for their technical assistance.

References

Boudry P., Collet B., Cornette F., Hervouet V. & Bonhomme F. (2002) High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* **204**, 283–296.

Estoup A., Largiadere C.R., Perrot E. & Chourrou D. (1996) Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**, 295–298.

Hara M. & Sekino M. (2003) Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* **217**, 107–114.

Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H. & Vogt P.H. (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Research Reports. *Biotechniques* **23**, 504–511.

Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C. & Bonhomme F. (2000) Variable microsatellites in the Pacific oyster

Crassostrea gigas and the other cupped oyster species. *Animal Genetics* **31**, 71–72.

Huvet A., Fabioux C., McCombie H., Lapègue S. & Boudry P. (2004) Natural hybridization in genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine Ecology Progress Series* **272**, 141–152.

Jarne P. & Lagoda P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 424–429.

Launey S. & Hedgecock D. (2001) High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* **159**, 255–265.

Li G., Hubert S., Bucklin K., Ribes V. & Hedgecock D. (2003) Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes* **3**, 228–232.

Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V. & Zouros E. (1998) Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics* **29**, 69–70.

Marshall T.C., Slate J., Kruuk L. & Pemberton J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639–655.

Masi P., Spagnoletti Zeuli P.L. & Donini P. (2003) Development and analysis of multiplex microsatellite markers sets in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding* **11**, 303–313.

Mousseau T.A., Ritland K. & Heath D.D. (1998) A novel method for estimating heritability using molecular markers. *Heredity* **80**, 218–224.

Neff B.D., Fu P. & Gross M.R. (2000) Microsatellite multiplexing in fish. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 584–593.

Vandeputte M., Dupont N., Chatain B. & Chevassus B. (2001) Setting up a strain-testing design for the seabass, *Dicentrarchus labrax*: a simulation study. *Aquaculture* **202**, 329–342.

Ziegle J.S., Su Y., Corcoran K.P., Mayrand P.E., Hoff L.B., Mcbride L.J. & Kronich M.N. (1992) Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* **14**, 1026–1031.

Keywords: multiplex, larval DNA extraction, high throughput, parental assignment, aquaculture, oysters



ELSEVIER

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology xx (2006) xxx–xxx

**Journal of
EXPERIMENTAL
MARINE BIOLOGY
AND ECOLOGY**

www.elsevier.com/locate/jembe

Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

Nicolas Taris ^a, Bruno Ernande ^b, Helen McCombie ^c, Pierre Boudry ^{a,*}

^a Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP),
17390 La Tremblade, France

^b Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire Ressources Halieutiques, Avenue du Général de Gaulle,
B.P. 32, 14520 Port-en-Bessin, France

^c Experiance, 32 avenue Albert Einstein, 17000 La Rochelle, France

Received 31 July 2005; received in revised form 12 December 2005; accepted 14 December 2005

Abstract

The life histories of oysters in the genus *Crassostrea*, like those of most marine bivalves, are typified by high fecundity and low survival in nature. Rearing conditions in hatcheries however ensure optimized density, diet, and temperature. Hatcheries are becoming increasingly important for the production of juveniles in aquaculture, and their culture practices often include culling of slow growing larvae to reduce and synchronize the time taken to reach settlement. Because previous studies have found substantial genetic variation for early life developmental traits in *Crassostrea gigas*, these culling practices are likely to cause highly different selective pressures in hatcheries from those in the natural environment. We studied the phenotypic and genetic impact of such culling practices in a factorial cross between 10 males and 3 females subjected to progressive culling of the smallest 50% of larvae, compared with a non-culled control. Measurements were made on larval growth, survival, time taken to attain pediveliger stage and settlement success. Culling had a larger effect on the variance of these larval traits than on their means. The larvae in culled cultures were approximately 10% larger than those in controls, whereas the coefficient of variation was reduced by 30–40%. Culling also reduced the mean time to settlement by 12% and its variance by 55%. Using a multiplexed set of microsatellite markers to trace parentage, we also estimated the variance in reproductive success in a controlled experiment to quantify the consequences of intensive hatchery rearing practices. We also focused on changes in effective population size and genetic structure over time (and developmental stages). Our results show a loss of genetic diversity following removal of the smallest larvae by culling, as well as temporally varying genetic structure of the larval population. This supports the existence of genetic variability in early life developmental traits in *C. gigas*. Culling in hatcheries, like size-related selective pressures in the wild, are likely to have a significant genetic impact, through their effects on the timing of settlement.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Crassostrea gigas*; Culling; Genetic diversity; Hatchery; Larvae; Oysters

1. Introduction

The life cycles of most benthic marine invertebrates include a pelagic larval phase. Different theories have been proposed for the evolutionary emergence of these complex life cycles. The larval stage could result from

* Corresponding author. Tel.: +33 5 46 76 26 30; fax: +33 5 46 76 26 11.

E-mail address: Pierre.Boudry@ifremer.fr (P. Boudry).

an adaptation to dispersal and habitat selection, while the adult stage represents specialization in growth and reproduction (Wray and Raff, 1991; Moran, 1994). Wilbur (1980) insists on the importance of metamorphosis, interpreting this point in complex life cycles as an adaptive size-specific shift in ecological niche.

The high fecundity of species such as elm trees and oysters, that produce large numbers of propagules and broadcast them into a hostile world, is commonly viewed as an evolutionary response to intense and unpredictable mortality at early life history stages (Williams, 1975). In the wild, the percentage of marine invertebrate larvae that actually survive to adulthood is extremely low (Thorson, 1950). The larval stage is critical for most marine invertebrates, including bivalves. Experimental studies conducted at early life stages under controlled conditions can provide valuable information about larval mortality and usefully complement studies made in the wild, where experimental approaches are more difficult.

From the first in vitro oyster fertilization (Brooks, 1879) to the appearance of modern production hatcheries, bivalve culture has seen more than one hundred years of development (Helm et al., 2004). Knowledge about bivalve reproduction and rearing techniques improved greatly during the 1960s and 1970s (Matthiessen and Toner, 1966; Walne, 1965, 1974; Breese and Malouf, 1975; Dupuy et al., 1977; Jones and Jones, 1983). The seminal work by Loosanoff and Davis (1963) is commonly considered to be the foundation of many experimental and commercial hatcheries (Lucas, 1981). However, larval rearing techniques and equipment still rely more on empirical concepts and experience rather than on detailed knowledge of species biology. Today, hatcheries successfully realize controlled larval development from fertilization to post-larvae for many species and the commercial production of large numbers of “spat” (immature settled shellfish). This commercial activity initially aimed at producing spat of aquacultured species for which natural recruitment was limited due to environmental factors, technical difficulties or over-exploitation (Lucas, 1981). More recently, this activity has offered the possibility to produce genetically improved stocks through selective breeding programs or the production of triploid spat (Gosling, 2003). The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is the most economically important bivalve species in the world. In 2002, the worldwide production reached 4.2 million metric tonnes (FAO, 2003). The proportion of spat produced by hatcheries is increasing continually. This is notably because of increasing interest in triploids (Nell, 2002)

and, more recently, selective breeding (Langdon et al., 2003; Boudry et al., 2004).

In this species, as in many other bivalves, larvae and spat exhibit high phenotypic variation, particularly in terms of growth rate and survival. For instance, Collet et al. (1999) observed that for larvae reared in common trophic and thermal (23 °C) conditions, the first pediveliger larvae appeared 17 days post-fertilization and the last ones 26 days post-fertilization. Newkirk (1981) pointed out the unpredictability of growth rates in juvenile oysters due to high phenotypic variability, even under common environmental conditions. Larvae and spat from both hatcheries and natural recruitment have variable and usually low survival rates (Jones and Jones, 1983; Haws et al., 1993; Robert and Gérard, 1999). In addition, phenotypic plasticity has been shown to contribute to the variability in early life history traits in oysters (larval growth and survival: Abdel-Hamid et al., 1992; Lemos et al., 1994, morphology: Strathmann et al., 1993) depending on environmental conditions.

Furthermore, high mortality in early life can result in high variability in reproductive success between different individuals within both natural populations (Hedgecock, 1994; Li and Hedgecock, 1998) and hatchery-propagated stocks (Lannan, 1980; Boudry et al., 2002). This high variability in reproductive success combined with the influence of highly variable environmental conditions which these animals encounter (Sgrò and Hoffmann, 2004), could counteract the high genetic polymorphism expected in this species due to its very high fecundity (25–50 million oocytes per female per year) and very large population sizes.

In this paper we studied the impact of selection for fast growing larvae, by culling, on phenotypic and genetic variability in the Pacific oyster, *C. gigas*. Culling the smallest (i.e., slowest growing) larvae to reduce the duration of larval rearing and variation in the size of spat is a common practice in bivalve hatcheries (Bardach et al., 1972). Low effective population size has often been reported in hatchery-propagated *C. gigas* stock (Hedgecock and Sly, 1990; Hedgecock et al., 1992) but the relative impact of intensive rearing practices such as culling compared with other factors (e.g., number of spawning parents) requires more examination (Laing and Earl, 1998).

To monitor the effects of selection for fast growing larvae on variability in growth rates and genetic diversity, we studied a larval population produced from a factorial cross. We used a mixed-family approach to any reduce confounding of environmental and genetic effects (Herbinger et al., 1999) and compared two different rearing practices. In one treatment the smallest larvae were progressively discarded by sieving, whereas

in the other the whole larval population was maintained. As soon as the larvae were ready to settle (the pediveliger stage), samples were taken for genetic analysis. Our experiment therefore aimed (i) to quantify the effect of selecting fast growing larvae on the genetic heterogeneity of the larval population and developmental rate (i.e., age at settlement), and (ii) to evaluate the effect of selecting fast growing larvae on the effective population size of successive settlement cohorts.

2. Materials and methods

2.1. Parental oysters

We collected 100 adult oysters from natural beds in Charente-Maritime, France. After a 2-month conditioning period to induce sexual maturation, gill fragments were collected to determine genotypes at three microsatellite loci. Out of these 100 oysters, 10 males and 3 females were chosen for the crosses. Using a similar method to Boudry et al. (2002), we chose parental oysters that were heterozygous with alleles as different as possible from one another so as to make the subsequent pedigree tracing easier.

2.2. Breeding design

The factorial cross between the 10 selected males and 3 selected females was performed as follows. We first stripped sperm and eggs by opening the animals' shells, lacerating the gonad and rinsing gametes into separate beakers. We then estimated gamete concentrations using Thoma slides (for sperm) and Malassez slides (for eggs) coupled to an image processing system (SAMBA™ IPS software). Each of the 10 males was mated with the 3 females, producing 10 half-sib families and 30 full-sib families. Fertilization was performed at a ratio of 100 sperm per egg, 10^6 oocytes being used for each mating. A parallel sample was independently raised in small dishes to estimate the fertilization rate by the percentage of developing embryos after 24 h ((number of D larvae / total number of oocytes) × 100). The embryos of the different families were mixed together 3 h after fertilization to optimize genetic diversity while avoiding sperm competition (Boudry et al., 2002). This embryo mixture was divided between six rearing tanks (5×10^6 oocytes/tank; 3 replicated tanks/treatment).

2.3. Larval rearing

Larvae were reared in six GRP (Glass Reinforced Polyester) 50-l tanks filled with filtered sea water. The larval rearing environment was maintained at 23 °C water

temperature, 28–32‰ salinity. Larvae were fed *Tetraselmis suecica* and *Isochrysis aff. galbana* (Clone T-iso; Tahitian *Isochrysis*) according to a three-phase rationing plan. This provided a first phase ration for larvae from 70 to 115 µm, a second phase for larvae from 115 to 200 µm and a third for larvae above 200 µm. The three phases respectively received 0.3, 1.7, and 4 cells µl⁻¹ day⁻¹ *T. suecica* and 4, 19.3, 38.5 cells µl⁻¹ day⁻¹ *I. aff. Galbana* (T-iso). One day post-fertilization, larval concentration was reduced to 10 larvae ml⁻¹. Then, from day 1 post-fertilization to the first settlement event, two different rearing treatments were applied. Three randomly chosen 50-l tanks were subjected to “size selection” in which the smallest larvae were progressively discarded by selective sieving, whereas for the three control tanks no selective sieving was performed (Table 1). Selective sieving was conducted progressively, according to larval growth and available mesh size of sieves (Table 1). This treatment led to the cumulative culling of 50% of the larvae over the whole rearing period.

Every 48 h, the larvae were collected in 500-ml beakers by sieving. Population sizes (the number of larvae in each tank) were then estimated by counting larvae in 5 water samples according to the procedure described in Utting and Spencer (1991). One hundred larvae from each tank were also collected to measure maximum shell length using the SAMBA™ IPS image processing software.

For all six tanks, when the first pediveliger larvae able to attach to a suitable substrate were observed, the largest larvae were retained by sieving on a 220-µm mesh (i.e., larval length greater than 280 µm) and transferred to raceways dedicated to settlement. All larvae retained on this sieve had reached the pediveliger stage. The remaining larval population was returned to the larval rearing tanks. Successive sieving operations were performed each day. At days 20, 25 and 28 post-fertilization, 96 of the pediveliger larvae selected for settlement were preserved in 70% ethanol for parentage analysis using microsatellite markers as described below. For each settlement cohort transferred to the settlement raceways, we estimated metamorphosis success as the ratio of the number of surviving juveniles 8 days after settlement to the number of pediveliger larvae put into the raceway. Three replicate estimates of juvenile number (= total weight of a cohort divided by the individual mean weight in that cohort) were computed for each cohort.

2.4. Parentage analysis

Parentage analysis for larvae and adults was carried out using three multiplexed microsatellite loci in

Table 1
Larval traits at each sampling day for size selection and control rearing conditions

Day	Mesh size (μm)		Mean maximal length \pm S.E. (μm)		Coefficient of variation		% Larvae/initial number at day 1 \pm S.E.		Proportion culled (%)
	(1) Control	(2) Size selection	(1) Control	(2) Size selection	(1) Control	(2) Size selection	(1) Control	(2) Size selection	
1	45	45	75.9 \pm 2.3	75.4 \pm 2.2	3.0	3.0	100	100	/
3	45	45	85.6 \pm 2.9	85.5 \pm 2.9	3.4	3.4	85.1 \pm 12.6	81.2 \pm 4.0	/
6	45	60	113.9 \pm 6.6	113.3 \pm 6.6	5.8	5.9	67.3 \pm 12.0	69.2 \pm 8.9	4 \pm 1
8	45	85	129.1 \pm 9.1	130.1 \pm 6.9	7.1	5.3	59.6 \pm 13.8	58.4 \pm 1.1	9 \pm 2
10	60	110	158.6 \pm 13.8	163.8 \pm 11.5	8.7	7.0	55.5 \pm 10.3	56.4 \pm 0.9	3 \pm 1
13	60	150	204.1 \pm 29.3	222.7 \pm 16.7	14.4	7.5	57.2 \pm 11.8	43.3 \pm 4.2	18 \pm 3
15	60	180	233.6 \pm 32.0	257.7 \pm 18.1	13.7	7.0	49.3 \pm 11.7	32.0 \pm 0.4	16 \pm 6
17	60	180	250.8 \pm 29.6	275.2 \pm 19.9	11.8	7.3	46.8 \pm 9.2	30.5 \pm 5.3	0

conjunction with a simple DNA extraction protocol, described in Taris et al. (2005). Samples were run on a ABI Prism[®] 3100 automated sequencer (Applied Biosystems) and genotypes determined by Genemapper[®] software using the binning procedure.

For parental assignment, we used the program PAPA (Package for the Analysis of Parental Allocation) which performs parental identification based on breeding likelihood methods (Duchesne et al., 2002). The allocation parameters were the global level of transmission error ($a=0.1$) and the distribution of transmission error over alleles ($S=6$). These two parameters were optimized to reduce the risk of misallocation in the procedure, as recommended by Duchesne et al. (2002). Samples were analysed for parental assignment on three different dates (Fig. 2): day 20 post-fertilization, corresponding to the first settlement cohort for both conditions; day 25 post-fertilization, corresponding to the last settlement cohort for the size-selection conditions and an intermediate cohort for the control conditions; and day 28 post-fertilization, corresponding to the last settlement cohort for the control conditions.

2.5. Data analysis

The statistical analyses detailed below involved both fixed and random effects. Time and treatments were treated as fixed effects, whereas male, female, and replicate tank effects were treated as random, as were interactions involving both random and fixed effects (e.g., *male* \times *treatment*). Normally distributed data were analysed using linear mixed models (PROC MIXED, SAS/STAT[®] Software, SAS Institute Inc., 1999) and binomial and Poisson data were analysed using generalized linear mixed models (SAS macro GLIMMIX; Littell et al., 1996). The GLIMMIX procedure fits mixed statistical models to data with correlations or non-constant variability, where the response is not

necessarily normally distributed. Significance tests were based on F -statistics for fixed effects and on likelihood ratios between sub-models for random effects, which asymptotically follow a chi-squared distribution (Littell et al., 1996).

2.5.1. Statistical inferences for phenotypic analysis

The proportion of developed embryos 24-h post-fertilization in the independent post-fertilization sample served to estimate the probability of each oocyte developing to the embryo stage. This binomial data was transformed using a logit link function (Logit link: $f(z)=\log(z/(1-z))$; McCullagh and Nelder, 1989). The link function is used to model responses when the dependent variable is assumed to be nonlinearly (binomial distribution) related to the predictors. This allowed us to test for the variation in fertilization success among males and females by fitting a model accounting for these two effects (*male* and *female*) and their interaction:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{mal}_i + \text{fem}_j + \text{rep}_k + \text{int}_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

where Y_{ijk} is the fertilization success of the i th male and the j th female in the k th replicate, μ is the whole mean, mal_i is the *male* random effect ($i=1-10$), fem_j is the *female* random effect ($j=1-3$), rep_k is the random *replicate* effect, int_{ij} is the interaction between *male* and *female* effect, and ε_{ijk} is the residual.

Larval length was analysed as continuously distributed data (univariate normality was tested using the Shapiro–Wilk test), and population size (the number of larvae) was analysed as Poisson data using a log link function (Log link: $f(z)=\log(z)$; McCullagh and Nelder, 1989). For each of these three variables, the data from the entire rearing period were first analysed with *time* as a co-variate, *treatment* and *replicate nested within treatments* [*replicate(treatment)*] as effects to be tested,

and all relevant interactions also examined (ANCOVA):

$$Y_{ij} = \mu + \text{time} + \text{treat}_i + \text{rep}_j\{\text{treat}_i\} + \text{time} * \text{treat}_i \\ + \text{time} * \text{rep}_j\{\text{treat}_i\} + \varepsilon_{ij},$$

where Y_{ijk} is the dependant variable (larval length, coefficient of variation or population size), μ is the whole mean, rep_k is the random replicate effect ($j=1-3$), time is the co-variable, treat is the fixed sieving effect ($i=1-2$) and ε_{ijk} is the residual.

In these analyses, the slopes of the relationships between the covariate (time) and either larval length or population size represent direct measures of larval growth rate and cumulative survival respectively. The $\text{time} \times \text{treatment}$ interaction therefore tests for significant treatment effect on these slopes and thus provides direct tests for significant effects of treatment on larval growth and survival.

We also performed independent analyses (ANOVAs) for each measurement date, with treatment and $\text{replicate}(\text{treatment})$ as effects, in order to precisely assess the date when significant differences appeared between treatments:

$$Y_{ij} = \mu + \text{treat}_i + \text{rep}_j\{\text{treat}_i\} + \varepsilon_{ij},$$

where the variables are defined as above.

The coefficient of variation for larval length was analysed, to detect any significant differences between crosses at each sampling date, using a non parametric procedure (Wilcoxon–Mann–Whitney test, PROC NPAR1WAY).

2.5.2. Statistical inferences for genetic analysis

We analysed the parental contributions of the larval fractions retained on the different dates (pediveliger larvae selected for settlement) as Poisson data, using a log link function (Log link: $f(z)=\log(z)$; McCullagh and Nelder, 1989). Initially we fitted a complete model with time as a co-variate, treatment , $\text{replicate}(\text{treatment})$, male , and female as effects, and all relevant interactions examined:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{time} + \text{mal}_i + \text{fem}_j + \text{treat}_l + \text{rep}_k\{\text{treat}_l\} \\ + \text{int}_{ijkl} + \varepsilon_{ijkl},$$

We then fitted two more models in order to examine the treatment and time effects in detail. One of these models focused on the influence of sieving by taking the parental contribution data into account independently at each sampling date.

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{mal}_i + \text{fem}_j + \text{treat}_l + \text{rep}_k\{\text{treat}_l\} + \text{int}_{ijkl} \\ + \varepsilon_{ijkl},$$

The second model focused on the temporal effect by considering parental contribution data for both rearing conditions over time:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{time} + \text{mal}_i + \text{fem}_j + \text{rep}_k\{\text{treat}_l\} + \text{int}_{ijk} \\ + \varepsilon_{ijk},$$

Finally, effective population size of progenies was calculated according to Robertson (1961) where n_{ij} is

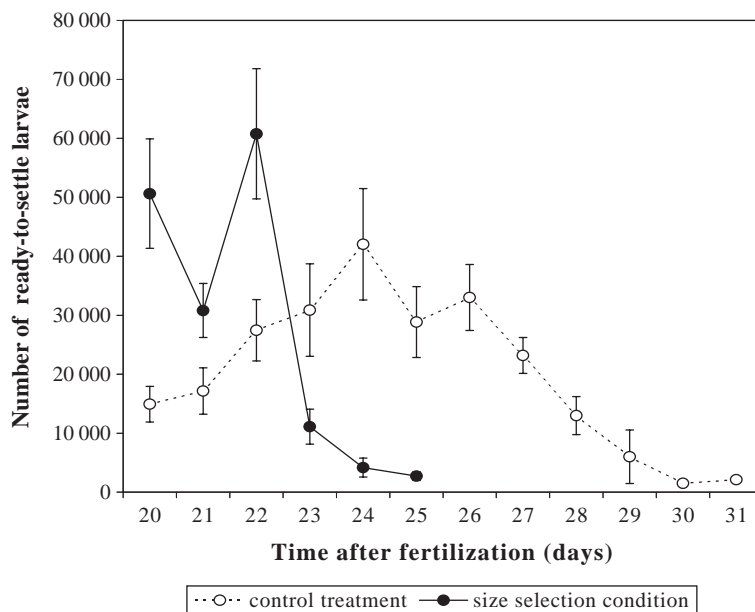


Fig. 1. Temporal evolution of the number of ready-to-settle larvae.

the observed number of offspring of male i and female j in a given sample:

$$Ne = (\sum n_{ij})^2 / \sum n_{ij}^2$$

3. Results

3.1. Larval development

3.1.1. Fertilization success

Mean fertilization success of the males, estimated by the proportion of successfully developed embryos 24-h post-fertilization, ranged from $64.1 \pm 32.4\%$ to $69.9 \pm 33.5\%$. Variation among females was much larger, with

fertilization success at $25.3 \pm 5.8\%$, $94.8 \pm 2.9\%$, and $82.5 \pm 6.9\%$ for the three females. As expected from these observations, fertilization success differed significantly between females ($\chi^2 = 67.0$, $p < 0.001$) but not between males ($\chi^2 = 0$, $p = 0.99$). Moreover, the interaction *female* \times *male* was not significant ($\chi^2 = 0$, $p = 0.99$). These data allowed us to take the initial effect of gamete quality into account when estimating variance in reproductive success at later stages.

3.1.2. Larval traits

The size of sieve mesh used to cull the cultures, mean larval length, mean relative population size (the number of larvae relative to day 1) and the intensity of culling for all sampling dates and treatments are presented in

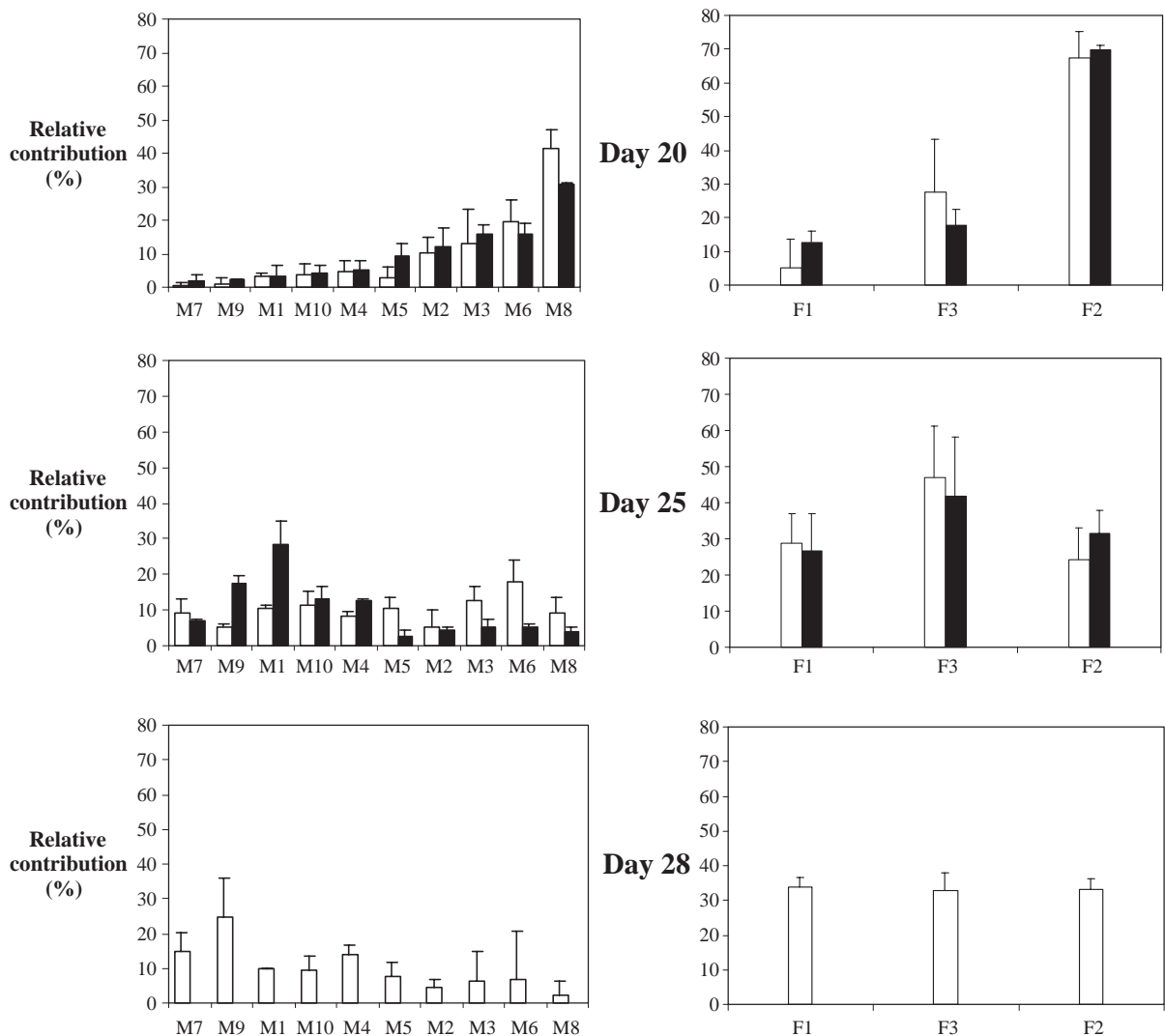


Fig. 2. Temporal changes of relative paternal (left) and maternal (right) contributions (black bars: size selection conditions, white bars: control).

Table 1 with their respective coefficients of variation. Since no *replicate(treatment)* effect was significant for the larval traits, data from the different replicates were pooled for subsequent analyses.

Our progressive culling procedure led to a mean reduction in population size of 50% (cumulative percentage of daily culling, **Table 1**) at day 17 post-fertilization, relative to the control. The proportion of larvae remaining at this stage was $46.8 \pm 9.2\%$ for the control treatment whereas it was $30.5 \pm 5.3\%$ for the size selection treatment. Our selective culling treatment resulted in 14.2% lower final densities (cumulative survival) than the control (**Table 1**, $\chi^2=44.5$, $p<0.001$). From this, we deduced that “natural” larval mortality (i.e., not due to culling) was 14.2% higher in the control tanks than in the size selected tanks. As would be expected, treatment (culling) was found to have a highly significant effect on the decrease in population size with time (trend of overall reduction in number of live larvae: *treatment* × *time*, $\chi^2=44.5$, $p<0.001$). Separate analyses performed for the different dates showed that population sizes differed significantly between treatments from day 13 post-fertilization onwards (*treatment*, $F=17.3$, $p<0.001$).

Size selection also had a significant effect on mean larval growth (*treatment* × *time*, $\chi^2=427.2$, $p<0.001$) calculated over the larval rearing period from day 1 to 20 post-fertilization. ANOVAs performed for each of the different dates showed that the coefficient of variation of larval length differed significantly between treatments from day 10 post-fertilization onwards ($F=8.4$, $p=0.04$). Size selection had a significant effect on larval length from day 13 post-fertilization onwards ($F=12.5$, $p<0.001$). The resulting mean larval length was $222.7 \pm 16.7 \mu\text{m}$ (coefficient of variation=7.5%) for size selection compared with $204.1 \pm 29.3 \mu\text{m}$ (coefficient of variation=14.4%) for the control (**Table 1**).

For both treatments, the first pediveliger larvae appeared at day 20 post-fertilization (**Fig. 1**). Larval mortality was negligible after this date in all tanks. The mean time taken to reach the pediveliger stage was 21 and 24 days post-fertilization in size selected and control tanks, respectively. In line with the pattern observed for the coefficient of variation for larval length, selective sieving of fast growing larvae led to less variation in time taken to reach the pediveliger stage: settlement occurred over 5 days in the selected group as opposed to 11 in the control. Additionally, almost 89% of pediveliger larvae appeared in only three days in the size selection conditions (day 20 to 22 post-fertilization) while this was much more gradual in the control tanks (**Fig. 1**).

The total number of larvae that reached the pediveliger stage was lower in the size selected tanks (161,727 versus 236,900) but the proportion that

reached the pediveliger stage was higher (61.1% versus 46.8%). Finally, we obtained higher settlement success for size selected larvae than for control larvae ($61.8 \pm 3.9\%$ versus $48.6 \pm 16.0\%$), however 15% less spat were produced from the size selected conditions than from the control due to the lower number of pediveliger larvae put to settle.

3.2. Parental contributions and genetic diversity in settlement cohorts

3.2.1. Parental assignment

Altogether, 1440 larvae sampled at days 20, 25 and 28 post-fertilization were genotyped. Around 90% of these were successfully assigned to a single parental pair. Failure to assign the remaining 10% was due to DNA degradation in ethanol-preserved larvae or to human error during the initial larvae sampling, rather than assignment uncertainty (Taris et al., 2005).

3.2.2. Parental contributions

The temporal changes in paternal and maternal contributions (at days 20, 25 and 28 post-fertilization) are represented in **Fig. 2**. The corresponding statistical analyses are given in **Tables 2–5**. All analyses of parental contributions were performed on numbers corrected for differential fertilization success (using multiplying coefficients corresponding to familial fertilization success). Since no *replicate(treatment)* effect was significant in main or interaction effects of the complete model, the data corresponding to the different replicates were pooled for subsequent analysis.

Table 2 resumes the results of the complete model. The temporal trend (i.e. between settlement cohorts) in

Table 2
Results of overall GLIMMIX model including all effects

Fixed effects	F value	Pr>F
Treatment	0.00	0.977
Day	1.10	0.485
Random effects	χ^2	P value
Day × male × female × treatment	10.4	0.001***
Day × treatment × male	4.7	0.030*
Day × treatment × female	0	1.000
Treatment × male	1.6	0.206
Treatment × female	0	1.000
Male × female	8.86	0.003**
Day × male	32.1	0.000***
Day × female	14.3	0.000***
Day × treatment	0.1	0.752
Male	32.3	0.000***
Female	10.3	0.001***

Table 3

Results of the GLIMMIX sub-model focusing on the treatment (sieving) effect by taking into account the parental contribution data independently at each sampling date

	Day 20		Day 25	
	<i>F</i> value	<i>Pr>F</i>	<i>F</i> value	<i>Pr>F</i>
Treatment	0.23	0.67	0.15	0.73
	χ^2	<i>P</i> value	χ^2	<i>P</i> value
Treatment × male × female	7.1	0.008**	3.3	0.069
Male × treatment	1.3	0.254	5.8	0.016*
Female × treatment	3.2	0.07	~0	0.99
Male × female	37.2	<0.001***	~0	0.99
Male	28.6	<0.001***	20.4	<0.001**
Female	10.4	0.001**	~0	0.99

the pattern of parental contributions differed between males (*male × time*, $\chi^2=32.1$, $p<0.001$) and between females (*female × time*, $\chi^2=14.3$, $p<0.001$). As indicated by the significant *male × time × treatment* interaction ($\chi^2=4.7$, $p=0.03$), each paternal contribution shifted differently over time depending upon the rearing conditions. The subsequent models allowed the effects highlighted by the overall model to be tested specifically. Thus, as shown in Table 3, there was no interaction between *treatment* and *male* or *female* at day 20 post-fertilization (*male × treatment*, $\chi^2=1.3$, $p=0.25$; *female × treatment*, $\chi^2=3.2$, $p=0.07$) meaning that there was no significant effect of sieving on parental contribution at this sampling point. In contrast, at day 25 post-fertilization, the interaction between *treatment* and *male* was significant (*male × treatment*, $\chi^2=5.8$, $p=0.016$) indicating that at this sampling point the sieving treatment significantly affected the relative representation of males in the surviving larval populations.

Table 4 presents analyses that specifically examine parental effects for each cohort within rearing conditions. At day 20 post-fertilization, there were significant differences in the relative contributions of the males and females within both rearing conditions. By day 25 post-fertilization, both conditions had moved towards a homogenization of parental contributions.

Table 4

Results of GLIMMIX sub-model focusing on male and female effect for both rearing conditions at each sampling date

		Day 20		Day 25		Day 28	
		χ^2	<i>P</i> value	χ^2	<i>P</i> value	χ^2	<i>P</i> value
Size selection	Male	16.7	<0.001***	~0	0.99	–	–
	Female	30.3	<0.001***	1.1	0.294	–	–
Control	Male	8.3	0.004**	274	<0.001***	17.9	<0.001***
	Female	4.2	0.04*	1.6	0.206	~0	0.99

Table 5

Results of GLIMMIX sub-model focusing on temporal effect considering contribution data for both rearing conditions over time

	Control		Size selection	
	<i>F</i> value	<i>Pr>F</i>	<i>F</i> value	<i>Pr>F</i>
Time	0.43	0.57	0.64	0.57
	χ^2	<i>P</i> value	χ^2	<i>P</i> value
Time × male × female	10.5	0.001	12.5	<0.001***
Male × time	29.9	<0.001***	6.6	0.01**
Female × time	3.3	0.069	20.6	<0.001***
Male × female	7.1	0.008**	0	0.99
Male	9.2	0.002**	17.8	<0.001***
Female	0.1	0.752	6.6	0.01**

Finally, the results presented in Table 5 reveal significant changes in male parental contributions over time, as shown by the significant interaction of *time × male* for both rearing conditions. Differences in female parental contributions only appeared in the sieved cultures.

3.2.3. Effective population size

Temporal variation in the genetic composition of the cohorts, estimated by their effective population size relative to its value at fertilization (i.e. equal gametic contributions between males and between females), is presented in Fig. 3. At day 20 post-fertilization, the effective population sizes were only 31.3% and 40.6% of the initial reference values for the control and size selected conditions, respectively. However, at day 25 post-fertilization, effective size of the settlement cohorts had increased up to $75.2 \pm 6.4\%$ for the control treatment and $56.5 \pm 10.9\%$ for the cohort from size selection conditions. For day 28 post-fertilization (control tanks), the effective population size remained similar to that at day 25 post-fertilization.

4. Discussion

Due to the very high fecundity of bivalves, the number of gametes is generally not a limiting factor for

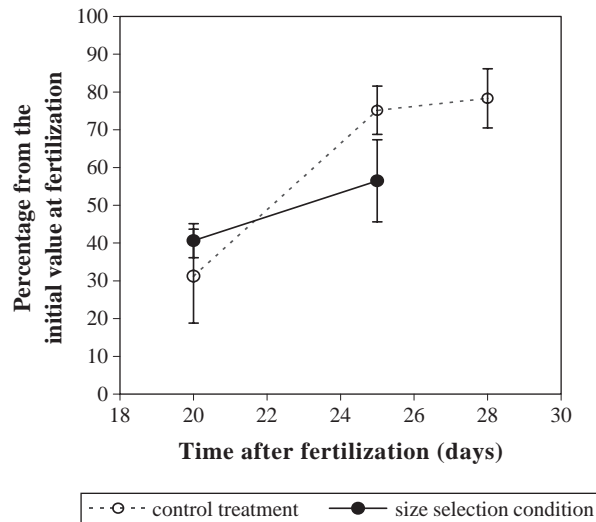


Fig. 3. Evolution of effective population size, expressed as the percentage of the initial value at fertilization.

recruitment in the wild, or for spat production in hatcheries. Hatching rates and larval survival are often unpredictable however, despite the controlled conditions in hatcheries. This can often lead to numbers of fertilized eggs much larger than needed, and larvae are typically culled in order to reduce density during development (Lipovsky, 1984; Loosanoff and Davis, 1963). Sieving is also used to eliminate undesired particles, such as the shells of dead larvae, but the smallest live larvae are removed together with the dead ones. For all these reasons, culling (i.e. the elimination of the smallest larvae by sieving) is a common practice in bivalve hatcheries. However, the phenotypic and genetic impact of this practice had received little attention in previous studies.

4.1. Phenotypic consequences of culling

The effect of progressively eliminating the smallest individuals in a population according to mean larval size and its coefficient of variation depends on the degree and temporal stability of variation among individuals. Unlike later life stages (e.g., Boudry et al., 2003), this phenomenon is poorly documented because larvae cannot be individually tagged. If individual growth performance varies substantially between individuals over the larval growing period, elimination of the smallest individuals in one event would not have much effect on the mean and variation of growth later on. In our experiment, the progressive culling of 50% of the larvae led to an increase in mean larval length of 24.4 μm (+9.7%), relative to the control conditions, and a

decrease in its coefficient of variation from 11.8 to 7.3 (–38.1%) at day 17. It appears therefore that size selection had a greater effect on the variance of larval length than on the mean and that it homogenized larval length and larval growth. This difference between the effect of size selection on mean larval length and on its coefficient of variation was also observed at days 13 and 15 (+9.1% versus –47.9% and +10.3% versus –48.9%, respectively). A significant difference in the coefficient of variation of larval length between the two conditions was already observed as early as day 10, before much culling had been done but by which time the difference in mesh size between the treatments was already large (60 versus 110 μm). Significant differences in mean larval length and population sizes however were only observed at day 13 post-fertilization. In size selected tanks, the coefficient of variation of larval length stopped increasing at day 10 post-fertilization after reaching a maximum of 7.5. However, values in the control tanks continued to increase up to 14.4 at day 13 post-fertilization and then remained constant.

The second important effect of size selection was that the pediveliger stage was reached sooner. Similarly to larval growth, variation in the date of settlement (5 versus 11 days) was more greatly affected than the mean (21 versus 24 days: a difference of 3 days (+14%)). Because slow growing larvae reached the pediveliger stage and settled later than fast growing ones, larval growth variability and timing of the pediveliger stage are likely to be directly related. Due to high variability in larval growth rate therefore, low to moderate size selection during the larval phase can have

a strong effect on variability in larval length and timing of the pediveliger stage and a smaller effect on their means.

Population density can have strong negative effects on growth and survival in many organisms (for review, see Rodríguez-Muñoz et al., 2003). In our experiment food was provided in sufficient quantities that it was always in excess of larval needs. This should mean that density-dependent effects were negligible, which was supported in the experiment by the fact that fast-growing larvae reached the pediveliger stage at the same date in both conditions (size-selected versus control).

Although 50% of the larvae were culled during larval rearing in the size-selection conditions, the number of spat after settlement was only 15% less than in the control. Further studies are needed to define the optimal culling ratio that would simultaneously minimize the loss of spat and reduce variability in the timing of settlement. Our results suggest that sieving out small larvae in hatcheries saves time and only reduces production a little because the remaining larger larvae have better relative survival and settlement success.

4.2. Genetic consequences of culling

Monitoring and maintaining genetic variability during rearing is essential for successful hatchery management (Primmer et al., 1999). Genetic factors determine the fitness and adaptability of organisms such as shellfish (Taniguchi, 2003). Maintaining a wide range of genotypes could give a hatchery population more flexibility of response to a constantly changing environment. Reduced genetic variability in hatchery stocks has often been reported in shellfish (Gosling, 1982; Wada, 1986; Dillon and Manzi, 1987; Hedgecock and Sly, 1990; Paynter and DiMichele, 1990; Vrijenhoek et al., 1990; Gaffney et al., 1992; Durand et al., 1993). High fecundity combined with high variability in reproductive success has been shown to result in high genetic drift (Boudry et al., 2002). Our data do not allow us to directly estimate the overall impact of culling on genetic variation in the long term. However, our results do show that culling has a significant impact on genetic variation of cohorts of larvae which are ready to settle. At day 20 post-fertilization, size-selected and control tanks presented similar uneven parental contributions (i.e., the first larvae ready to settle), but this was not so much the case at day 25 post-fertilization. The genetic impact of culling during the larval stage therefore appears to be essentially mediated through its effects on the timing of settlement rather than a direct effect on

parental contribution. This clearly illustrates the importance of later cohorts in minimizing the effects of genetic drift in hatchery propagated stocks and agrees with Laing and Earl (1998), who proposed that all larvae be retained for spat production. For these authors, later settled cohorts deserve attention since they can also provide spat of acceptable quality. Our study shows that these late settling cohorts are important for minimizing the variability in reproductive success and therefore maximizing the overall genetic variability of a hatchery propagated population.

Culling might also have a direct genetic effect by selecting fast growing genotypes at the larval stage, although such selective processes caused by intensive hatchery practices have rarely been questioned. Ernande et al. (2003) investigated genetic variability and genetic correlations in early life-history traits of *C. gigas*. According to these authors, genetic polymorphism in early life-history seems to range between two extreme genetically-based “strategies”: (1) fast growing larvae settling large but experiencing low settlement success and poor growth and survival after settlement, and (2) slow growing larvae settling small but experiencing higher settlement success and better growth and survival after settlement. On a population with these extremes, size selection by culling slow growing larvae would lead to reduced settlement success, and reduced growth and survival after settlement. However, positive phenotypic relationships were shown between larval and spat growth in both *C. virginica* (Newkirk et al., 1977) and *C. gigas* (Collet et al., 1999). Our present results also support a positive phenotypic relationship between larval growth, survival and settlement success, and show that genetic variability exists for these traits in *C. gigas*. Further studies are required to validate the genetic correlations observed by Ernande et al. (2003) between early life history traits and to investigate the mechanisms responsible for their reversal at the phenotypic level. Comparisons of early stage developmental traits between domesticated stocks (i.e. hatchery propagated populations that have been isolated for several generations) and wild populations would help to determine if differential selection occurs in hatcheries.

5. Conclusion

Our experimental data support the existence of genetic variability in early life developmental traits in *C. gigas*. The culling of slow-growing larvae therefore results in a significant loss of diversity at the larval stage, though this common hatchery practice leads to faster settlement and better relative survival of oyster

larvae. The genetic effect of this size selection is mediated through its effects on the timing of settlement. This relationship suggests how our results also apply to effects of other size-related selective pressures existing in the wild.

Acknowledgements

This work was partially funded by the BRG (Bureau des Ressources Génétiques) and the Ministère de l'Écologie et du Développement Durable (Convention n° 14-C/2003). The authors wish to thank the IFREMER hatchery team in La Tremblade for technical assistance during the larval and post-larval rearing and, more specially, Pascal Phélipot. We thank Mark Camara for improving this paper and two anonymous referees for useful comments and suggestions. [RH]

References

- Abdel-Hamid, M.E., Mona, M.H., Khalil, A.M., 1992. Effects of temperature and food concentrations on the growth of the larvae and spat of the edible oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). J. Mar. Biol. Assoc. India 34, 195–202.
- Bardach, J.E., Ryther, J.H., McLarney, W.O., 1972. Aquaculture: The Farming and Husbandry of Freshwater and Marine Organisms. Wiley-Interscience, New York.
- Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., Hervouet, V., Bonhomme, F., 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. Aquaculture 204, 283–296.
- Boudry, P., Collet, B., Heurtebise, S., Morand, B., Gérard, A., 2003. Individual growth performance of juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): stability over time and interaction with survival. Aquac. Int. 11, 429–448.
- Boudry, P., Dégremont, L., Taris, N., McCombie, H., Haffray, P., Ernande, B., 2004. Genetic variability and selective breeding for traits of aquacultural interest in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Bull. Aquac. Assoc. Canada 104, 12–18.
- Breese, W.P., Malouf, R.E., 1975. Hatchery Manual for the Pacific Oyster. State Univ. Sea Grant Pub., Oreg.
- Brooks, W.K., 1879. Abstract of observations upon fertilization of oyster eggs and embryology of American oyster. Am. J. Sci., New Haven XVIII, 425–527.
- Collet, B., Boudry, P., Thebault, A., Heurtebise, S., Morand, B., Gérard, A., 1999. Relationship between pre- and post settlement growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 175, 215–226.
- Dillon, R.T., Manzi, J.J., 1987. Hard clam, *Mercenaria mercenaria*, broodstocks: genetic drift and loss of rare alleles without reduction in heterozygosity. Aquaculture 60, 99–105.
- Duchesne, P., Godbout, M.H., Bernatchez, L., 2002. PAPA (Package for the Analysis of Parental Allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. Mol. Ecol. Notes 2, 191–194.
- Dupuy, J.L., Windsor, N.T., Sutton, C.E., 1977. Manual for design and operation of an oyster seed hatchery for the American oyster *Crassostrea virginica*. Virginia Institute of Marine Science, Special Report No 142. .
- Durand, P., Wada, K.T., Blanc, F., 1993. Genetic variation in wild and hatchery stocks of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, from Japan. Aquaculture 110, 27–40.
- Ernande, B., Clobert, J., McCombie, H., Boudry, P., 2003. Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): a quantitative genetics study. J. Evol. Biol. 16, 399–441.
- FAO, 2003. Aquaculture Production: Quantities 1950–2001. Fishstat Plus. <http://www.fao.org/fi/statist/fisofit/FISHPLUS.asp#Download>.
- Gaffney, P.M., Davis, C.V., Hawes, R.O., 1992. Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). Aquaculture 105, 1–20.
- Gosling, E.M., 1982. Genetic variability in hatchery-produced Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture 26, 273–287.
- Gosling, E., 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Blackwell Publishing. 443 pp.
- Haws, M.C., DiMichele, L., Hand, S.C., 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 2, 207–217.
- Hedgecock, D., 1994. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: Beaumont, A.R. (Ed.), Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. Chapman and Hall, London, pp. 122–134.
- Hedgecock, D., Sly, F., 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 88, 21–38.
- Hedgecock, D., Chow, V., Waples, R.S., 1992. Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies. Aquaculture 108, 215–232.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO, Fisheries Technical Paper No.471. Rome. 200 pp.
- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flynn, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib reared families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. Aquaculture 173, 105–116.
- Jones, G., Jones, B., 1983. Methods for setting hatchery produced oyster larvae. Marine Resources Branch, Ministry of Environment, BC, Canada. Information report 4: 94 pp.
- Laing, I., Earl, N.H., 1998. The lipid content, spatfall and subsequent growth of early and late settling hatchery-reared Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg larvae. Aquac. Res. 29, 19–25.
- Langdon, C., Evans, F., Jacobson, D., Blouin, M., 2003. Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. Aquaculture 220, 227–244.
- Lannan, J.E., 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: I. Genetic and environmental variation in survival in the larval rearing system. Aquaculture 21, 323–336.
- Lemos, M.B.N., Nascimento, I.A., De-Araujo, M.M.S., Pereira, S.A., Bahia, I., Smith, D.H., 1994. The combined effects of salinity, temperature, antibiotic and aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*. J. Shellfish Res. 13, 187–192.
- Li, G., Hedgecock, D., 1998. Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55, 1025–1033.
- Lipovsky, V.P., 1984. Oyster egg development as related to larval production in a commercial hatchery. Aquaculture 39, 229–235.

- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W., Wolfinger, R.D., 1996. SAS System for Mixed Models. SAS Inst., Cary, NC.
- Loosanoff, V.L., Davis, H.C., 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Adv. Mar. Biol.* 1, 1–136.
- Lucas, A., 1981. Le rôle du naissain d'écloserie dans la culture des bivalves en 1980. *La Pêche Maritime* 294–297.
- Matthiessen, G.C., Toner, R.C., 1966. Possible methods of improving the shellfish industry of Martha's Vineyard, Duke's County, Massachusetts. *Mar. Res. Fund.* 138 pp.
- McCullagh, P., Nelder, J.A., 1989. *Generalized Linear Models*. Chapman and Hall, London.
- Moran, N.A., 1994. Adaptation and constraint in the complex life cycles of animals. *Annu. Rev. Ecol. S.* 25, 573–600.
- Nell, J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210, 69–88.
- Newkirk, G.F., 1981. On the unpredictability of bivalve growth rates: is a slow growing juvenile oyster a runt for life? In: Claus, C., et al. (Ed.), *Nursery Culturing of Bivalve Molluscs: Proceedings of the International Workshop on Nursery Culturing of Bivalve Molluscs* Ghent, Belgium, 24–26 February 1981 European Mariculture Society Special Publication, vol. 7, pp. 211–218.
- Newkirk, G.F., Haley, L.E., Waugh, D.L., Doyle, R., 1977. Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 41, 49–52.
- Paynter, K.T., DiMichele, L., 1990. Growth of tray-cultured oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin) in Chesapeake Bay. *Aquaculture* 87, 289–297.
- Primmer, C.R., Aho, T., Piironen, J., Estoup, A., Cornuet, J.-M., Ranta, E., 1999. Microsatellite analysis of hatchery stocks and natural populations of Arctic Charr, *Salvelinus alpinus*, from the Nordic Region: implications for conservation. *Hereditas* 130, 277–289.
- 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.
- Robertson, A., 1961. Inbreeding in artificial selection programmes. *Genet. Res.* 2, 189–194.
- Rodríguez-Muñoz, R., Nicieza, A.G., Braña, F., 2003. Density-dependent growth of Sea Lamprey larvae: evidence for chemical interference. *Funct. Ecol.* 17, 403–408.
- SAS Institute Inc., 1999. *SAS/STAT User's Guide*, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sgrò, C.M., Hoffmann, A.A., 2004. Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* 93, 241–248.
- Strathmann, R.R., Fenaux, L., Sewell, A.T., Strathmann, M.F., 1993. Abundance of food affects relative size of larval and postlarval structures of a molluscan veliger. *Biol. Bull.* 185, 232–239.
- Taniguchi, N., 2003. Genetic factors in broodstock management for seed production. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 13, 177–185.
- Taris, N., Baron, S., Sharbel, T.F., Sauvage, C., Boudry, P., 2005. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquac. Res.* 36, 1–3.
- Thorson, G., 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Rev.* 25, 1–45.
- Utting, S.D., Spencer, B.E., 1991. The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles. *Lab. Leaf. MAFF Fish. Res.* Lowestoft 68, 31 pp.
- Vrijenhoek, R.C., Ford, S.E., Haskin, H.H., 1990. Maintenance of heterozygosity during selective breeding of oysters for resistance to MSX disease. *J. Heredity* 81, 418–423.
- Wada, K.T., 1986. Genetic variability at four polymorphic loci in Japanese pearl oysters, *Pinctada fucata martensii*, selected for six generations. *Aquaculture* 59, 139–146.
- Walne, P.R., 1965. Observations on the influence of food supply and temperature on the feeding and growth of the larvae of *Ostrea edulis*. *Min. Agric. Fish. Food Fish. Invest.*, UK, Ser. II, 1–45.
- Walne, P.R., 1974. *Culture of Bivalve Molluscs*. Fishing News (Books) Ltd, Surrey England. 189 pp.
- Wilbur, H.M., 1980. Complex life cycles. *Annu. Rev. Ecol. S.* 11, 67–93.
- Williams, G.C., 1975. *Sex and Evolution*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Wray, G.A., Raff, R.A., 1991. The evolution of developmental strategy in marine invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 6, 45–50.