

**INSTITUT NATIONAL
AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON
I.N.A.-P.G.**

**IFREMER L.G.P.
LABORATOIRE DE GENETIQUE ET PATHOLOGIE
IFREMER-CNRS C.R.E.M.A.
CENTRE DE RECHERCHE EN ECOLOGIE
MARINE ET AQUACULTURE**

THESE

**Présentée par Bertrand Collet
Ingénieur agronome de l'I.N.A.-P.G.**

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Sujet:

**Bases génétiques des caractères physiologiques
impliqués dans la croissance chez l'huître creuse
*Crassostrea gigas***

Soutenue le 18 Décembre 1998 à l'INA-PG

Devant le jury composé de:

Pr. Jacques BOUGLER	Professeur INA-PG	Président
Dr. Benoît FAUCONNEAU	Directeur de recherche INRA	Rapporteur
Dr. Anthony HAWKINS	Directeur de recherche PLM	Rapporteur
Dr. François BONHOMME	Directeur de recherche CNRS	Examineur
Pr. Françoise BLANC	Professeur Université Montpellier II	Examineur
Dr. Maurice HERAL	Directeur de recherche IFREMER	Directeur de thèse
Dr. Pierre BOUDRY	Chargé de recherche IFREMER	Codirecteur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement André Gérard et Maurice Héral qui m'ont accueillis dans leur laboratoire, respectivement le laboratoire IFREMER de génétique et pathologie et le centre IFREMER CNRS de recherche en écologie marine et aquaculture. Merci pour m'avoir permis de participer au projet multidisciplinaire européen GENEPHYS. Merci également Yamama Naciri-Graven qui a participé activement à l'initiation de ce programme.

Je remercie également Jean-Pierre Flash pour m'avoir accueilli dans les murs de la station de La Tremblade et de la maison des stagiaires.

Pierre Boudry, m'a guidé avec beaucoup de patience dans mon travail. Il a su m'apprendre à être rigoureux dans les analyses et les interprétations des phénomènes de croissance. C'est également grâce à lui que j'ai eu la possibilité d'ajouter une "couleur génétique" à ce travail. Un seul regret: j'ai échoué dans la mission consistant à transformer un lyophilisateur en machine à carboglace !!

Le développement de nouvelles méthodologies de mesures physiologiques n'aurait jamais pu être réalisé sans Serge Bougrier. Nous avons partagé les joies et parfois les énervements de l'écophysiologie des mollusques en individuel et avec des effectifs jamais atteints jusqu'à présent ! J'avoue que j'ai appris à être patient au cours de ces analyses. Merci beaucoup Serge, pour la clarté de tes explications, pour les discussions constructives, ton savoir-faire en matière de physiologie des mollusques et pour l'aide que tu m'a apporté lors de la rédaction.

Le système de mesure en continu de la filtration et de la consommation d'oxygène a pu se faire grâce à un système électronique et informatique complexe mis au point par Hervé Chartois du laboratoire IFREMER-CNRS de L'Houmeau.

Merci à Pierre Garen, pour ta participation et ton aide dans les mesures en continu de la filtration et de la consommation d'oxygène, en particulier sur les aspects stabilité temporelle.

Merci à Marcel Guillaut, pour le soin apporté aux animaux dans les claires du CREMA à L'Houmeau.

Serge Heurtebise a énormément contribué à GENEPHYS et donc également à ma thèse avec une bonne humeur quotidienne et un humour défiant toute concurrence. C'est grâce à lui qu'une grande partie des animaux de GENEPHYS a survécu malgré la

menace du virus herpès. Merci, Serge pour tes nombreux coups de main pour les élevages, les suivis de croissance et les bons moments passé de GENEPHYS.

Bérénice Morand est intervenue dans le cadre d'un DESS au début de ma thèse sur l'étude des groupes de tamisage et l'interaction entre mortalité et croissance. Nous avons avec Serge et Pierre constitué la "GENEPHYS' team" avec le cri de ralliement désormais bien connu de "Goutte mes frites" ... Merci encore Bérénice pour ton dynamisme et ta bonne humeur quotidienne.

Merci à Pascal Phélipot pour la pris en charge des élevages larvaires et à Christophe Ledu pour toute l'aide apportée et en particulier en cytogénétique pour les estimations des taux de développement. Je remercie également les autres memebres de l'équipe technique de La Tremblade en particulier Stéphane Baudoin et Frédéric Blouin qui assurent le bon fonctionnement de l'écloserie et donc des programmes.

Merci à Emile Planche, pour ton aide indispensable dans un programme où nous avons du bricoler des installations qui ressemblaient plus à une station spatiale qu'à des structures d'élevage, il nous est même arrivé de dériver des circuits d'eau et de phytoplancton ...

Florence Cornette, a participé à plusieurs aspects de ma thèse. Tout d'abord, en physiologie où nous nous sommes souvent relayés pour faire les "3-8" pour suivre ces chères huîtres sur des périodes de 24 heures ... En génétique où nous nous sommes acharnés à amplifier de l'ADN des groupes de tamisage récalcitrants. Et enfin, en zootechnie grâce à tes connaissances des bivalves nous avons réussi à conserver les lots expérimentaux vivants. Merci, Florence pour ton dynamisme à toute épreuve et en particulier lors des épisodes désespérant de l'ADN impossible à amplifier et des gels blancs.

Merci à Véronique Hervouet, qui a fait son DEA dans le cadre de GENEPHYS, de l'URM 16 et de la partie microsatellite de ma thèse.

Helen Boudry, merci beaucoup pour tout l'aide que tu as apporté dans le programme GENEPHYS, en particulier pour toute les traductions pour les rapports intermédiaires.

J'ai eu d'innombrables discussions enrichissantes sur la croissance des huîtres avec Emmanuel Goyard dont la patience et la rigueur scientifique m'ont impressionné. Merci également pour ta connaissance sans limite d'Excel, le logiciel qui fait tout (sauf la carboglace), tu m'as souvent sauver (ou sauver le PC) d'une crise de nerf !

Merci à François Bonhomme pour m'avoir parrainé pendant ces 3 années de recherche et pour sa collaboration dans le programme GENEPHYS.

Anne Thebault, on s'était déjà croisés à l'Université et on se retrouve dans le même labo ... Merci beaucoup pour ta patience et ta rigueur de véritable statisticienne (si, si j'insiste), et au fait ... le modèle, il est linéaire ou pas ?

Merci à Catherine Mariojous, de la Chaire de Zootechnie à l'INA-PG, pour m'avoir donné goût à la recherche sur les animaux aquatiques et pour m'avoir mis sur la voie de cette thèse. Merci également à Xavier Rognon, coencadrant de l'OID "Production en milieu aquatique".

Jacques Bougler a suivi mon travail régulièrement par les rapports intermédiaires et les corrections du manuscrit. C'est à l'occasion de quelques réunions à l'agro que nous avons eu des discussions intéressantes sur la croissance des huîtres.

Merci à Jean-Pierre Baud qui a participé activement à ce travail en particulier pour l'étude de la croissance au stade adulte en milieu contrôlé à la nurserie de Bouin. Nous avons pu mettre en place cette expérimentation colossale de manière rigoureuse grâce à l'équipe et aux installations de Bouin.

La croissance en milieu naturel n'a été possible que grâce à Dominique Buestel et son équipe de l'IFREMER de Palavas qui maîtrisent les techniques de culture des huîtres sur corde, typique de l'Etang de Thau.

Je tiens à remercier également Marc Barre avec qui j'ai eu des discussions fructueuses en particulier sur les comparaisons de croissance des groupes de tamisage.

Sylvie Dumont-Lapègue et Edouard Bedier sont arrivés au laboratoire alors que j'étais dans la rédaction finale du manuscrit. Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers eux pour l'intérêt qu'ils ont porté à GENEPHYS et pour les corrections, les commentaires et les conseils précieux qu'ils m'ont donné pour la rédaction.

Je tiens également à remercier les différents partenaires du programme GENEPHYS, qui par leur compétence et leur rigueur scientifique ont fait de chacune des réunions annuelles un moment inoubliable: Noël Wilkins et Sophie Hubert (UCG, Galway, Irlande), Georgios Kotoulas (IMBC, Héraklion, Grèce), Antonio Magoulas (IMBC, Héraklion, Grèce), Anthony Hawkins (PML, Plymouth, Angleterre), Jean-François Samain (IFREMER, Brest), François Bonhomme (LGP, Montpellier), Catherine Thiriot et Alexandra Leitao (OOV, Villefranche sur mer), Dominique Buestel (IFREMER, Palavas), Jean-Pierre Baud (IFREMER, Bouin).

Un grand merci à tout le personnel administratif et logistique : Yvette, Ginette, Martine, Delphine, Florence

Merci à toute l'équipe de la pathologie pour la bonne humeur quotidienne Franck, Nathalie, Tristan, Bruno; les thésards, post-docs et stagiaires de l'équipe de génétique: Ludovic, Stéphane, Jean-François, Christophe (Il connaît toujours pas Raoul ?), Xavier, Nicolas, Marianne; de l'équipe de pathologie: Véronique, Magali, Isabelle, Quiggang, Sven, Corinne, David, Manuela, Angélique .

Et enfin, (le meilleur pour la fin), merci à Catherine qui m'a apporté un soutiens moral et psychologique tout au long de ces trois années. Merci pour tout tes conseils, pour ton aide dans l'écriture des articles. Merci pour tous les merveilleux moments passés ensemble, passé et futur à Aberdeen. *Go Raibh Maith Agat !!*

à mes parents

SOMMAIRE

Partie I: Introduction générale

1. Quelques données économiques sur la production ostréicole	12
2. Historique de l'ostréiculture en France	12
3. Systématique de <i>Crassostrea gigas</i>	13
4. Répartition géographique	13
5. Anatomie	13
6. Cycle de vie	15
6.1 Reproduction	15
6.2 Développement	16
7. Elevage	17
8. Un grand nombre de questions sans réponse	20
9. Présentation de l'étude	21

Partie II: Croissance

Introduction	25
1. La croissance des bivalves	26
2. Méthodes d'étude de la croissance	28
Chapitre 1: Production d'une population à large base génétique et étude de la relation entre croissance pré et post métamorphique chez <i>Crassostrea gigas</i>	31
1. Introduction	32
2. Matériels et méthodes	33
2.1. Echantillonnage des géniteurs G0	33
2.2. Croisements	34
2.3. Taux de développement	36
2.4. Elevages larvaires	36
2.4.1. Groupes de tamisage	38
2.4.2. Fixation	38
2.4.3. Suivi de croissance	38
2.4.4. Analyses statistiques	38
3. Résultats	40
3.1. Caractéristiques des populations de géniteurs	40
3.2. Taux d'éclosion	40
3.3. Croisements et élevages larvaires (G1 5x5 et 20 x20)	40
3.3.1. Elevage larvaire	40
3.3.2. Croissance post-larvaire	43
3.3.3. Croissance juvénile	44
4. Discussion	49
4.1. Géniteurs	49
4.2. Croisements	50
4.3. La croissance précoce post-larvaire est-elle dépendante de la croissance larvaire ?	50
4.4. La fixation est-elle dépendante de la taille ou de l'âge des larves ?	52
4.5. Une nouvelle méthode de fixation chez les bivalves marins	53

Chapitre 2: Analyse de la croissance en milieu contrôlé du stade naissain au stade adulte: stabilité des performances de croissance au cours d'un cycle annuel et incidence de la mortalité chez *Crassostrea gigas*

1. Introduction	56
2. Matériels et méthodes	57
2.1 Matériel biologique	57
2.2 Suivi de croissance et de mortalité	60
2.3 Analyses statistiques	60

3. Résultats	60
3.1 Analyse de la variabilité et de l'effet de la mortalité	60
3.2 Effet de la population parentale sur le taux de croissance	64
3.3 Conservation du taux de croissance au cours du temps	64
4. Discussion	65
4.1 Variabilité pour la vitesse de croissance	65
4.2 La mortalité affecte la croissance	71
4.3 La population parentale influe sur le taux de croissance	72
4.4 Les taux de croissance se conservent au cours du temps	72

Chapitre 3: Etude de la croissance chez *Crassostrea gigas* au stade adulte: effet de la densité d'élevage et analyse de la stabilité temporelle en éclosion et dans le milieu naturel

75

1. Introduction	76
2. Matériels et méthodes.....	77
2.1. Expérience de Bouin	77
2.1.1. Matériel biologique.....	77
2.1.2. Dispositif expérimental.....	77
2.1.3. Echantillonnage	79
2.1.4. Suivi de croissance	80
2.2. Expérience de Palavas.....	80
2.3. Analyses statistiques	83
3. Résultats	84
3.1. Suivi de Bouin	84
3.1.1. Hydrobiologie.....	84
3.1.2. Courbes de croissances individuelles	84
3.1.3. Modèle global	85
3.1.4. Effet du niveau de compétition trophique sur la croissance	85
3.1.5. Différences de croissance entre populations et entre sites de pré grossissement.....	85
3.1.6. Influence de la taille (poids total initial).....	86
3.1.7. Corrélation entre poids total initial et final.....	90
3.2. Suivi de croissance dans l'étang de Thau	90
4. Discussion	90
4.1. Relation vitesse de croissance et poids total initial	91
4.2. Effet de la population et du parcours de pré grossissement	91
4.3. Effet du niveau de densité d'élevage.....	91
4.4. Constance dans le temps des performances de croissance	98

Partie III: Physiologie

Introduction	100
1. Définitions et rappels morphologiques	101
2. Les bivalves, des organismes filtreurs.....	101
3. Bioénergétique	103
3.1. Paramètres de filtration des mollusques filtreurs: terminologie.....	104
3.1. Méthode expérimentale d'estimation des paramètres physiologiques.....	107

Chapitre 4: Performances physiologiques d'une population d'huîtres creuse *Crassostrea gigas* obtenue en éclosion, en milieu à très faible charge phytoplanctonique

109

1. Introduction	110
2. Matériels et méthodes.....	110
2.1. Matériel biologiques	110
2.2. Dispositif expérimental	110
2.3. Méthode des biodépôts	111
2.4. Analyses statistiques	113

3. Résultats	113
3.1. Croissance	113
3.2. Estimation des poids secs	114
3.3. Effet de la population	114
3.4. Effet de la taille	114
4. Discussion	117

Chapitre 5: Stabilité temporelle des performances physiologiques chez *Crassostrea gigas* au cours d'un cycle annuel: mesures en continu de la filtration et de la consommation d'oxygène

123

1. Introduction	124
2. Matériels et méthodes	124
2.1 Matériel biologique, calendrier et conditions expérimentales	124
2.2 Mesures de consommation d'oxygène en continu sur une période de 24 heures	125
2.2.1 Dispositif expérimental	125
2.2.2 Activité respiratoire (RTA)	126
2.2.3 Consommation d'oxygène	127
2.3 Mesures de filtration en continu sur une période de 24 heures	127
2.3.1 Dispositif expérimental	127
2.3.2 Extraction et pré-traitement des fichiers de données	128
2.3.3 Relation entre valeurs de fluorimétrie et TPM mesuré	129
2.3.4 Activité de filtration (FTA)	130
2.3.5 Mesure de la consommation	130
2.3.6 Biodépôts	131
2.3.7 Analyse statistique	131
3. Résultats	131
3.1 Croissance	131
3.2 Relations allométriques	132
3.3 Effet de la date de mesure	132
3.3.1 Activités FTA et RTA	132
3.3.2 Bilan énergétique	133
3.4 Stabilité temporelle	134
3.5 Classement des individus	135
4. Discussion	136

Partie IV: Génétique: détermination de parenté à l'aide d'un marqueur microsatellite

Introduction	144
1. Déficit en hétérozygotes	145
2. Relation entre hétérozygotie et croissance (RHC)	146
2.1 Dominance multi-locus	147
2.2 Superdominance directe	147
2.3 Superdominance associative	147
2.4 Epistasie	148
2.5 Dépression de consanguinité	148
2.6 Relation hétérozygotie et paramètres physiologiques	150
3. Les marqueurs microsatellites, outils pour la recherche de parenté	150
3.1 Définition	150
3.2 Polymorphisme	151
3.3 Applications	152

Chapitre 6: Analyses de parenté sur naissain et larves de *Crassostrea gigas* a l'aide de marqueurs microsatellites: effet de la compétition gamétique et zygotique sur les contributions parentales 155

1. Introduction.....	156
2. Matériels et méthodes.....	156
2.1. Matériel biologique.....	156
2.1.1. Croisements	156
2.1.2. Groupes de tamisage (chapitre 1)	157
2.2. Protocoles d'extraction d'ADN.....	157
2.2.1. Extraction d'ADN génomique de naissain par la méthode phénol-chloroforme	157
2.2.2. Extraction d'ADN génomique de larves: méthode au chelex	158
2.3. Amplification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne).....	158
2.4. Migration sur gel et autoradiographie.....	159
2.5. Analyse des données.....	159
3. Résultats	160
3.1. Groupes de tamisage.....	160
3.2. Croisements et m.....	160
3.2.1. Analyse de la ségrégation du locus l10.....	162
3.2.2. Contributions parentales	162
3.2.3. Compétition gamétique.....	162
3.2.4. Evolution dans le temps de la structure génétique de la population	166
3.2.5. Comparaison entre compétition spermatique et survie des descendants des mâles	167
3.2.6. Croissance.....	167
4. Discussion	167
4.1. Des contributions parentales déséquilibrées	167
4.2. Compétition spermatique	171
4.3. Evolution durant la phase larvaire	172
4.4. Evolution après métamorphose.....	172
4.5. Croissance.....	174

Conclusion générale et perspectives

Bilan	178
Perspectives	181

Références bibliographiques 182

Annexes 209

Annexe 1	i
Annexe 2	iii
Annexe 3	xv
Annexe 4	xxviii
Annexe 5	xxxvii
Annexe 6	lvii
Annexe 7	lix
Annexe 8	lx
Annexe 9	lxii

PREMIERE PARTIE

INTRODUCTION GENERALE

Crassostrea gigas
Biologie et Aquaculture
Présentation générale de l'étude

1. *Quelques données économiques sur la production ostréicole*

L'huître pacifique *Crassostrea gigas* a été nommée par Thunberg en 1795. D'origine asiatique (Japon, Chine, Corée), elle a été introduite dans de nombreuses autres régions du monde (Coleman, 1986; Grizel, 1996) et représente aujourd'hui 86 % de la production mondiale d'huîtres (Données FAO). Malgré son importance commerciale, elle n'a pas encore été génétiquement améliorée et peut donc être considérée comme "non domestiquée". La principale source du cheptel en France est le captage naturel, issu principalement de la reproduction des huîtres dans les bassins d'Arcachon et Marennes-Oléron.

La production française de l'huître creuse *Crassostrea gigas* se positionne, avec 144 000 tonnes, au 3^{ème} rang mondial après le Japon (225 000 t.) et la Corée (185 000 t.). La production chinoise est mal connue mais est sans doute importante. L'ostréiculture, par son volume de production, est la première activité aquacole en France avant la mytiliculture et l'élevage de la truite. Malgré son importance dans l'économie mondiale (2 900 000 tonnes produites en 1996, données FAO), très peu de programmes de sélection ont été mis en œuvre sur cette espèce.

2. *Historique de l'ostréiculture en France*

La façade nord Atlantique et notamment le littoral français a longtemps été le lieu privilégié d'importants gisements naturels d'huîtres plates *Ostrea edulis* exploités intensément pendant des siècles, par simple collecte. L'intensification de la pêche a contribué au déclin des gisements d'huîtres plates déjà affaiblis par des épisodes de mortalité. Les plus importants ont eu lieu en 1920 et à la fin des années 1960 et 1970 avec respectivement l'apparition des parasites *Marteilia refringens* (protozoaire parasite du système digestif) et *Bonamia ostreae* (protozoaire parasite des cellules sanguines). En 1868, le bateau "Le Morlaisien", transportant des huîtres creuses *Crassostrea angulata* en provenance des côtes du Portugal, s'est réfugié dans l'estuaire de la Gironde au cours d'une tempête l'obligeant à rejeter sa cargaison à la mer. L'expansion de l'huître creuse *Crassostrea angulata* a été ensuite très rapide jusqu'en 1971 où elle disparaît suite à la "maladie des branchies", infection virale engendrée par un agent pathogène de type iridovirus (Comps *et al.*, 1976). Pour "sauver" l'activité ostréicole, des populations d'huîtres japonaises *Crassostrea gigas* en provenance du Japon et du Canada ont été introduites en France (Grizel et Héral, 1991), aidés par l'absence de compétiteur (l'huître portugaise étant restreinte au sud de l'Europe au moment de l'importation massive, et les stocks d'huîtres plates *Ostrea edulis* ayant fortement diminué).

La figure 1-1 illustre l'historique de l'activité ostréicole française du 20ème siècle et l'évolution de l'importance économique de chaque espèce.

3. *Systématique de Crassostrea gigas*

Crassostrea gigas appartient à l'embranchement des Mollusques, classe des Bivalves, Ordre des Fillibranches et à la famille des Crassostreidae (Grasset, 1960; tableau 1-1). La systématique des mollusques est complexe et sujette à des controverses. La classification originelle repose sur des critères anatomiques tels que la forme de la coquille, la charnière, la structure des branchies, l'ouverture palléale, la présence ou l'absence de siphons etc.

4. *Répartition géographique*

Crassostrea gigas est naturellement présente dans l'Océan Pacifique, en Russie (Okhostsk; Vladivostock), dans l'île Sakhalin, au Japon, en Corée, à Taiwan. Cette espèce a été introduite volontairement ou non dans différentes parties du monde et sa reproduction dans le milieu naturel se fait avec plus ou moins de succès sur les côtes nord américaines du Pacifique, au Cap (Afrique du Sud), en Tasmanie (Australie), en Europe et en Nouvelle Zélande (Smith, 1986).

5. *Anatomie*

Les caractéristiques principales des **mollusques** sont, d'une part la mollesse de leur corps non segmenté et d'autre part, la géométrie de la coquille le plus souvent calcaire, parfois chitineuse avec ses nombreuses variétés de forme.

Le corps d'un mollusque se compose fondamentalement de 5 régions distinctes (figure 1-2):

- une zone antérieure comprenant les récepteurs sensoriels et l'appareil buccal,
- le pied, orienté du côté ventral,
- le sac viscéral composé de la partie principale du système digestif (estomac et glande digestive), du cœur, des reins et des gonades,
- le manteau, repli tégumentaire entourant le sac viscéral et formant une cavité palléale renfermant les branchies ou cténidies et dans laquelle débouchent l'anus, les orifices génitaux et rénaux,
- la coquille ou test protégeant le corps de l'animal.

Les **lamellibranches** ou **bivalves** se distinguent par leurs branchies en lamelles et leur coquille transformée en un système à 2 valves articulées par une charnière. L'appareil complexe de fermeture est formé de deux muscles adducteurs et d'un ligament élastique reliant les deux valves.

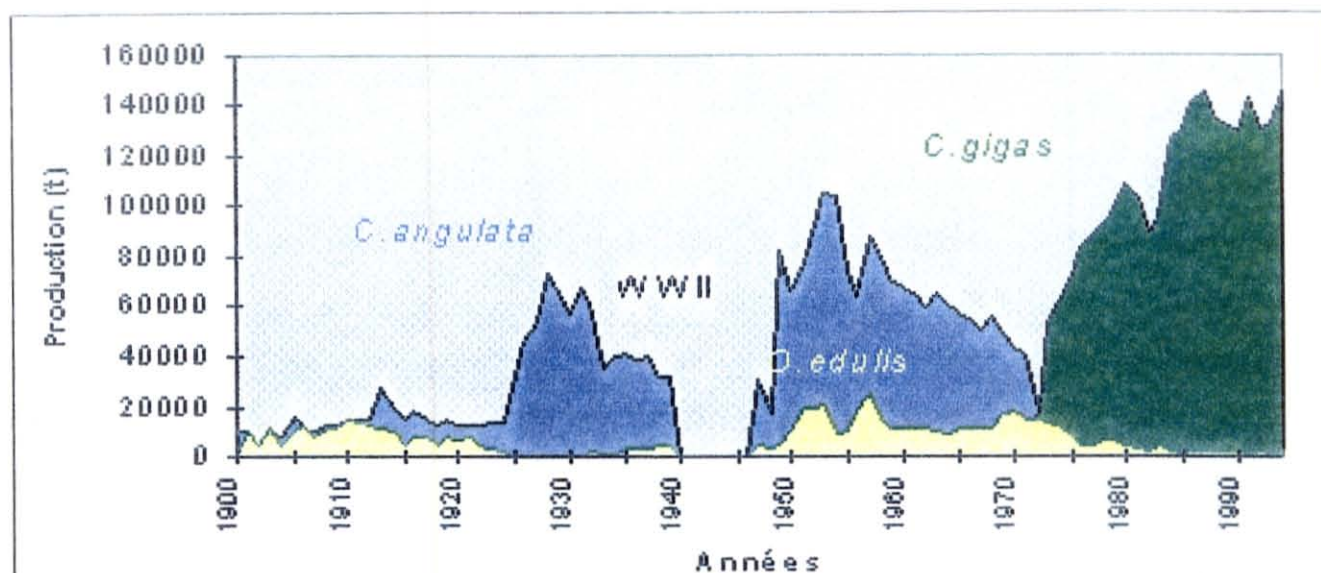


figure 1-1: Production ostréicole en France depuis le début du siècle: tonnage par espèce. WWII: deuxième guerre mondiale (D'après Goulletquer & Héral, 1997).

tableau 1-1: Systématique de *Crassostrea gigas*

Embranchement	MOLLUSQUES
Classe	BIVALVES/LAMELLIBRANCHES
Ordre	FILLIBRANCHES
Sous-Ordre	ANISOMYRIA
Super-Famille	OESTREIOIDEA
Famille	CRASSOSTREIDAE
Genre	CRASSOSTREA
Espèce	<i>Crassostrea gigas</i>

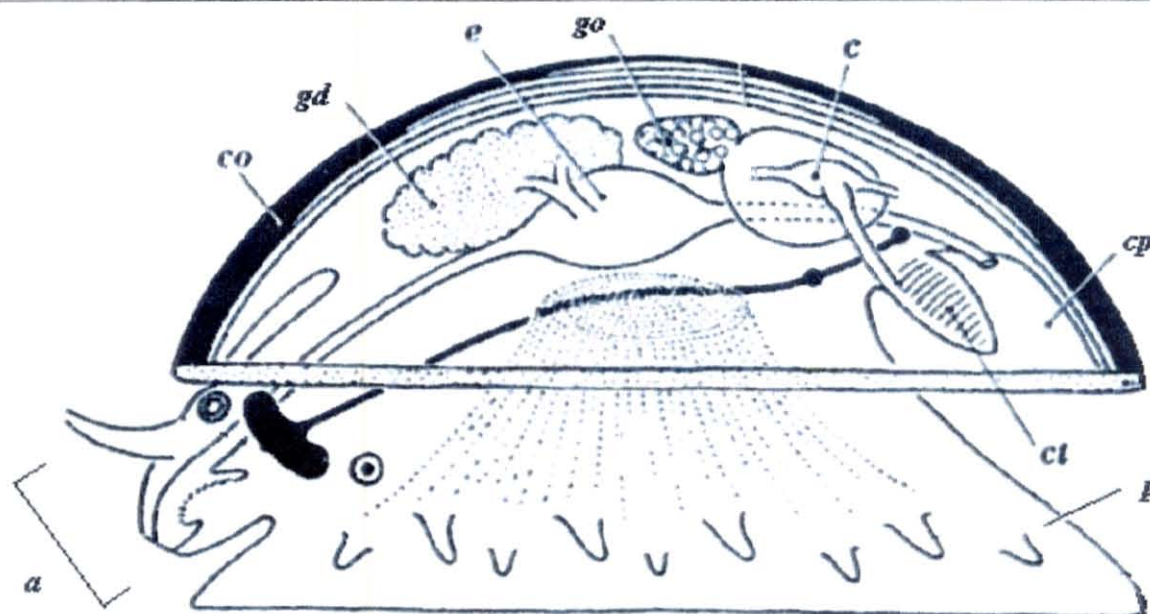


figure 1-2: Diagramme-type d'un mollusque (D'après Grasset, 1961): a, partie antérieure; c, cœur; go, gonade; e, estomac; gd, glande digestive; co, coquille; cp, cavité palléale postérieure; ct, cténidie; p, pied. c, go, e et gd constituent le sac viscéral.

Leur mobilité très réduite peut chez certaines espèces se faire par la contraction de ces deux muscles et l'étirement du ligament. Le système nerveux, décentralisé au maximum, fait de ce groupe un groupe d'acéphales.

Crassostrea gigas est une espèce de grande taille par rapport aux autres espèces du même genre, qui peut atteindre 30 cm de longueur au stade adulte (figure 1-3). La forme de la coquille est en général très irrégulière et dépend fortement du substrat sur lequel l'animal a grandi ainsi que la densité. La surface externe peut être lisse ou plus ou moins crénelée. La valve droite (supérieure) est plus plate et plus petite que la valve gauche (inférieure) (Quayle, 1988).

6. Cycle de vie

6.1 Reproduction

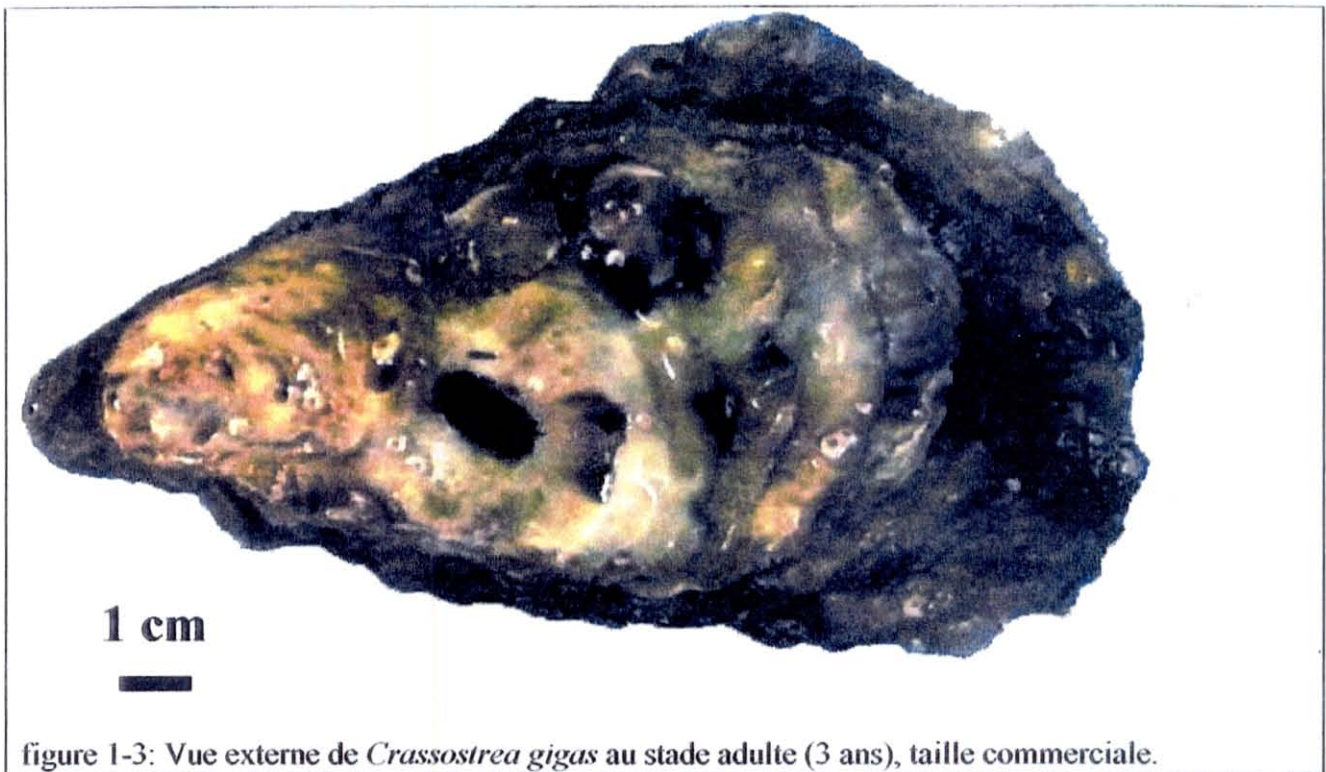
Les bivalves n'ont pas de chromosomes sexuels et possèdent potentiellement les deux sexes. Cette particularité se traduit par un hermaphrodisme juvénile s'orientant parfois vers un gonochorisme (animaux à sexes séparés). Les huîtres adultes présentent une reproduction sexuée, les géniteurs produisent des gamètes mâles ou femelles. L'huître creuse *Crassostrea gigas* est ovipare et présente un hermaphrodisme asynchrone, correspondant à des maturations déphasées des lignées mâle et femelle, et une sexualité alternative (gonochorisme apparent masquant un hermaphrodisme alternatif) entraînant un possible changement de sexe chaque année.

Le milieu (température et nutrition), mais aussi des facteurs hormonaux internes, semblent contrôler le déterminisme du changement de sexe (voir Guo *et al.*, 1997).

La maturation et plus précisément la gamétogénèse apparaît au printemps. Lorsque les gamètes sont matures, les géniteurs les expulsent dans l'eau de mer environnante ("ponte"), la fécondation étant externe. Le nombre d'ovocytes et de spermatozoïdes produits chez les huîtres creuses dépend de la taille des géniteurs et des conditions trophiques (quantité et qualité du phytoplancton disponible). Il varie de 20 à 100 millions (Marteil, 1976) pour les gamètes femelles et de l'ordre du milliard pour les gamètes mâles. La mortalité naturelle est considérable et on estime à 0,1 % le taux de survie à 2 mois. Pour 1 million d'ovocytes libérés dans le milieu par la femelle, moins de 1 000 descendants atteindront l'âge de 2 mois.

6.2 Développement

Le développement embryonnaire précoce est très bien étudié chez cette espèce dans le cadre des recherches en cytogénétique (Gérard *et al.*, 1994). La première division de l'œuf a lieu 45 minutes après la fécondation.



Les divisions successives sont rapides et aboutissent à la formation d'un embryon de type morula (16 cellules, figure 1-4 photos 7 et 8). Cet embryon entre dans une phase de développement pour former une larve trochophore libre mais incapable de se nourrir (Verdonk et van den Biggelaar, 1983; Strathmann, 1987a). En 24 heures, le stade trochophore se termine avec le développement de l'organe de nutrition et de locomotion (le velum, larve de 13 jours, figure 1-4 photo 11), de la glande coquillière et de la première coquille larvaire (Prodissochonche I, Raven, 1966; Le Pennec, 1978). Cette transformation aboutit à la formation de la larve véligère, libre et capable de se nourrir (Strathmann, 1987b). Sa croissance est lente, 4 à 5 μm par jour à 23 °C (Le Pennec, 1978). La larve a alors une forme de D avec la charnière rectiligne et la coquille arrondie, c'est le stade couramment appelé "larve D" de taille avoisinant 70 μm (figure 1-4 photo 9). A ce stade, se forme la seconde coquille larvaire (Prodissochonche II, Le Pennec, 1978). Le stade véligère peut durer quelques semaines mais, selon les conditions environnementales, il peut être prolongé (Pechenik, 1987). Dix jours après fécondation, lorsque la taille est de l'ordre de 100 μm ,

la coquille (l'umbo, figure 1-4 photo 10). L'organe sensoriel principal apparaît, pigmenté, donnant à ce stade le nom de larve oeuillée (figure 1-4 photo 12).

Lorsque la larve atteint environ 300 à 350 μm , en moyenne au 20^{ème} jour de la vie larvaire, son comportement est modifié. Celle-ci étend son pied à la recherche d'un substrat donnant à ce stade le nom de larve pédivéligère (figure 1-4 photo 12, pied visible). Ce comportement particulier (décrit chez *Argopecten purpuratus* par Tapia *et al.*, 1993) annonce la fixation de la larve sur un substrat solide, puis la métamorphose.

La métamorphose à la fin du stade véligère comprend des changements morphologiques incluant la perte du velum et la formation du système d'alimentation adulte (branchies et palpes labiaux). Cette seconde transformation aboutit au stade juvénile avec un mode de vie benthique qui persistera le reste de la vie de l'animal (Bayne, 1983; figure 1-4 photo 13 et 14).

Le stade larvaire permet une dissémination de l'espèce importante. La distance de dispersion dépend de la vitesse et de la direction des courants d'eau transportant les larves et également de la durée de vie larvaire. Cette durée, chez la plupart des espèces de bivalves, n'est pas fixée à l'avance (Pechenik, 1990) et de nombreuses études montrent que les larves peuvent retarder leur métamorphose (Crisp, 1974; Scheltema, 1974; Pechenik, 1990 (tableau 1)). Toutefois, la métamorphose ne peut pas être indéfiniment retardée, il a été démontré qu'en laboratoire celle-ci apparaît de façon spontanée après un temps critique, variable selon les espèces, déterminé par une horloge interne (Chia, 1978; Pechenik, 1980; 1984a).

L'impact de la vie larvaire sur la vie juvénile et adulte est une question qui s'est posée à maintes reprises dans les écloséries où les sens pratique et économique poussent à éliminer les larves de petite taille pour ne conserver que les gros individus (Losee 1979; Malinowski, 1988; Hilbish *et al.*, 1993).

7. *Elevage*

Bien que le cycle complet de l'huître creuse soit maîtrisé en éclosérie, la grande majorité de la production ostréicole repose principalement sur le captage de larves dans le milieu naturel. La première phase essentielle pour l'élevage, le **captage**, consiste à offrir aux larves des supports (**collecteurs**) pour assurer leur fixation. Pendant la période de reproduction des huîtres, les collecteurs sont disposés dans le milieu naturel dans des zones réputées propices au captage des larves de *Crassostrea gigas*. Les principaux sites de captage en France sont le bassin d'Arcachon et le bassin de Marennes-Oléron.

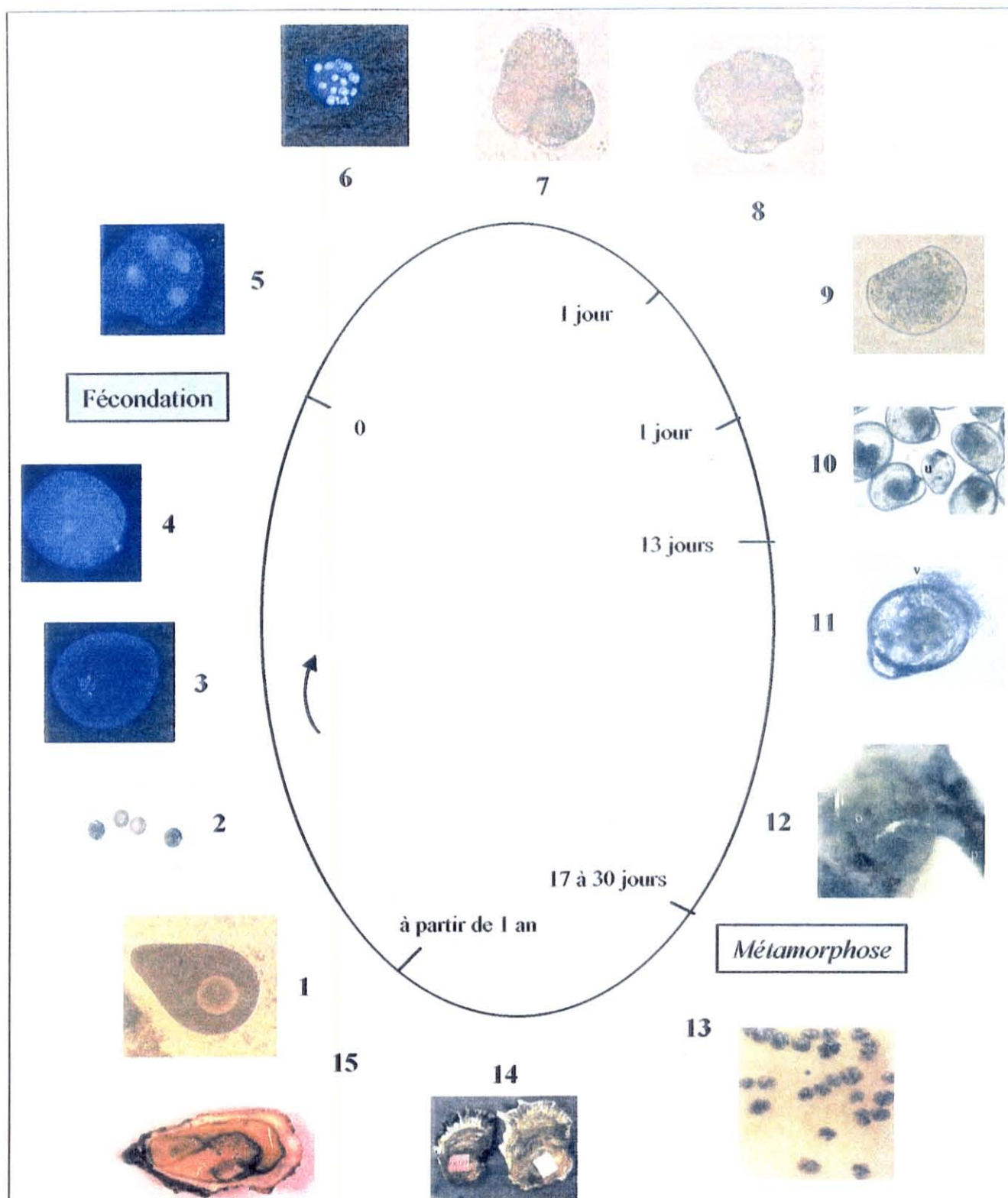


figure 1-4: Cycle de développement de *Crassostrea gigas* à 23 °C. 1. Ovocyte en cours de maturation, 2, 3 et 4 Ovocyte mature, 5. Embryon stade 4 cellules, 6. Embryon stade 16 cellules, 7 et 8 Embryon stade Morula, 9. Larve stade D, 10 et 11 Larve de 13 jours (u: umbo, v: velum), 12. Larve stade pédivéligrè (p: pied, o: organe sensoriel), 13. Post-larves fixées sur plaque PVC, 14. Juvéniles (environ 6 mois), 15. Géniteur mature. (photos IFREMER LGP)

L'IFREMER effectue des prélèvements réguliers pour détecter la présence de larves prêtes à se fixer et informe les ostréiculteurs de la période optimale pour la pose des collecteurs. Les collecteurs utilisés sont des lames, tubes ou cadres en plastiques, des tuiles chaulées, des ardoises entrecroisées (pieux), ardoises enfilées dans une tige de fer (cartelettes) ou tout simplement des anciennes coquilles d'huîtres creuses ou de coquilles St Jacques enfilées dans une tige de fer. Des phénomènes de mortalité associés au virus de type *herpesviridae* (Renault *et al.*, 1994) sont apparus dans le milieu naturel et dans les écloséries. Ce problème pathologique a récemment freiné les productions de naissain en éclosérie. Trois à 4 mois après le captage si la croissance est rapide ou 8 à 10 mois si elle est lente, les collecteurs sont dédoublés pour éviter l'entassement entraînant une croissance anarchique et l'impossibilité de séparer les individus sans dommage. Le naissain reste en croissance sur les collecteurs 3 à 9 mois jusqu'à atteindre une longueur de 2 à 4 cm. Le naissain est ensuite désolidarisé des collecteurs (opération de détroquage), manuellement, à l'aide d'une lame métallique ou à la machine puis stocké dans des poches en plastique de maille adéquate. Dans la région de Marennes-Oléron, ces poches sont surélevées sur des tables ostréicoles, concédées aux ostréiculteurs (parcs, concessions). Régulièrement les poches sont retournées pour enlever le limon, les prédateurs et les compétiteurs (étoiles de mer, moules, crépidules ...).

Le travail d'entretien en ostréiculture repose sur le tri des animaux à toutes les étapes du développement. Dans les écloséries, les larves et le jeune naissain sont tamisés et les individus les plus petits sont régulièrement éliminés. Par la suite, les juvéniles et adultes sont également triés. La calibration finale avant commercialisation permet de proposer plusieurs produits de taille, prix et qualité différents sur le marché. Une classification par taille a été adoptée et le prix de vente varie selon ces catégories. Ces opérations de tri permettent d'éliminer les animaux moribonds pouvant gêner la croissance des individus performants. Au stade larvaire, le tamisage permet également de réduire la période de fixation: les grosses larves sont plus fréquemment compétentes pour la fixation que les petites larves.

L'intensification de l'ostréiculture dans le bassin de Marennes-Oléron, pousse les professionnels à transférer les stocks d'huîtres vers des sites de grossissement plus favorables situés en Normandie ou en Bretagne. Un passage final en claire d'un mois, permet de commercialiser les huîtres sous le label "Fines de Claires" (label rouge) ou "Spéciales de Claires", spécifique à la région de Marennes. Les huîtres stockées dans ces claires se chargent en glycogène, engraisent et éventuellement verdissent, donnant une qualité de chair spécifique. Cette qualité est due à la présence d'une microalgue présente presque exclusivement dans le bassin de Marennes-Oléron, la navicule bleue *Navicula ostrearia*.

8. *Un grand nombre de questions sans réponses*

La grande majorité des pratiques ostréicoles ont été acquises par l'expérience. L'huître creuse est une espèce non domestiquée dont la production repose sur une phase de pêche: le captage du naissain. Le cycle de vie de l'espèce est parfaitement maîtrisé dans les écloséries, mais ces dernières ne fournissent le naissain qu'à un très faible nombre d'ostréiculteurs en France. Néanmoins, cette production est cruciale dans les pays où l'espèce ne se reproduit pas naturellement (exemple de la côte ouest des USA) et est une étape indispensable dans les programmes de sélection, pour la génération et la dissémination du progrès génétique (exemple des huîtres triploïdes).

Le contrôle de la maturation des géniteurs et de la fécondations in vitro sont des pratiques courantes dans les écloséries expérimentales et commerciales. Dans la pratique, la reproduction de *Crassostrea gigas* dans les écloséries privées se fait par mélange des produits génitaux d'un certain nombre de géniteurs obtenus soit à l'issue de ponte naturelle soit artificiellement par scarification des gonades. La bonne qualité des gamètes est une donnée cruciale pour cette étape du cycle qui conditionne le développement embryonnaire et la mortalité précoce. L'état des animaux utilisés comme parents se répercute en général sur l'état des gamètes et sur les performances de la descendance. La difficulté est d'estimer la qualité de la descendance aux stades précoces, pour éviter les effets de milieu qui en général sont très forts et masquent les autres effets. Les progrès de la biologie moléculaire et en particulier la découverte de la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) ont permis la découverte de marqueurs génomiques très polymorphes tels que les microsatellites. Cet outil, désormais disponible au laboratoire (dans le cadre de l'Unité de Recherche Marine, URM 16), a été utilisé sur l'huître plate puis sur l'huître creuse. Il permet de connaître sans ambiguïté les parents d'un descendant au stade larvaire et ainsi de répondre à un certain nombre de questions:

- **Existe-il des phénomènes de compétition entre gamètes ?**
- **Y a-t-il des phénomènes de mortalité différentielle entre les descendants de plusieurs parents ?**
- **La croissance au stade précoce est elle dépendante des parents ?**

Des contraintes zootechniques poussent les écloseurs à pratiquer des tamisages successifs aux stades larvaires et à éliminer les individus les plus petits. Cette pratique est indispensable dans la gestion des écloséries pour éviter que des individus affaiblis par des problèmes pathologiques ne contaminent l'ensemble des populations larvaires. La conséquence de tels tamisages sur la

croissance après métamorphose reste cependant méconnue. Ainsi, les deux questions auxquelles il est crucial de répondre à l'aide d'arguments scientifiques s'énoncent ainsi:

- **Quelle est la relation entre la croissance larvaire et la croissance post larvaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* ?**
- **Quelles sont les conséquences des tamisages sélectifs pratiqués couramment en éclosion ?**

La plupart des études de croissance et de physiologie chez *Crassostrea gigas* concernent des populations naturelles dans un environnement variable, le plus souvent le milieu naturel. Dans un programme de sélection génétique, qu'il soit basé sur des critères de croissance ou de physiologie, on doit tout d'abord s'assurer de la pertinence des critères de sélection. Dans cette optique, les conditions environnementales doivent être contrôlées pour être les plus homogènes possibles. A notre connaissance, aucune donnée publiée n'évalue la possibilité de sélection basée sur des performances de croissance ou des performances physiologiques chez *Crassostrea gigas* en éclosion. Des questions fondamentales sur ces caractères restent sans réponse: dans quelle mesure les performances de croissance mesurées en milieu contrôlé sont-elles constantes dans le temps ? En d'autres termes, un animal performant pour la croissance à un moment de son cycle de vie reste-t-il performant toute sa vie ? Dans quelle mesure les conditions environnementales d'un élevage perturbent-elles les performances de croissance ?

Les mêmes types de question se posent à propos des performances physiologiques. La prise de nourriture et les dépenses énergétiques conditionnent en théorie le gain de poids d'un animal. Cependant, la confrontation des données observées et des données attendues montre souvent de fortes différences pas toujours faciles à interpréter. La question de la stabilité des paramètres bioénergétiques de base (consommation, ingestion, absorption, consommation d'oxygène ...) n'a jamais été abordée auparavant. Il est néanmoins fondamental de s'assurer de la stabilité dans le temps d'un caractère avant de l'utiliser comme critère de sélection.

9. Présentation de l'étude

La relation entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance et leurs bases génétiques est toujours sujette à de nombreuses interrogations chez les mollusques bivalves. La plupart des indications disponibles à l'heure actuelle concernent la relation entre la croissance d'un individu et l'hétérozygotie du génome révélée par des marqueurs enzymatiques ou la fréquence d'accidents chromosomiques. Parallèlement, un lien entre des fonctions métaboliques de base (turn-over des protéines, respiration, rendement d'assimilation) et l'hétérozygotie du génome a été mis en

évidence (Garton *et al.*, 1984; Jorgensen, 1992; Hawkins et Day, 1997). Des travaux sur la physiologie des bivalves ont montré que les besoins en énergie associés à une croissance plus forte sont dus à la fois à un plus faible métabolisme de base, et à des coûts énergétiques pour la croissance moins élevés.

L'ensemble de ces résultats montre que les différences de croissance observées ont une base métabolique et génétique, il souligne l'intérêt d'une approche conjointe de la physiologie et de la génétique de la croissance chez les bivalves.

La gestion des zones de production restant une priorité (Héral, 1994) en particulier dans la région de Marennes Oléron, l'amélioration que l'on peut attendre d'une sélection génétique pour un rendement physiologique plus élevé permettrait une meilleure valorisation des ressources existantes. En effet, la production ostréicole dans le bassin de Marennes-Oléron souffre d'une forte intensification avec comme conséquence un appauvrissement des ressources trophiques disponibles pour la croissance des cheptels d'huîtres. Sélectionner des animaux qui prélèvent moins de nourriture du milieu et qui assurent néanmoins une croissance honorable peut résoudre ce type de problème.

Une telle stratégie de sélection nécessite un travail préalable de connaissance des bases génétiques des caractères physiologiques concernés. Ce travail concernera l'huître creuse *Crassostrea gigas*, principale espèce d'huître d'intérêt commercial en Europe (Héral, 1993). A l'heure actuelle, aucune gestion génétique des stocks ni aucun programme de sélection ne sont menés, malgré l'importance économique de cette espèce.

Ce travail s'inscrit en grande partie dans le programme européen FAIR PL 95421 "GENEPHYS" visant à établir les liens entre les performances physiologiques, génétiques et de croissance chez *Crassostrea gigas*. La majeure partie des expériences a été faite sur la même population d'huîtres de même âge obtenue en laboratoire. A partir de l'analyse de la croissance à différentes étapes du cycle de vie de l'animal, nous essayerons d'apporter des éléments de réponse quant au déterminisme de la croissance chez *Crassostrea gigas*.

L'exposé des résultats de cette thèse s'articuleront en 3 parties:

1. Croissance (partie II):

Cette partie repose en premier lieu sur la construction d'une population en éclosionerie qui sera la base biologique de cette étude. La corrélation entre la croissance larvaire et la croissance du naissain sera étudiée grâce à une procédure expérimentale faisant appel aux techniques courantes d'éclosionerie (chapitre 1). On pourra ainsi savoir si la croissance avant la métamorphose influence la

croissance des stades post-métamorphiques et quelles sont les conséquences des pratiques courantes d'écloseries (tamisage des larves).

La croissance de la même population sera suivie à des stades différents dans un milieu où la nourriture disponible est *ad libitum* (écloserie de La Tremblade). La relation entre croissance à 3 mois et croissance à 10 mois sera évaluée ainsi que l'impact de la mortalité sur les performances de croissance (chapitre 2). Les réponses que l'on attend de ce type d'analyse sont importantes étant donné les pratiques ostréicoles basées sur le tri des individus avec le plus souvent l'élimination des "queues de lot".

Dans la région de Marennes-Oléron les huîtres sont le plus souvent stockées dans des poches au sein desquelles existent des phénomènes de compétition pour l'espace et la nourriture. L'intensité de ces compétitions augmente avec la densité. Dans un milieu où la nourriture disponible peut être volontairement réduite (nursérie de Bouin), l'impact de la densité sur les performances de croissance sera étudié au travers d'un suivi individuel. La stabilité dans le temps des performances de croissance sera évaluée dans un milieu naturel riche en phytoplancton, l'étang de Thau (chapitre 3).

2.: Physiologie (partie III)

La relation entre les performances physiologiques et la croissance sera étudiée dans un milieu volontairement limité en phytoplancton, reproduisant les conditions de forte biomasse existant dans le Bassin de Marennes Oléron. Les paramètres physiologiques impliqués dans la croissance seront mesurés: l'acquisition (absorption) et les dépenses (consommation d'oxygène) de l'énergie. Peu de données publiées à ce jour concernent les performances physiologiques d'une population d'écloserie et leur relation avec la croissance.

La stabilité des fonctions physiologiques sera évaluée en milieu *ad libitum* à l'aide d'un dispositif de mesure en continu de la filtration et de la consommation d'oxygène. En effet, si de nombreuses études concernent les performances physiologiques mesurées à un moment donné, aucune indication de la stabilité dans le temps n'existe dans la littérature et en particulier par des mesures répétées sur les mêmes individus. La synthèse de ces données permettra d'établir un indice de sélection pour les performances physiologiques. La pertinence d'un tel indice de sélection sera discutée.

3. Génétique et croissance: apport des marqueurs microsatellites (partie IV)

Le développement de marqueurs moléculaires hypervariables tels que les microsatellites permet de retrouver aisément les parents d'un individu même aux stades larvaires précoces. Un croisement du même type que le croisement de la population de référence a ainsi été effectué pour étudier la contribution réelle de chaque parent à la descendance et son impact sur la croissance. Dans un contexte où seul 0,1 % des ovocytes atteignent le stade post larvaire, en éclosion, il est très important de savoir la réelle valeur d'un géniteur. L'accès à la contribution parentale permet d'avoir une idée de la fécondité et de la valeur sélective d'un individu par le nombre de ses descendants dans la génération suivante. La comparaison de ces contributions dans 2 types de croisements contrôlés permettra ainsi de mettre en évidence des éventuels effets de compétition gamétique.

DEUXIEME PARTIE

Etude de la croissance

Introduction

1. *La croissance des bivalves*

Chez une grande majorité de bivalves, la vitesse de croissance varie très largement entre des individus de même âge et élevés dans des conditions environnementales similaires. Singh et Zouros (1978) ont observé des coefficients de variation de 59 % et des différences dans le poids total allant jusqu'à un facteur 12 dans un groupe d'huîtres (*Crassostrea virginica*) de 1 an collectées au stade naissain et élevées dans des cages suspendues. Des études en laboratoire montrent qu'une part substantielle de cette variation serait d'origine génétique (voir revues de Newkirk, 1980; 1983; tableau 1) avec des estimations d'héritabilité élevées. Cette base génétique a été exploitée dans des programmes de sélection où la vitesse de croissance a été améliorée avec succès chez de nombreuses espèces (*Crassostrea virginica*: Paynter et Dimichele, 1990; *Ostrea edulis*: Newkirk et Haley, 1983; *Saccostrea commercialis*: Smith *et al.*, 1995). D'autre part, il existe une relation entre hétérozygotie aux locus enzymatiques et croissance chez les bivalves, documentée chez de nombreuses espèces (voir introduction partie IV). L'aneuploïdie peut également être une cause de la très forte variabilité pour la croissance dans les populations issues d'écloserie et naturelles (Thiriot-Quiévreux, 1986; Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1992; Zouros *et al.*, 1996). En effet, une relation négative très forte a été démontrée chez *Crassostrea gigas* parmi les descendants du même âge d'une famille de plein-frères entre le nombre de chromosomes manquants et la longueur de la coquille (Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988).

La densité d'élevage des populations est un facteur affectant fortement la croissance de nombreuses espèces animales (Adams *et al.*, 1994; Rheault *et al.*, 1996). Crenshaw *et al.* (1996) ont estimé des héritabilités pour la croissance chez *Mercenaria mercenaria* dans deux conditions de densité (faible: moins de 90 individus/m² et forte: plus de 350 individus/m²). Ils obtenaient une héritabilité positive en condition de faible densité et négative en condition de forte densité, suggérant que l'ensemble des gènes qui déterminent une croissance rapide sous certaines conditions peut avoir un effet négatif sous d'autres conditions. Ce résultat illustre le phénomène d'interaction forte entre le génotype et le milieu environnemental. Des modèles issus des études d'écologie ont été proposés pour décrire dans le milieu naturel la relation entre la croissance et la densité d'élevage chez les mollusques (Fréchette et Lefavre 1990; 1995). La variabilité spatiale au sein d'un bac d'élevage peut également influencer sur les taux de croissance des individus. L'effet de la position dans une structure d'élevage a été observé chez *Saccostrea commercialis* (Sheridan *et al.*, 1996). L'efficacité d'une nurserie est affectée par la densité pratiquée dans les élevages: la vitesse de croissance diminue par individu mais

la production globale augmente (Neudecker, 1981) et il est donc possible d'estimer la densité optimale pour la rentabilité de l'exploitation (Holliday *et al.*, 1991). Les études sur les effets de la densité de stockage sur la croissance des bivalves cultivés confirme l'importance de la compétition intra spécifique pour la nourriture, au niveau du bac d'élevage lui-même (Holliday *et al.*, 1991; Côté *et al.*, 1996). Il est cependant étonnant que la diminution de vitesse de croissance avec des fortes densités d'élevage soit l'un des effet environnementaux les moins documentés en laboratoire. Dans le milieu naturel, la limitation de nourriture est le principal facteur qui affecte la croissance: eaux oligotrophes (Peterson et Black, 1993), compétition trophique (Brock, 1980; Peterson, 1982; Beukema et Cadée, 1986; Jensen, 1992, 1993; Kamermans, 1993; De Montaudouin et Bachelet, 1996), surexploitation (Héral *et al.*, 1995) ou prolifération des macroalgues (Hull, 1987; Everett, 1994) sont des causes fréquentes de diminution de la ressource de nourriture disponible. Cependant, les conditions de culture des bivalves en nurserie et dans le milieu naturel sont très différentes. Les stocks utilisés dans les programmes de sélection, maintenus parfois depuis de nombreuses générations en éclosérie, peuvent se révéler très peu performants lorsqu'ils sont transférés dans le milieu naturel (Wilkins, 1981; Newkirk, 1983).

La relation entre les performances de croissance à divers stades est plus étudiée. En effet, les applications dans les programmes d'amélioration génétique sont multiples et en particulier la possibilité de sélectionner les individus à forte croissance le plus tôt possible dans le cycle de vie. Newkirk *et al.* (1977a) ont montré que le taux de croissance larvaire est corrélé positivement avec le taux de croissance de naissain âgé de 9 mois chez *Crassostrea virginica*. Losee (1979) montre également chez *C. virginica* que les larves fixées le plus tôt donnent du naissain qui croît plus rapidement à 7 mois. Haley et Newkirk (1978) ont également estimé des corrélations fortes entre les poids totaux de *C. virginica* mesurés à divers stades (entre 2 et 5 ans). Cependant, Newkirk et Haley (1982a) ont montré chez *Ostrea edulis* que la relation entre la durée de la vie larvaire et la taille après plus de 3 ans de croissance est négative ou non significative. Newkirk (1981) arrive à une conclusion similaire: la croissance juvénile à 5 mois est un mauvais prédicteur de la croissance à des stades ultérieurs (29 et 41 mois) chez *O. edulis*. Toro et Newkirk (1990a) ont observé des corrélations génétiques importantes entre le début et la fin de la saison de croissance chez *O. edulis*. Chez *Ostrea chilensis*, Toro et Newkirk (1990b) observent également des corrélations très fortes entre les poids ou les longueurs individuelles entre 14, 22, 26 et 33 mois. En définitive, la littérature montre que la relation entre la croissance aux différents stades de la vie d'un bivalve est ambiguë et qu'elle dépend très probablement des conditions

expérimentales.

tableau 1: Revue des études sur l'héritabilité pour la croissance chez les Crassostreidae et Ostreidae (*Cg* = *Crassostrea gigas*, *Oe* = *Ostrea edulis*, *Oc* = *Ostrea chilensis*, *Sco* = *Saccostrea commercialis*, *Scu* = *Saccostrea cucullata*).

Auteur(s)	Espèce	Méthode	Résultats
Beattie <i>et al.</i> , 1980	<i>Cg</i>	13 familles de pleins-frères 1 génération	Amélioration de la résistance à la mortalité estivale
Lannan, 1972	<i>Cg</i>	11 familles de pleins-frères 1 génération	Héritabilité pour 14 caractères liés à la croissance (poids total à 18 mois, $h^2 = 0,37 \pm 0,2$)
Toro et Newkirk, 1991	<i>Oc</i>	Sélection massale 1 génération	Héritabilité réalisée pour le poids total et la longueur de la coquille ($h^2 = 0,34 \pm 0,12$)
Toro et Newkirk, 1990a	<i>Oe</i>	Sélection massale 1 génération	Héritabilité réalisée (poids total à 18 mois, $h^2 = 0,19 \pm 0,07$)
Toro, 1990	<i>Oe</i>	40 familles de pleins-frères 1 génération	Héritabilité pour poids total et longueur de coquille (poids total à 2 ans, $h^2 = 0,11$ et longueur à 2 ans, $h^2 = 0,24$)
Newkirk et Haley, 1982b, 1983	<i>Oe</i>	Sélection massale 2 générations	Faible réponse à la sélection dans la seconde génération due à une variabilité insuffisante
Toro <i>et al.</i> , 1995	<i>Oc</i>	Sélection massale 1 génération	Héritabilité réalisée (poids total à 27 mois, $h^2 = 0,43 \pm 0,18$)
Sheridan <i>et al.</i> , 1996	<i>Sco</i>	Sélection massale 2 générations	Amélioration dans les méthodes de testage (mesure de la variabilité environnementale)
Nell <i>et al.</i> , 1999	<i>Sco</i>	Sélection massale	Amélioration de 17,8 % du poids total à 18 mois
Jarayabhand et Thavornvutikarn, 1995	<i>Scu</i>	Sélection massale 1 génération	Héritabilité réalisée (vitesse de croissance, $h^2 = 0,28 \pm 0,006$)

2. Méthodes d'étude de la croissance

L'une des caractéristiques essentielle des êtres vivants est d'assurer leur propre croissance en transformant en biomasse les éléments nutritifs puisés dans le milieu environnant. La croissance d'un organisme s'effectue d'une part par l'augmentation du nombre de cellules et d'autre part par la croissance de ces cellules. Les données expérimentales pour caractériser la croissance d'un organisme sont globales et portent sur la taille ou la masse corporelle. Ces données sont longitudinales et se présentent sous forme de n couples associant la mesure Y_i au temps X_i (i variant de 1 à n) pour un individu donné. Pour les bivalves, le temps peut être la durée depuis la fécondation ou depuis la fixation selon le type de croissance que l'on étudie, i.e. larvaire ou naissain. La croissance est une donnée qui est étudiée dans tous les modèles animaux ou végétaux exploités ou non. La variable étudiée peut être une longueur (longueur totale d'un poisson, hauteur d'une plante ...etc), un poids, une surface ou même un volume. Cependant, le poids total est la variable la plus fiable pour décrire la croissance d'une huître. En effet, la grande variabilité de forme de la coquille rend la longueur peu représentative de la croissance excepté lorsque les individus grandissent sur des collecteurs plans. La mesure répétée dans le temps de cette variable chez un individu permet d'obtenir une courbe individuelle de croissance. La difficulté du point de vue statistique est que la même mesure s'effectue sur un même individu de manière répétée dans le temps et que par conséquent les mesures sont liées entre elles.

Plusieurs modèles mathématiques s'ajustent particulièrement bien aux courbes individuelles de croissance. Les modèles les plus couramment utilisés pour décrire les courbes de croissance sont catalogués au tableau 2.

tableau 2: Exemple de modèles couramment utilisés pour modéliser la croissance (d'après Pavé, 1994).

Modèle	Expression mathématique
exponentiel	$M\{\theta\}: Y_i = a \cdot e^{b \cdot X_i} + \varepsilon_i$
de Weibull	$M\{\theta\}: Y_i = a \cdot \left[1 - e^{-b \cdot X_i^c} \right] + \varepsilon_i$
de Gompertz	$M\{\theta\}: Y_i = a \cdot \left[e^{-\left(e^{-b \cdot (X_i - c)} \right)} \right] + \varepsilon_i$
de Chapman-Richards	$M\{\theta\}: Y_i = a \cdot \left(1 - \left(1 - \frac{Y_0}{a} \right)^{1-m} \cdot e^{(-r \cdot X_i)} \right)^{\frac{1}{1-m}} + \varepsilon_i$
logistique	$M\{\theta\}: Y_i = \frac{a}{1 + \frac{a-b}{b} \cdot e^{-c \cdot X_i}} + \varepsilon_i$

Le modèle de Chapman-Richards a été utilisé récemment pour comparer la croissance de populations d'*Ostrea edulis* sélectionnées pour la résistance au parasite *Bonamia ostreae* à des populations témoins (Baud *et al.*, 1997). Plusieurs algorithmes de calcul permettent de trouver les paramètres à partir des données expérimentales. La procédure SAS Proc NLIN, dispose de différentes méthodes pour approcher les solutions optimales s'ajustant le mieux aux données. La modélisation ou le choix d'un modèle $M\{\theta\}$ pour décrire la courbe de croissance permet de remplacer de manière implicite les n couples de coordonnées $[X_i, Y_i]$ par les paramètres θ . Ainsi pour comparer des populations entre elles, il suffit de comparer les paramètres spécifiques de ces populations. Les paramètres peuvent ainsi être analysés par analyse de variance (Tomassone *et al.*, 1993).

Une autre méthode d'étude permet de s'affranchir de la forme de la courbe de croissance et de construire un modèle décrivant les données brutes (poid total ou longueur). Le modèle est de type linéaire classique (effets fixes, effets aléatoires ou mixtes) mais prend en compte la corrélation des erreurs entre 2 points de mesure. Un modèle d'analyse particulièrement bien adapté aux données de croissance est le modèle mixte (procédure SAS PROC MIXED) permettant de prendre en compte des facteurs à effet aléatoire et des facteurs à effet fixe dans un modèle expliquant une variable de croissance. Selon le type d'expérience et selon le but de l'analyse, un effet peut être considéré comme fixe ou comme aléatoire.

Dans les chapitres qui suivent, nous aurons recours à l'analyse de courbes individuelles de croissance. La modélisation de ces courbes de croissance sera faite de la manière la plus

simple possible, en utilisant un modèle linéaire. En effet, ce type de modèle permet de décrire la performance de croissance par la vitesse de croissance (g par jour), plus simple à interpréter biologiquement qu'un paramètre d'un modèle exponentiel ou non linéaire. Ce type de modélisation est faisable car les études portent chacune sur une portion de la courbe de croissance qui s'ajuste parfaitement à un modèle de type linéaire. Dans le chapitre 1, les performances de croissance larvaire et du naissain seront estimées par la vitesse de croissance. Dans le chapitre 2, la modélisation sera faite sur des portions linéaires de la courbe de croissance. Dans le chapitre 3, l'expérience montrera que la croissance reste rigoureusement linéaire sur toute la période du suivi.

CHAPITRE 1

Production d'une population à large base génétique et étude de la relation entre croissance pré et post larvaire chez *Crassostrea gigas*

1. Introduction

L'influence des facteurs environnementaux sur la croissance larvaire et juvénile (Kirby-Smith, 1972; McDonald et Thompson, 1985; Pechenik, 1987; Brown, 1988; Rice et Pechenik, 1992) a été étudiée chez de nombreuses espèces de mollusques marins. Les vitesses de croissance larvaires et juvéniles pour des conditions environnementales données varient énormément entre les individus. Ces variations sont héréditaires avant et après la métamorphose (Innes et Haley, 1977; Newkirk 1978; Newkirk *et al.*, 1981; Mallet *et al.*, 1986; Strömngren et Nielsen 1989; Hadley *et al.*, 1991; Hilbish *et al.*, 1993). Au stade adulte, même en milieu contrôlé, une forte variabilité est observée chez des individus de même âge (Fujio *et al.*, 1979 chez *Crassostrea gigas*). Pour expliquer cette très forte dispersion, il est nécessaire d'avoir à disposition une population à forte variabilité pour le caractère que l'on étudie. Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la fécondation externe, la forte fécondité et la maîtrise de la reproduction en milieu expérimental contrôlé (maturation forcée, récupération des gamètes par scarification) permettent de faire des croisements contrôlés. Il est en outre facile de conserver le maximum de variabilité pour la taille dès le début de la vie larvaire en agissant sur la densité d'élevage et la quantité de nourriture. Comme chez de nombreuses espèces d'invertébrés marins, le cycle de vie de l'huître creuse comprend une phase de métamorphose impliquant la transformation d'une forme pélagique libre (phase larvaire) en une forme benthique relativement sédentaire (phases juvéniles et adultes). D'importantes modifications physiologiques apparaissent pendant la métamorphose (Baker et Mann, 1994) caractérisant la croissance larvaire par rapport à la croissance juvénile et laissant supposer la mise en jeu de mécanismes distincts. Chez l'huître, comme chez la plupart des bivalves marins, la métamorphose apparaît juste après la fixation de la larve sur un substrat solide. Dans le but d'étudier les conséquences de la métamorphose sur la croissance post larvaire, des expériences entreprises chez certaines espèces de mollusques consistent à modifier artificiellement par des procédés chimiques ou physiques la durée de la vie larvaire. Ces travaux ont montré que retarder la métamorphose affecte la croissance après métamorphose chez *Balanus amphitrite* (Pechenik *et al.*, 1993) mais pas chez *Crepidula plana* (Pechenik *et al.*, 1996). D'autres études ont été effectuées dans le but de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre les croissances larvaire et post larvaire. Les résultats publiés à ce jour restent contradictoires (voir introduction). Une relation positive entre croissance larvaire et croissance post larvaire a été trouvée chez *Crassostrea virginica* (Newkirk *et al.*, 1977; Losee, 1979) alors que Newkirk et Haley, 1982a ont conclu à l'absence de corrélation entre la durée de la vie larvaire (et taille larvaire) et la taille des juvéniles ou des adultes chez l'huître européenne *Ostrea edulis*. De plus, Hilbish *et al.* (1993) n'ont pas trouvé de corrélation génétique

significative entre la croissance des larves de 10 jours et des juvéniles de 9 mois chez *Mercenaria mercenaria*. Heffernan *et al.* (1991) ont montré que sélectionner des adultes pour une forte croissance chez *Mercenaria mercenaria* entraîne la production de larves à plus faible croissance.

L'intérêt pratique en aquaculture de l'étude du couplage entre vitesse de croissance larvaire et juvénile est évident, en particulier dans les schémas de sélection génétique (Ebenman, 1992; Stearns, 1992; Hilbish *et al.*, 1993). De plus, dans les écloseries de bivalves, la pratique courante est l'élimination des larves les plus petites par tamisage dans le but de réduire le temps d'élevage larvaire, la variabilité en taille (Bardach *et al.*, 1972) et donc le coût. Toutefois, l'effet d'un tel tamisage sur la croissance après métamorphose est toujours méconnue, la relation entre croissance larvaire et croissance juvénile restant ambiguë.

Dans cette étude, des géniteurs ont été échantillonnés dans le milieu naturel et des croisements contrôlés ont été effectués en laboratoire. Un lot de larves a été ainsi produit dans le but d'obtenir une population expérimentale de référence "hyper variable" pour la croissance. Toutes les étapes de l'élevage depuis le développement embryonnaire jusqu'au grossissement des juvéniles et adultes ont été effectuées en condition non sélective et non limitante pour la quantité de nourriture. Des tamisages successifs ont permis la séparation de groupes caractérisés par des croissances larvaires différentes. Ces larves ont été mises à fixer sur des collecteurs changés quotidiennement. De cette manière, la distribution dans le temps de la fixation a été maximisée et tous les individus fixés à la fois précocement et tardivement ont été conservés. Cette expérience vise d'une part à construire une population expérimentale la plus variable possible pour les performances de croissance et d'autre part à évaluer la corrélation entre la croissance avant métamorphose, et la croissance juste après métamorphose.

2. Matériels et méthodes

2.1. Echantillonnage des géniteurs G0

Des huîtres adultes ont été prélevées dans le milieu naturel en janvier 1996 sur 4 sites: l'estuaire de la Seudre (SEU), le bassin d'Arcachon (ARC), l'estuaire de la Charente (PDB) et la baie de Bonne Anse (BA) (figure 1-1). Les différentes populations ont été obtenues auprès d'ostréiculteurs. Le poids total a été mesuré au dixième de gramme près après égouttage de l'eau résiduelle présente sur la coquille. Les pesées seront toujours effectuées de la même manière.

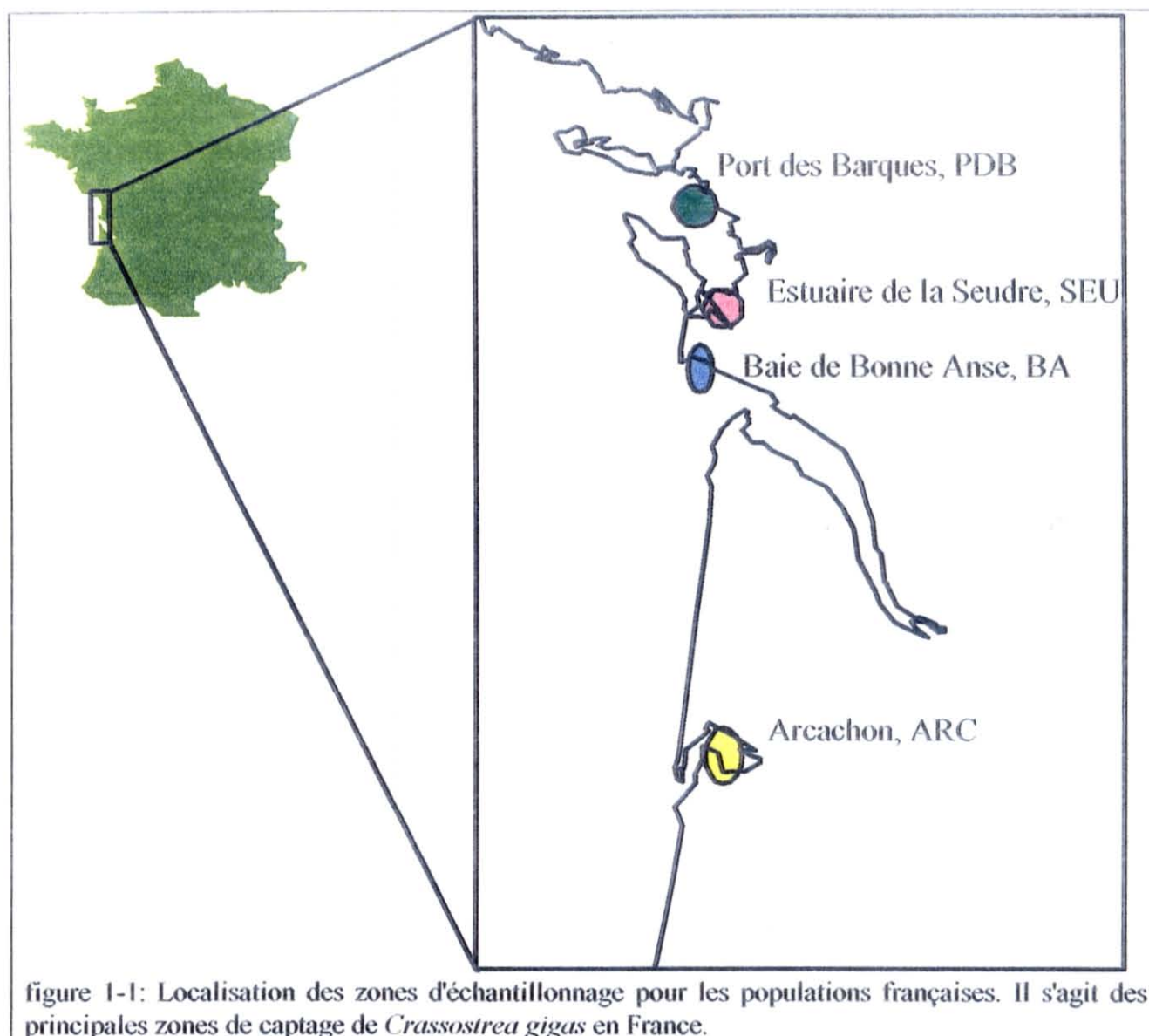


figure 1-1: Localisation des zones d'échantillonnage pour les populations françaises. Il s'agit des principales zones de captage de *Crassostrea gigas* en France.

Ils s'agit de lots d'huîtres creuses n'ayant pas subi de tri trop important comme cela est souvent pratiqué en ostréiculture et présentant une distribution de taille maximale.

Les 4 populations de géniteurs ont été stockées dans les claires du CREMA (L'Houmeau) jusqu'en avril 1996. Afin de réaliser des analyses physiologiques non destructives (février 1996) et pour le tirage au sort des géniteurs, 100 animaux par population ont été individualisés par collage d'une étiquette à la colle Epoxy.

2.2. Croisements

En mars 1996, parmi les 100 animaux par population qui ont été individualisés, 30 ont été tirés au sort. Ces derniers ont été maintenus avec des individus non marqués des mêmes populations (témoins de maturation) dans des raceways alimentés avec de l'eau de mer filtrée de même température que celle du milieu naturel, 12 °C. La température a été augmentée régulièrement de 1

°C par jour pour atteindre 18 °C, température optimale pour la maturation sexuelle chez *Crassostrea gigas* (Andrews, 1979; Alzieu, 1986). Les animaux ont été maintenus à cette température pendant environ 6 semaines. L'état de maturation a été évalué par la vérification régulière de témoins de maturation maintenus dans les mêmes conditions que les géniteurs. Lorsque la maturation a été jugée suffisamment avancée (mi- avril 1996), les huîtres marquées de chaque population ont été ouvertes et sexées par examen microscopique des produits génitaux (Microscope BH2 Olympus). Cinq mâles et cinq femelles par population ont été tirés au hasard et utilisés comme géniteurs. Deux types de croisement ont été effectués le 15 avril 1996 (figure 1-2).

- Un croisement factoriel 20 par 20 avec les géniteurs des quatre origines françaises, chaque mâle et chaque femelle étant croisés entre eux dans toutes les combinaisons possibles (400 couples, 400 croisements). Les embryons issus des 400 croisements ont été regroupés 3 heures après fécondation. Par commodité, les descendants de ce croisement seront appelés par la suite "G1 20X20".
- Des croisements factoriels déconnectés intra-population 5 par 5. Les 5 femelles de chaque origine ont été fécondées par les 5 mâles de la même origine. Pour chaque origine, les 25 croisements ont été faits séparément et les embryons ont été regroupés 3 heures après la fécondation. Par commodité, les descendants de ces populations seront appelés par la suite "G1 5X5". Le nom de la population parentale (arc, ba, pdb ou seu) sera utilisé pour désigner les descendants de chacun des croisements.

Pour assurer une contribution gamétique égale de chaque parent, les 400 croisements factoriels ont été effectués séparément dans des récipients de 400 ml. Les 40 parents (20 mâles et 20 femelles: 5 mâles et 5 femelles par population) ont été ouverts. Les spermatozoïdes ont été collectés par scarification ("stripping") de la gonade mâle. Le sperme a été dilué avec de l'eau de mer filtrée sur 1 µm, puis, stocké à 4 °C. Sa concentration a été estimée sur cellule de Thoma (coloration préalable à l'éosine) couplée à un système d'analyse d'image (système Alcatel/SAMBA). Les ovocytes des femelles ont été récoltés suivant la même procédure, filtrés sur un tamis de 60 µm et comptés sur cellule de Malassez. Pour chaque femelle, 3.000.000 d'ovocytes ont été distribués dans chaque récipient de fécondation et fécondés séparément par chaque mâle avec un ratio de 100 spermatozoïdes par ovocyte. Quatre cents fécondations *in vitro* ont ainsi été réalisées séparément, puis regroupées 3 heures après la fécondation. Un fragment de branchie a été prélevé sur chaque géniteur pour leur typage ultérieur à l'aide de marqueurs microsatellites (chapitre 6); la glande digestive et le muscle ont également été prélevés pour typage à l'aide de marqueurs allozymiques.

Les croisements déconnectés ont été faits séparément selon la même procédure et les mêmes quantités de gamètes.

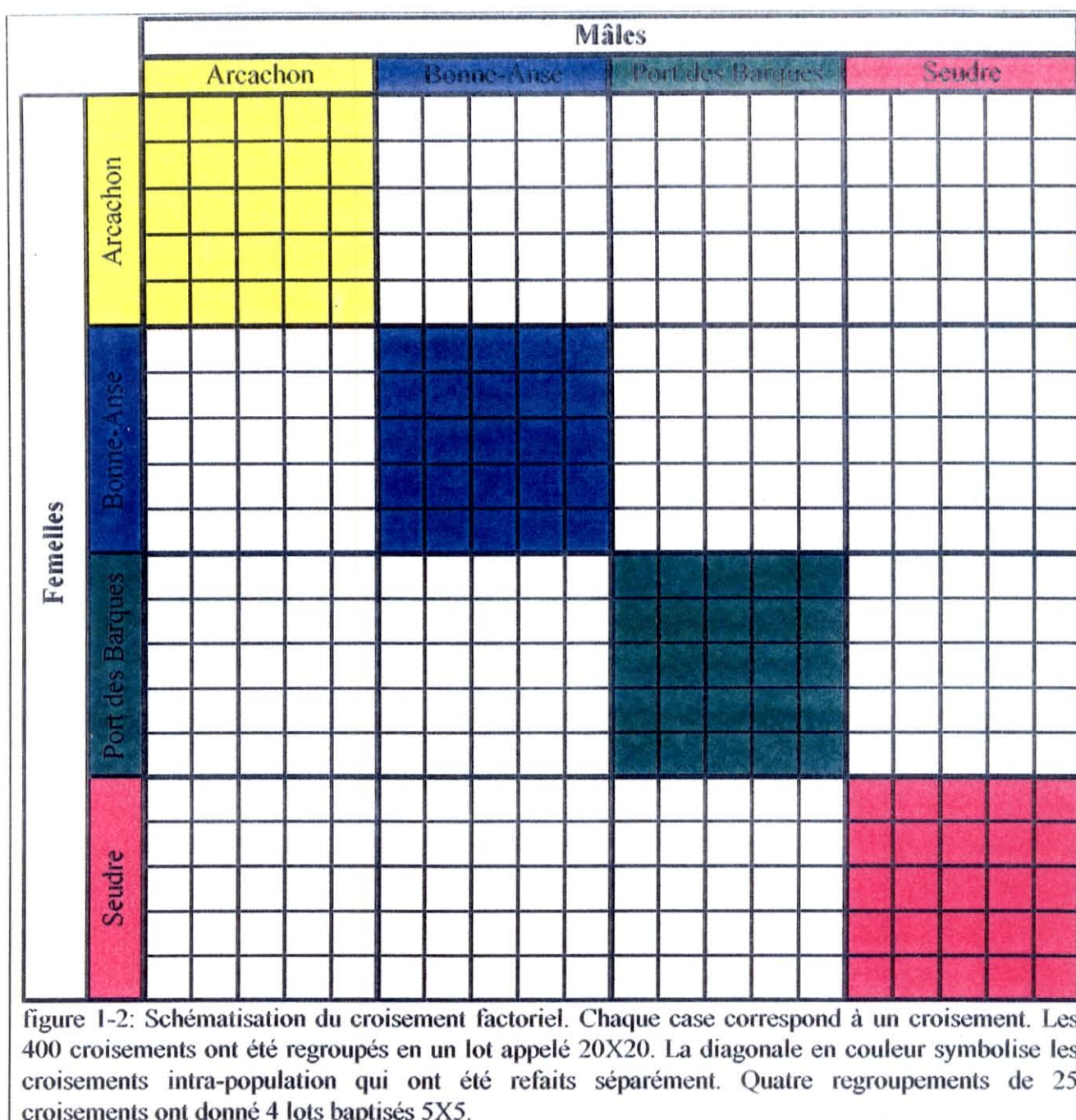
2.3. Taux de développement

Trois heures après fécondation et juste avant le mélange des 400 croisements, des prélèvements ont été effectués pour estimation du taux de développement en épifluorescence. Ces échantillons ont été fixés pendant 1 heure dans une solution fixatrice à 2 % de formaldéhyde préparé dans un tampon glucosamine-acetate puis lavé dans du tampon sans fixateur. L'ADN nucléaire a ensuite été coloré à l'Hoechst 33258 à $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (méthode décrite par Dubé *et al.*, 1985). L'observation en microscopie à épifluorescence permet de compter les embryons normalement développés et d'estimer le taux de développement embryonnaire (Annexe 1: photos 1, 2A et 2B).

2.4. Elevages larvaires

Après mélange, les embryons (Annexe 1, photo 3) issus des 400 croisements ont été répartis en quatre jarres de 150 litres d'eau de mer filtrée dont la température et la salinité ont varié au cours de l'élevage larvaire respectivement entre 22,0 et 23,2 ° C et entre 31,2 et 32,2 ‰ (moyennes: 22,6 ° C et 31,7 ‰). Les larves "G1 5X5" ont été conservées séparément dans quatre jarres de 150 litres dans les mêmes conditions. Toutes les 48 heures, l'état et le stade de développement des larves ont été appréciés à la loupe binoculaire (Annexe 1, photo 4).

Un comptage des différents lots larvaires a été effectué par prélèvements sur cellule quadrillée (Graticule Ltd). La taille moyenne des larves a été estimée par mesure de la longueur sur un projecteur de profil (Profile projector, Nikon; Interface PC) sur un échantillon de 30 larves. L'échelle de temps sera notée par la suite jX avec X, nombre de jours écoulés depuis la fécondation. Le pourcentage de larves anormales a été estimé à j1. Pendant ces opérations, l'eau des bacs a été renouvelée et traitée préventivement avec de faibles doses d'érythromycine. La nourriture quotidienne était principalement constituée d'*Isochrysis galbana tahiti* à raison de 500 ml de phytoplancton à environ 21 millions de cellules par ml, pour 150 litres d'eau d'élevage (Helm, 1977). Vingt-quatre heures après fécondation, un échantillon de larves a été prélevé et congelé à - 20 °C dans l'éthanol absolu pour analyse des microsatellites et tests de diagnostic en pathologie (détection du virus Herpès par PCR, Renault, comm. pers.).



Les larves ont été maintenues dans 4 bacs en GRP (Glass Reinforced Polyester) de 150 litres chacun remplis avec de l'eau de mer filtrée sur 1 μm (température 23 °C et salinité 28 ‰) et nourries avec *Isochrysis galbana* et *Extubocellulus criberiger*. La quantité totale de phytoplancton était de 60 cellules/ μl ce qui correspond à un régime alimentaire en excès (Nascimento, 1980), condition indispensable pour éviter la compétition pour la nourriture entre larves et pour maximiser la variabilité phénotypique. La densité larvaire à j1 était de 13 larves. ml^{-1} puis a été progressivement diminuée à 1 larve. ml^{-1} à j17, par élimination d'une partie de la population sans tamisage sélectif.

2.4.1. Groupes de tamisage

Quand les premières larves pédivéligères sont apparues, les larves les plus grandes (plus grand diamètre dépassant 280 μm) ont été sélectionnées par tamisage sur maille de 200 μm et mises à fixer. Le reste de la population larvaire a été gardé dans les bacs d'élevage larvaire. Plusieurs tamisages successifs ont été effectués permettant à chaque fois de séparer les individus les plus grands (plus grand diamètre dépassant 280 μm) et de les transférer vers le dispositif de fixation alors que le reste de la population était remis dans les bacs d'élevage larvaire. Ainsi, le premier groupe de tamisage correspond aux larves à croissance plus rapide et le dernier groupe de tamisage, aux larves à croissance plus lente. A chaque transfert vers le système de fixation, un échantillon de 150 larves a été prélevé et mesuré.

2.4.2. Fixation

A chaque opération de tamisage, l'ensemble des larves retenues sur le tamis a été divisé entre le raceway contenant les plaques collectrices et un raceway contenant un dispositif de fixation classique sur brisure de moule (250-350 μm , Ovine Ste). Le dispositif de fixation sur plaque consistait en un ensemble de plaques de PVC, recouvertes d'une première couche de paraffine et d'une seconde couche de Gel Coat et utilisées comme collecteurs. Des tests préalables ont montré que la couche de paraffine permet un détachement des huîtres sans risque de lésion alors que la couche de Gel Coat est un bon substrat pour les larves pédivéligères. La fixation d'une partie de la population sur brisure a permis de produire un nombre important d'individus des différents groupes de tamisage. Chaque raceway de fixation a été rempli avec de l'eau préalablement filtrée sur 10 μm maintenue à 26 °C par des thermo-plongeurs (Rena). L'eau a été aérée par un système automatique alternant phase de bullage (15 minutes) et phase stagnante (1 heure 45 minutes) pendant laquelle les larves peuvent se fixer librement. Dans chaque groupe de tamisage, des larves ont été quotidiennement échantillonnées, examinées et dénombrées. Les collecteurs ont été remplacés quotidiennement. Pour chaque groupe de tamisage, les larves se sont fixées pendant un nombre variable de jours. Après fixation, les plaques ont été maintenues dans des bacs de 800 litres alimentés par de l'eau de mer naturelle pré-filtrée et enrichie en *Skeletonema costatum*.

2.4.3. Suivi de croissance

Une grande partie des animaux fixés sur les plaques a été éliminée au hasard pour réduire la densité et éviter la compétition spatiale entre les individus. Pour chaque paire d'individus se chevauchant, alternativement le plus petit et le plus grand ont été éliminés pour éviter de biaiser la

mesure. Sur les individus restant, 100 par groupe de tamisage ont été tirés au sort puis marqués individuellement en inscrivant un numéro d'identification directement sur la plaque en face de la charnière de l'animal. Une fois par semaine et à 4 reprises, la longueur entre la charnière et le bord opposé de la coquille a été mesurée au pied à coulisse avec une précision de 0,01 mm. L'ensemble des données est constitué de 400 courbes de croissance à 4 points. Dans cette étude les mesures ont porté sur la longueur qui est en général bien corrélée au poids total (Haley et Newkirk, 1978), en particulier sur un collecteur plan où la croissance est parfaitement homogène (voir figure 3, photo 13 de l'introduction). Quand la taille de l'animal a été suffisante (j58), tous les individus ont été détachés des plaques, marqués individuellement (étiquette collée à la colle epoxy) puis pesés. La vitesse de croissance après métamorphose à j58 a été calculée en divisant le poids total à j58 par le nombre de jours de croissance après fixation. Une semaine plus tard, tous les individus ont été pesés à nouveau. Les individus des groupes de tamisage obtenus par fixation sur brisure de moule ont été transférés à la nurserie de l'IFREMER de Bouin (Vendée) et maintenus en condition d'élevage intensive (Baud, 1997). Onze mois après fécondation, 100 individus par groupe de tamisage ont été pesés au 1/10 de gramme.

2.4.4. Analyses statistiques

L'analyse descriptive concernant les populations parentales a été faite à l'aide de l'option NORMAL de la procédure PROC UNIVARIATE (SAS Institute, 1988). La normalité a été testée par le test de Shapiro-Wilk avec, comme hypothèse nulle, la non-normalité de la distribution (Shapiro et Wilk, 1965). Les taux de développement ont été analysés par une analyse de variance après normalisation par transformation angulaire (Sokal et Rohlf, 1995). Le modèle suivant à 4 facteurs hiérarchisés a été testé.

$$\text{Arcsin}(\sqrt{\text{TX}}) = \text{POPMALE} + \text{POPFEMELLE} + \text{MALE}(\text{POPMALE}) + \text{FEMELLE}(\text{POPFEMELLE}) + \varepsilon$$

Avec TX = taux d'éclosion, POPMALE = effet de l'origine mâle, POPFEMELLE = effet de l'origine femelle, MALE = effet individuel mâle, FEMELLE = effet individuel femelle. Les facteurs MALE et FEMELLE sont hiérarchisés respectivement dans POPMALE et POPFEMELLE.

A j58, la relation entre poids total et longueur a été analysée par ajustement non linéaire (SAS PROC NLIN).

Pour chaque individu, la vitesse de croissance (notée GR, en g.j⁻¹) a été calculée en divisant le poids total à j58 par le nombre de jour après fixation. L'effet du groupe de tamisage (SG) et de la date de fixation (DSET) sur la vitesse de croissance ont été testés par analyse de variance à deux

facteurs (SAS PROC MIXED), avec SG et DSET(SG) respectivement groupe de tamisage à effet fixe et date de fixation à effet aléatoire hiérarchisé dans SG:

$$GR = \alpha.SG + \beta.DSET + \varepsilon$$

L'effet du groupe de tamisage (SG) sur le poids total à 11 mois a également été analysé par analyse de variance à un facteur (SAS PROC GLM). Les tests multiples ont été effectués par la procédure de groupage multiple de Student-Newman-Keuls (Einot et Gabriel, 1975).

3. Résultats

3.1. *Caractéristiques des populations de géniteurs*

Les histogrammes des poids totaux pour les populations parentales sont représentés à la figure 1-3. Les paramètres statistiques descriptifs sont regroupés dans le tableau 1-1. Exceptée pour la population d'Arcachon, aucune des distributions de taille n'est normale (Hypothèse nulle: la distribution n'est pas normale; $p < 0,422$ pour Arcachon; $p < 0,0001$ pour les 3 autres populations, tableau 1-1).

3.2. *Taux d'éclosion*

Les taux d'éclosion à 3 heures sont donnés à la figure 1-4 et illustrés à la figure 1-5. Une analyse de variance à 4 facteurs hiérarchisés après transformation angulaire des données montre qu'il existe un effet significatif du mâle ($p < 0,0001$), de la femelle ($p < 0,0001$) et de l'origine de la femelle ($p < 0,0001$) sur le taux d'éclosion. Cependant, l'origine du mâle n'influe pas significativement sur le taux d'éclosion (tableau 1-3).

3.3. *Croisements et élevages larvaires (G1 5X5 et 20 X20)*

Les données de croisement sont représentées au tableau 1-2. Le bon état de maturation des animaux a permis d'obtenir des gamètes en nombre et qualité suffisants pour réaliser les 400 croisements avec les quantités de gamètes initialement prévues.

3.3.1. Elevage larvaire

Le nombre total de larves obtenues à j1 était de 16.240.000. Après un ajustement progressif de la densité, ce nombre a été réduit à 1.134.000 à j17. A j1 le nombre d'embryons comptés comme anormaux était négligeable. La courbe de croissance larvaire de l'ensemble de la population larvaire est représentée à la figure 1-7.

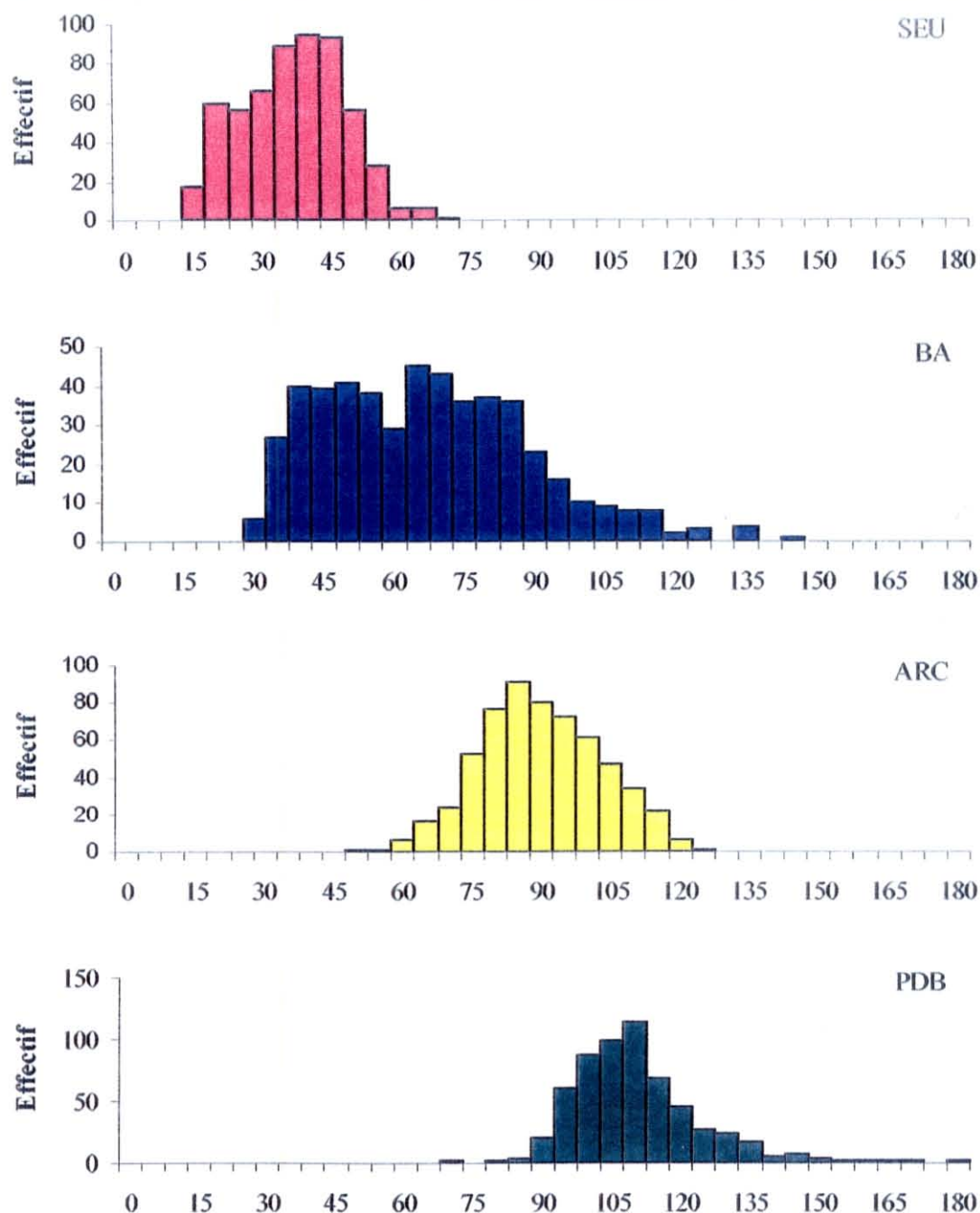


figure 1-3: Histogramme des poids totaux des quatre populations de géniteurs *Crassostrea gigas*. Les effectifs sont représentés en fonction des classes de poids total (g). SEU = Seudre, BA = Bonne Anse, ARC = Arcachon et PDB = Port des Barques.

La longueur larvaire moyenne avant tamisage à j17 était de $271,7 \pm 51,0 \mu\text{m}$ avec un coefficient de variation de 18,8 %. Le coefficient de variation a augmenté de 3 % à j1 à 9 % à j6 et s'est finalement stabilisé autour de 20 % de j9 à j17. Les premières larves pédivéligères et les premières larves dépassant $280 \mu\text{m}$ sont apparues à j17. Les tamisages ont été faits à j17, j20, j23 et j26 jours aboutissant respectivement aux groupes de tamisage numérotés 1, 2, 3 et 4. La longueur

tableau 1-1: Paramètres statistiques descriptifs des populations de géniteurs.

population	Taille de l'échantillon	Poids total moyen (g)	Ecart type	minimum (g)	maximum (g)	non normalité
Seudre	577	34,4	11,2	15	75	$p < 0,0001$
Port des Barques	586	107,7	13,3	70	185	$p < 0,0001$
Bonne-Anse	501	64,7	22,2	30	145	$p < 0,0001$
Arcachon	596	87,5	13,2	50	130	$p < 0,422$
Total	2260	73,6	15,0	15	185	

		Mâles																						
		Seudre					Bonne Anse					Port des Barques					Arcachon							
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5			
Femelles	Seudre	1	80	84	90	92	85	94	90	91	85	92	89	85	86	85	84	90	80	84	88	94	87.4	92.1
		2	93	96	100	100	97	99	98	100	98	99	96	97	100	90	98	99	98	99	100	100	97.9	
		3	79	94	90	86	89	90	82	85	86	86	79	80	91	74	80	87	72	86	88	85	84.5	
		4	92	97	100	96	97	100	100	100	98	98	100	99	98	95	96	98	98	97	100	99	97.9	
		5	96	96	99	94	25	97	99	96	96	99	98	94	92	94	96	94	98	98	99	100	93.0	
	Bonne-Anse	1	84	81	78	74	74	76	81	68	60	67	80	64	54	72	50	61	68	53	65	58	68.4	85.7
		2	85	87	86	92	87	93	84	90	84	83	82	92	84	75	82	85	89	87	90	89	86.3	
		3	95	96	95	89	98	90	93	96	ND	99	99	90	98	89	98	90	87	90	96	97	93.9	
		4	96	94	86	86	79	86	85	85	80	81	77	77	92	87	80	68	70	77	94	89	83.5	
		5	98	95	98	96	96	94	97	98	98	94	93	97	97	91	96	98	97	97	98	99	96.4	
	Port des Barques	1	93	94	92	93	91	96	92	85	89	91	90	91	77	72	92	92	93	90	89	94	89.8	94.1
		2	94	97	99	97	98	99	93	94	97	99	98	93	96	95	98	96	95	97	95	96	96.3	
		3	98	99	100	96	88	99	97	98	98	97	99	99	98	91	94	100	100	98	98	99	97.3	
		4	93	93	91	91	94	97	93	94	93	93	95	ND	91	92	93	95	96	94	93	96	93.5	
		5	91	96	94	93	97	94	ND	93	85	ND	92	96	93	96	ND	90	92	95	94	96	93.4	
	Arcachon	1	78	90	ND	80	79	82	81	77	80	80	83	85	67	82	63	82	75	80	77	84	79.2	78.6
		2	96	99	99	96	97	92	97	98	98	100	93	94	96	91	97	97	99	97	96	98	96.5	
		3	27	32	33	19	17	37	19	25	19	33	98	16	25	21	22	27	20	19	42	25	28.8	
		4	97	98	97	100	99	96	98	98	98	98	99	98	98	93	95	95	97	98	96	99	97.4	
		5	87	94	97	95	96	95	94	87	88	96	91	95	91	81	95	85	83	85	93	97	91.3	
		87.6	90.6	90.7	88.3	84.2	90.3	88.1	87.9	85.8	88.7	91.6	86.4	86.2	83.3	84.7	86.5	85.4	86.1	89.6	89.7	87.6		
		88.3					88.1					86.4					87.4							

figure 1-4: Taux d'éclosion pour chacun des 400 croisements, moyenne par mâle, par femelle, par population mâle, par population femelle et globale. Chaque valeur est estimée par comptage de 100 embryons. ND = Non déterminé

Les larves ont été mises à fixer pendant 1, 4, 2 et 4 jours respectivement pour les groupes de tamisage 1, 2, 3 et 4 (figure 1-8 et tableau 1-4). Après le dernier tamisage, aucune larve viable n'a traversé le tamis, indiquant que la majorité de la population larvaire transférée dans le bac de fixation s'était fixée spontanément. Ainsi, 13 jours séparent la première larve fixée de la dernière.

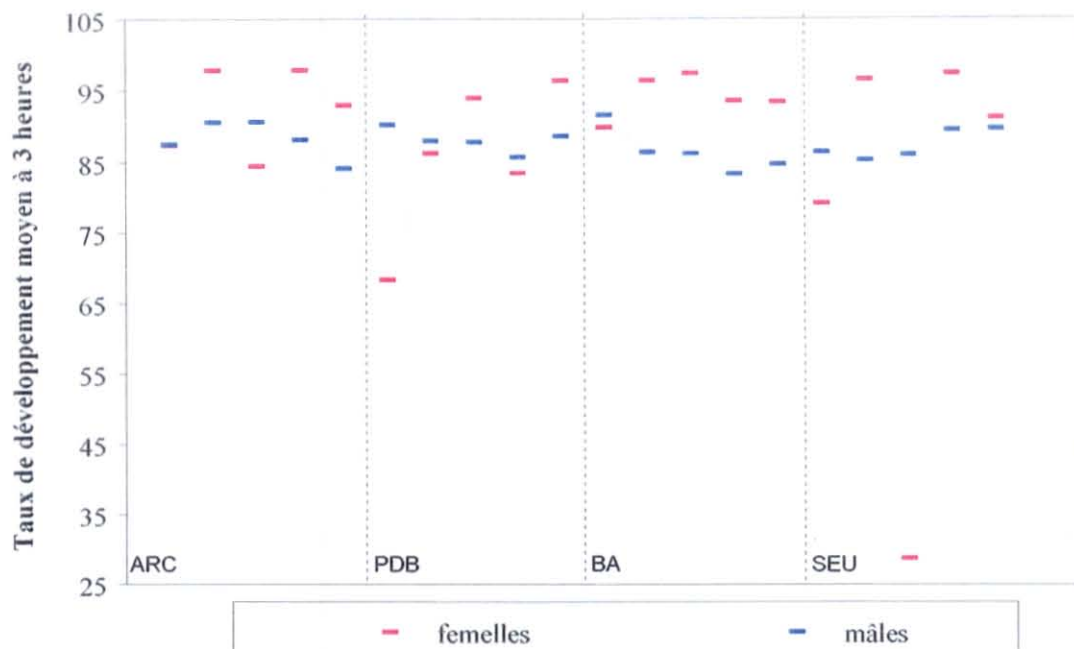


figure 1-5: Variation selon le mâle, la femelle, l'origine du mâle et l'origine de la femelle du taux de développement chez *Crassostrea gigas*. ARC = Arcachon, PDB = Port des Barques, BA = Bonne Anse et SEU = Seudre.

3.3.2. Croissance post-larvaire

Le coefficient de variation de la longueur post-larvaire allait de 18,8 % à 43,8 % pour l'ensemble de la population entre 37 jours et 58 jours après fécondation. La mortalité entre le premier et le dernier jour de mesure était de 6 % et n'a pas affecté la croissance.

La figure 1-6 montre des individus à j30 fixés sur les collecteur en PVC. Les courbes de croissance moyennes par groupe de tamisage sont données en fonction du temps après fécondation à la figure 1-7. Les mêmes courbes sont ensuite représentées en fonction du temps après fixation, en considérant, pour chaque groupe de tamisage, le premier jour de fixation (respectivement 17, 20, 23 et 26 jours après fécondation pour les groupes de tamisage 1, 2, 3 et 4, figure 1-9). Les courbes de croissance des différents groupes de fixation sont représentées à la figure 1-10 en fonction du temps après fixation. Ces différentes courbes montrent l'importance de l'origine de l'échelle de temps (date de la fécondation ou date de la fixation) dans la comparaison de groupes à vitesse de croissance larvaire distincte.

La relation entre poids total après détachement et la longueur à j58 est de type parabolique (figure 1-11). L'ajustement à une courbe de type Poids total = $a \cdot (\text{longueur})^2$ est très significatif ($F = 64,17$ $P < 0,0001$). Le coefficient a caractérisant la croissance sur plaque PVC est estimé à $16 \cdot 10^{-4} \pm 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mm}^{-2}$.

Le groupe de tamisage affecte significativement la vitesse de croissance post larvaire estimée à j58 ($F = 41,98$ $P = 0,0001$; tableau 1-5). Le résultat du test de Student-Newman-Keuls montre que l'ordre de vitesse décroissant est $SG1 > SG2 > SG3 > SG4$ (tableau 1-5). Chaque groupe de tamisage est caractérisé par une vitesse de croissance larvaire particulière corrélée significativement ($F = 283$ $P = 0,0001$) et positivement à la croissance post larvaire (figure 1-12).

3.3.3. Croissance juvénile

Après 11 mois de croissance en condition intensive, les groupes de tamisage obtenus sur brisure avaient un poids total moyen de $21,6 \pm 1,35$ g, $18,72 \pm 1,24$ g, $18,27 \pm 1,25$ g et $12,10 \pm 1,09$ g pour les groupes de tamisage 1, 2, 3 et 4 respectivement. Le rang du groupe de tamisage affecte significativement ($p < 0,0001$) le poids total et la vitesse de croissance (figure 1-13).

tableau 1-2: Nombre moyen de gamètes obtenus par scarification des gonades des 5 mâles et 5 femelles par population.

Sexe	Origine	nombre total de gamètes en millions	nombre de gamètes utilisés en millions
Femelle	Seudre	15	3
	Port des Barques	16,2	3
	Bonne Anse	23,1	3
	Arcachon	22,2	3
	Bonne Anse	15 190	300
	Arcachon	22 000	300
	Moyenne	18 720	300

tableau 1-3: A Résultat de l'analyse de variance sur les taux d'éclosion après transformation angulaire.

source	DL	Somme des Carrés	Carrés Moyens	Valeur F	Pr > F
population mâle	3	0,071	0,023	2,61	0,0511
individu mâle	16	0,499	0,031	3,43	0,0001
population femelle	3	2,474	0,824	90,46	0,0001
individu femelle	16	13,619	0,851	93,35	0,0001

tableau 1-4: Paramètres de croissance des larves. SG = Groupe de tamisage, la date de tamisage et la date de fixation sont données en jours après fécondation, L = longueur moyenne après tamisage G = vitesse de croissance globale.

SG	Date de tamisage	Dates de fixation	L (μm)	G ($\mu\text{m.j}^{-1}$)
1	17	17	$314,7 \pm 3,4$	$18,5 \pm 0,10$
2	20	20, 21, 22, 23	$328,2 \pm 3,1$	$16,4 \pm 0,08$
3	23	23, 24	$331,6 \pm 3,5$	$14,4 \pm 0,08$
4	26	26, 27, 28, 29	$340,6 \pm 3,8$	$13,1 \pm 0,08$

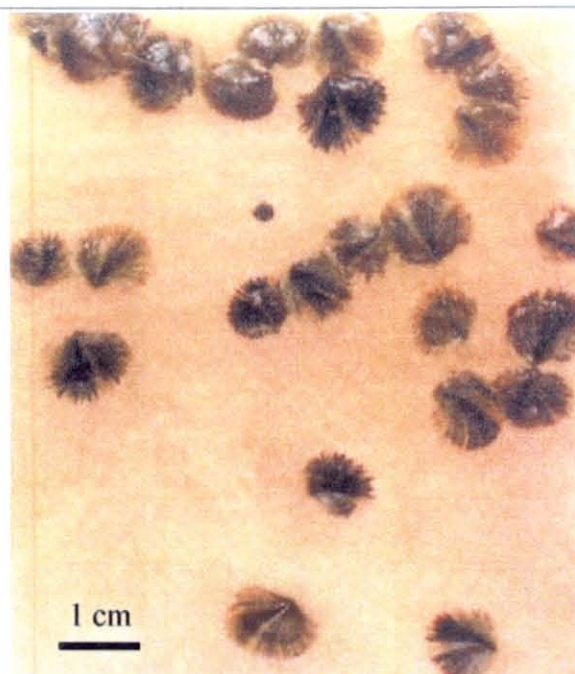


figure 1-6: *Crassostrea gigas* âgées de 1 mois fixées sur plaque de PVC, montrant la croissance très homogène ainsi que la variabilité de taille très forte.

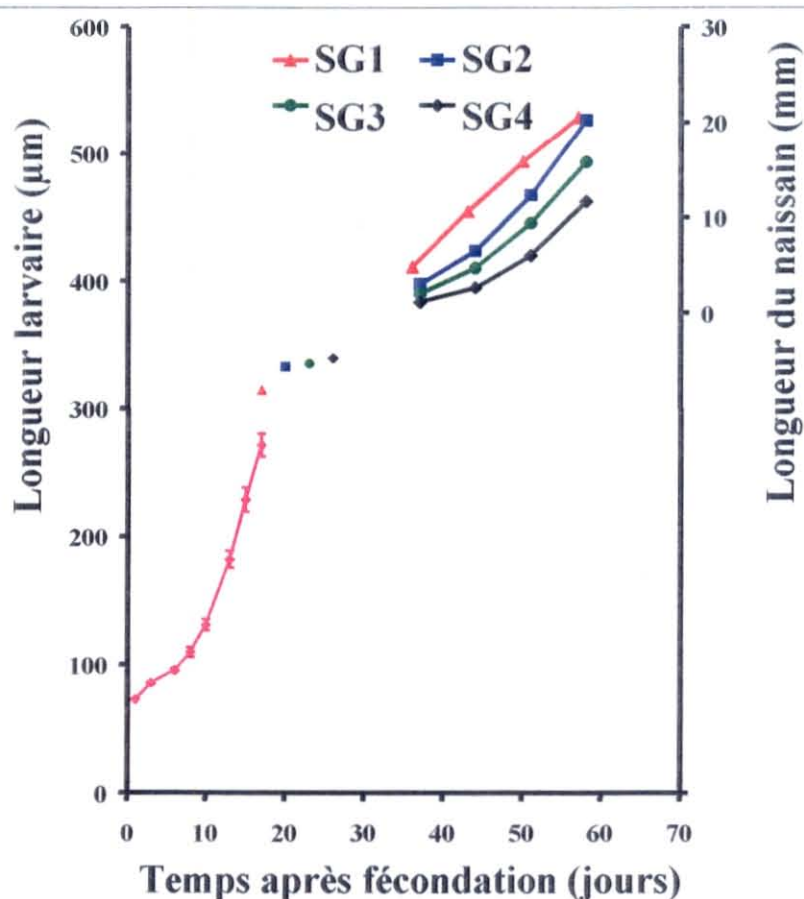


figure 1-7: Cinétiques de croissance aux stades larvaires et naissain chez *Crassostrea gigas*. Les larves ont été élevées ensemble de 0 à 17 jours après fécondation. Quatre opérations de tamisage et des fixations séquentielles sur plaques de PVC ont abouti à 4 groupes de tamisage fixés de 17 à 29 jours après fécondation. La longueur du naissain a été mesurée sur 400 individus à 4 reprises. La moyenne par groupe de fixation \pm SE est représentée.

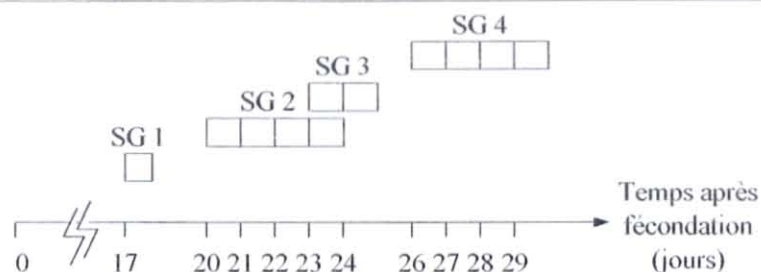
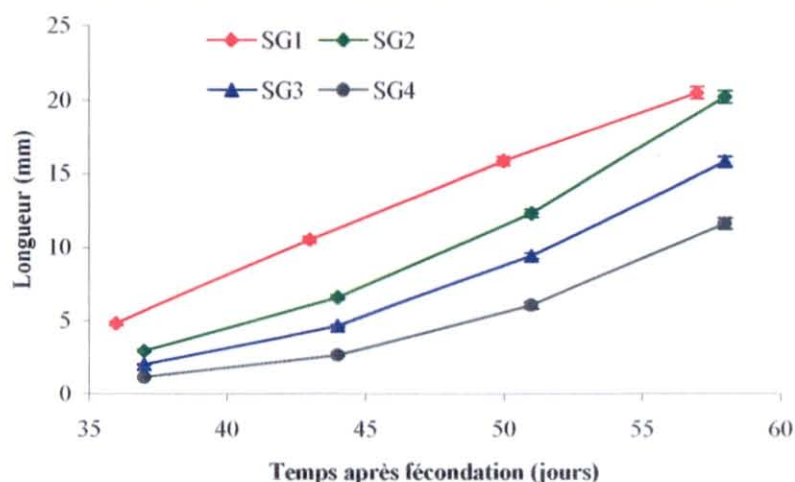
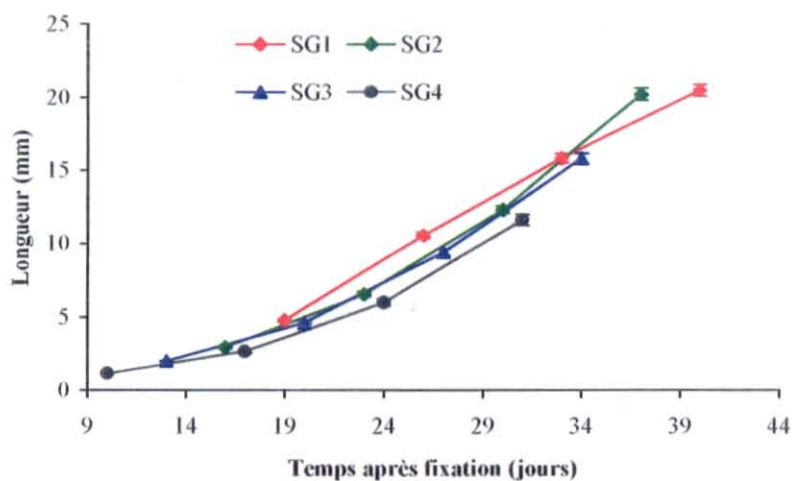


figure 1-8: Résumé des séquences de fixation des larves en fonction du temps après fécondation. Chaque carré représente l'ensemble des larves fixées le même jour.



A



B

figure 1-9: Cinétiques de croissance des groupes de tamisage en fonction du temps après fécondation (A) et après fixation (B) chez *Crassostrea gigas*. Le premier jour de fixation a été utilisé pour déterminer le temps après fixation des groupes de tamisage. La moyenne par groupe de tamisage \pm se est représentée. $n = 100$ par groupe de tamisage.

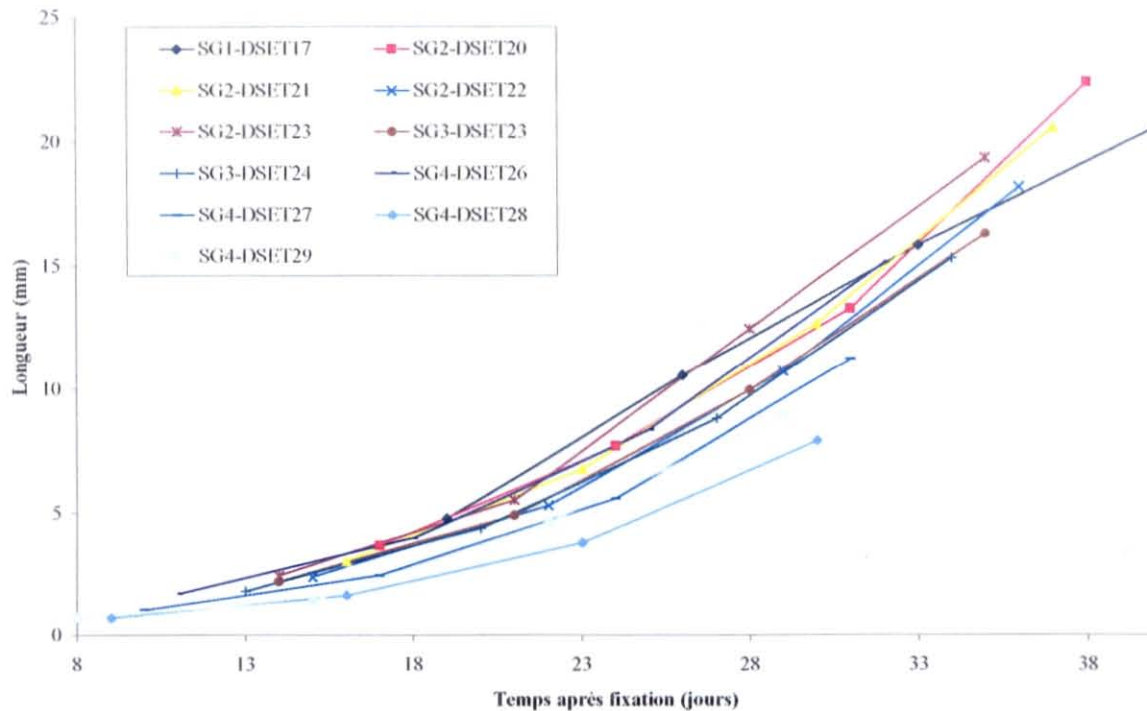


figure 1-10: Courbes de croissance moyenne en fonction du temps après fixation chez *Crassostrea gigas*. Chaque courbe correspond à un groupe de tamisage (SG, de 1 à 4) et un jour de fixation (DSET, de 17 à 29). Pour plus de clarté, seules les moyennes sont représentées.

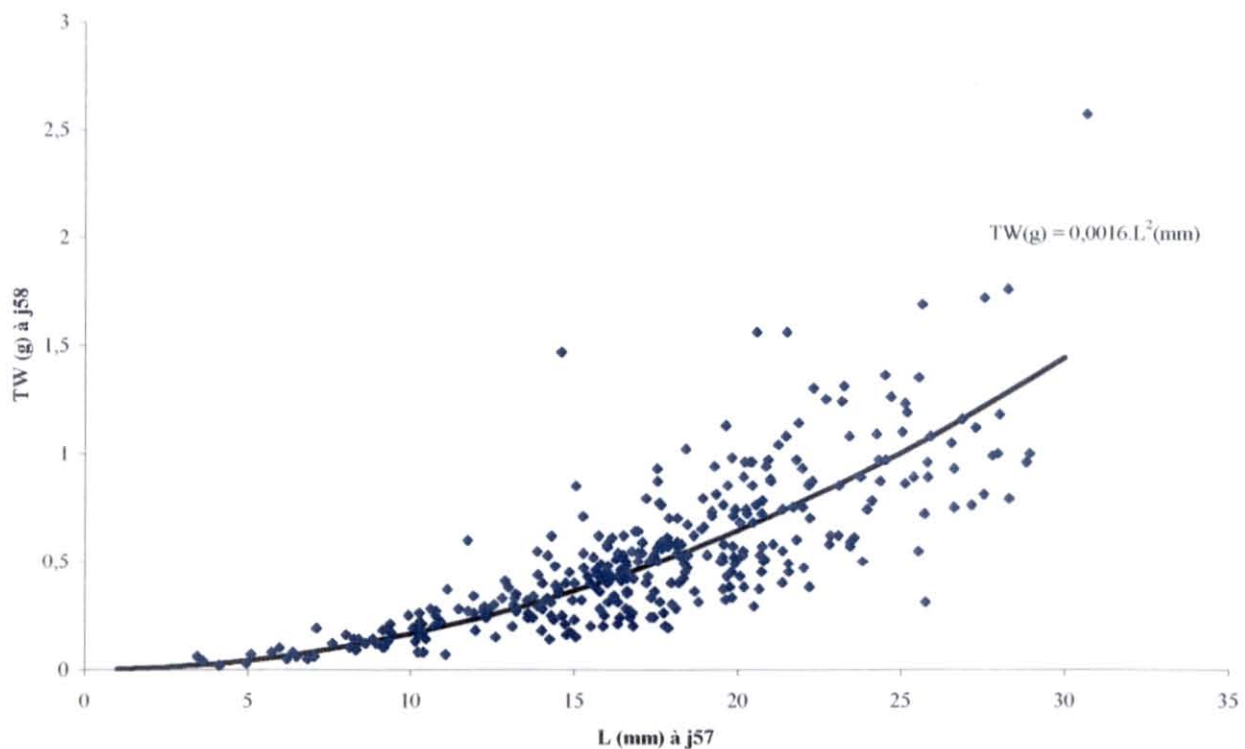


figure 1-11: Relation entre le poids total (g) et la longueur (mm) 58 jours après fécondation caractérisant la croissance du naissain de *Crassostrea gigas* fixé sur des collecteur PVC plans.

tableau 1-5: Résultats de l'analyse de variance testant l'effet du groupe de tamisage (SG) et du jour de fixation (DSET, hiérarchisé dans SG) sur la vitesse de croissance du naissain.

Facteur	F	p
SG	128,63	0,0001
SG(DSET)	4,85	0,0001
Test de Student-Newman-Keuls		
SG	Groupe	Moyenne
1	A	0,049887
2	B	0,02203
3	C	0,018579
4	D	0,011632

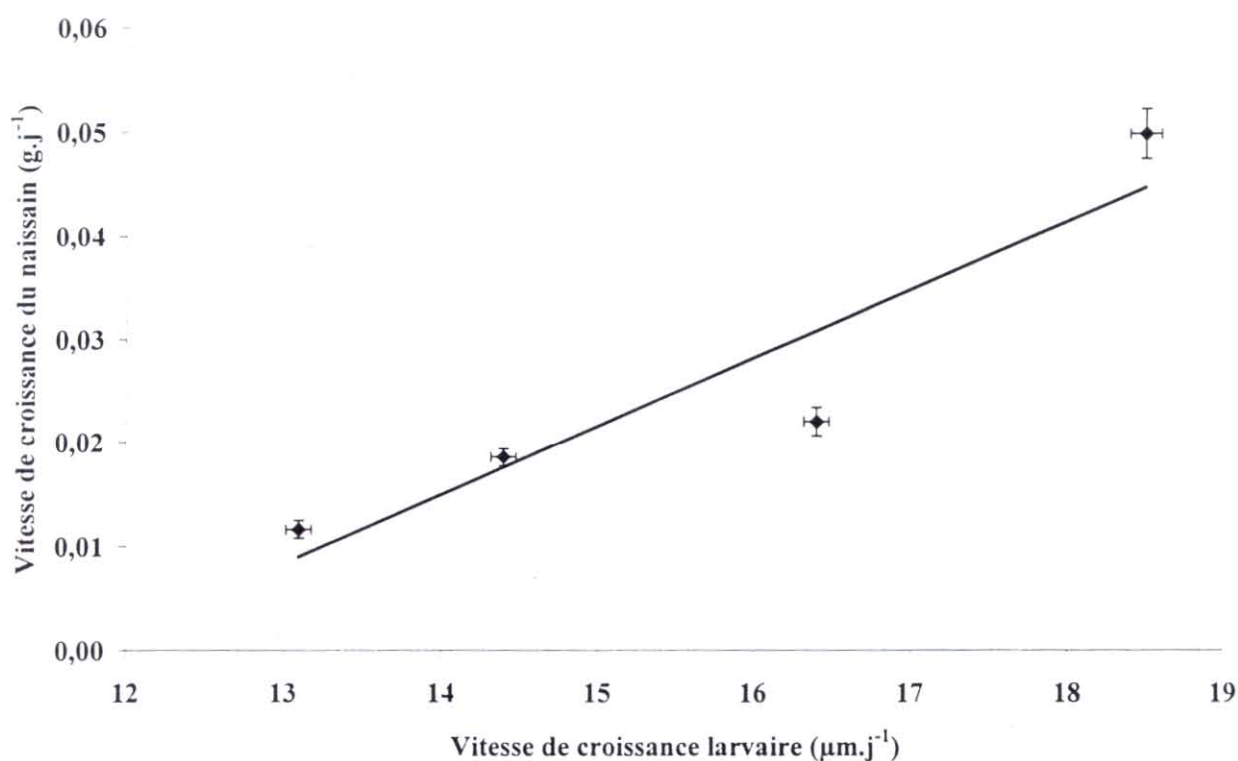


figure 1-12: Corrélation entre la vitesse de croissance larvaire et la vitesse de croissance post larvaire. Les données représentent la moyenne \pm se.

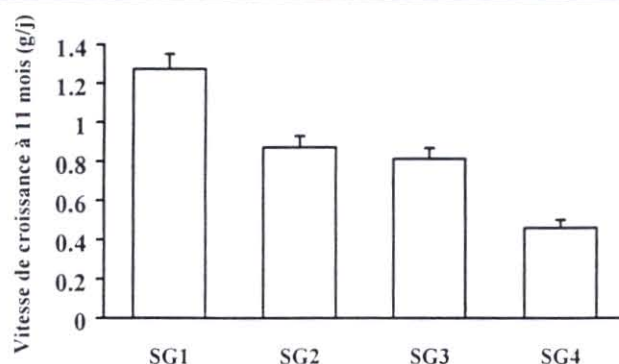


figure 1-13: Vitesse de croissance juvénile à 11 mois des groupes de tamisage chez *Crassostrea gigas*. Les données représentent la moyenne \pm SE par groupe de tamisage, $n = 400$.

4. Discussion

4.1. Géniteurs

Selon les fournisseurs, les populations d'Arcachon, de l'estuaire de la Seudre et de Port des Barques, ne sont constituées que d'une seule classe d'âge, issues d'un captage en 1993. Cependant lorsqu'on observe les histogrammes des poids totaux (figure 1-3) pour chaque population de géniteurs, on peut se demander si la population de la Seudre appartient à la même classe d'âge que celles d'Arcachon et de Port des Barques. Les populations d'Arcachon et de Port des Barques pourraient avoir été captées en 1992 et celle de la Seudre en 1993 alors que la population de Bonne Anse pourrait être un mélange d'individus captés en 1992 et 1993, expliquant la distribution presque bimodale des poids totaux. Il est pratiquement possible que deux captages successifs aient eu lieu puisque le détroquage pour une année de fixation ne peut se faire que 18 mois plus tard et il n'est donc pas impossible que le second captage soit intervenu avant détroquage du premier. La première condition pour la constitution d'une population de référence à base génétique large est l'origine naturelle du naissain.

Le but recherché est de maximiser l'hétérogénéité de tous ces lots de géniteurs, impliquant l'absence de tri par les producteurs, de façon à avoir une représentation maximale de toutes les tailles pour chaque population. La non normalité de la répartition des poids totaux pour 3 des 4 populations tendrait à montrer qu'un tri plus ou moins important a été effectué et qu'il y a eu un mélange de classes d'âge. Si l'on considère l'asymétrie existant dans la répartition des poids pour les populations d'Arcachon et de Port des Barques, il existe un déficit en animaux de poids élevé pour les géniteurs de Port des Barques, alors qu'ils sont en excès dans la population d'Arcachon. Il n'est par exemple pas impossible que la population d'Arcachon ait subi un tamisage étant donné que l'ostréiculteur concerné a l'habitude de trier les animaux très tôt. La distribution bimodale des poids de la population de Bonne Anse peut être interprétée par le mélange en cours d'élevage de deux années de captages ou de deux lots différents n'ayant pas profité des mêmes conditions environnementales (température et/ou quantité ou qualité de nourriture par exemple). Un tel mélange peut également expliquer l'excès d'individus de petite taille dans la population de la Seudre. Les différences significatives de poids totaux entre les populations (avec dans l'ordre croissant des poids totaux moyens: Seudre > Bonne Anse > Arcachon et Port des Barques) peuvent être dues en grande partie aux conditions d'élevage.

4.2. Croisements

L'analyse montre qu'il existe un effet individuel du mâle et de la femelle et un effet de l'origine de la femelle sur le taux de développement des embryons à 3 heures dans le croisement contrôlé présenté dans ce chapitre. L'effet individuel de la femelle découle de 2 femelles (l'une de Port des Barques, l'autre de l'estuaire de la Seudre) donnant des taux de développement médiocres (figure 1-5). Ce résultat met en évidence l'importance de la qualité des ovocytes qui est déterminée par la quantité et qualité des réserves conditionnées par la période de maturation. L'effet individuel mâle est plus délicat à interpréter et peut s'exprimer à la fécondation (taux de fécondation différents selon les mâles) ou au développement (taux de développement différents selon les mâles). Cet aspect sera abordé plus en détail au chapitre 6.

L'absence de compétition dans les élevages larvaires a déjà été utilisée dans l'étude de l'héritabilité de la croissance (Newkirk *et al.*, 1977; Hadley *et al.*, 1991). De même, comme le font remarquer Rawson *et al.* (1990), il est reconnu que la densité affecte la croissance tant dans le milieu naturel qu'en élevage. Celle-ci a donc été ajustée et contrôlée durant tout l'élevage larvaire afin de permettre une expression génétique maximale de la croissance, et de maintenir tous les lots dans des conditions identiques.

Une représentation égale de toutes les combinaisons de croisements a pu être respectée par dénombrement des gamètes pour chaque géniteur. Ceci ne signifie cependant pas que tous les croisements soient représentés de façon équivalente en élevage larvaire et après (chapitre 6).

L'étude effectuée sur le taux de développement embryonnaire met en évidence une forte hétérogénéité des populations et des individus quant aux performances de reproduction. Ainsi, les individus femelles d'Arcachon donnent des résultats de fécondation nettement inférieurs aux autres. Cependant, l'effet individuel est beaucoup plus fort que l'effet de la population.

4.3. La croissance précoce post-larvaire est elle dépendante de la croissance larvaire ?

Cette expérience met en évidence un effet positif de la date de tamisage (i.e. vitesse de croissance larvaire) et de la date de métamorphose (i.e. vitesse de développement) sur la vitesse de croissance du naissain de *Crassostrea gigas* dans des conditions environnementales (température, salinité, quantité et qualité de la nourriture) maintenues les plus constantes possibles pendant les stades larvaires et post-larvaires. Le plan expérimental fait que la date de métamorphose est hiérarchisée dans le groupe de tamisage, rendant difficile l'analyse simultanée de ces deux facteurs. Les tamisages successifs ont permis de séparer les individus selon leur vitesse de croissance larvaire. Au sein de ces groupes de tamisage, des fixations séquentielles ont permis de séparer des

individus avec des dates de fixation s'étalant de 17 à 29 jours après fécondation. Dans les écloséries de bivalves, la durée de la période de fixation normale est supposée être de l'ordre de 18 jours (Quayle, 1969) et la fixation apparaît autour de 20 jours après fécondation.

La croissance larvaire était jusqu'ici considérée comme peu informative pour la croissance post-larvaire (Newkirk, 1980; Heffernan *et al.*, 1992; Hilbish *et al.*, 1993). Cependant, la croissance et la survie larvaire sont les caractères les plus importants pour la production en éclosérie. Plusieurs études ont mis en évidence des différences de croissance et de survie au stade larvaire entre des populations de *Crassostrea virginica* (Newkirk *et al.*, 1977; Newkirk, 1978; Mallet et Haley, 1983; 1984) et de coquilles Saint Jacques *Pecten maximus* (Paulet *et al.*, 1988; Cochard et Devauchelle, 1993).

Les vitesses de croissance des larves et du naissain se sont avérées effectivement corrélées chez *Crassostrea virginica* (Newkirk *et al.*, 1977) et légèrement corrélées positivement chez *Crepidula fornicata* (Pechenik *et al.*, 1996a). De la même manière, la durée de la vie larvaire (après sortie des larves de la cavité palléale de la femelle) apparaît être négativement corrélée avec la longueur à 5 mois chez *Ostrea edulis* (Newkirk *et al.*, 1982), mais l'analyse a été faite sur la longueur plutôt que sur des vitesses de croissance. Le résultat présent apporte un argument en faveur d'une relation positive entre croissance larvaire et croissance post larvaire chez *Crassostrea gigas*. Cependant, cette étude met en évidence l'importance du retard de croissance entre des individus métamorphosés à des dates différentes, nécessitant de considérer le temps après fixation plutôt que le temps après fécondation. Certaines analyses, telles celles de Losee (1979), ont montré une différence de vitesse de croissance 29 semaines après la fixation entre du naissain de *Crassostrea virginica* fixé à différentes dates. Néanmoins, la courte période entre les groupes de fixation n'a pas été pris en compte puisque tous les groupes ont été pesés le même jour. Un retard de croissance, même de quelques jours, apparaissant après fixation peut encore être présent plusieurs mois plus tard étant donné la vitesse initiale très élevée des stades précoces (Quayle, 1969). Newkirk *et al.* (1977) ont obtenu 4 groupes de fixation chez *Crassostrea virginica* en changeant des collecteurs tous les 2 jours. La taille moyenne des groupes de fixation était négativement corrélée avec le rang de ceux-ci. Encore une fois, deux jours de croissance après métamorphose peuvent expliquer les différences en taille observées entre les groupes ou tout du moins la corrélation observée entre la croissance avant et après fixation. Les groupes de fixation chez *Ostrea edulis* ont été obtenus de manière similaire par Newkirk and Haley (1982a) et une corrélation a été trouvée entre la durée de la vie larvaire et la taille du naissain à 5 mois. La comparaison des mêmes courbes de croissance en

fonction du temps après fécondation et du temps après fixation montre que cette corrélation peut être expliquée par le retard de croissance existant entre les groupes de fixation (figure 1-9).

Pechenik *et al.* (1996a) ont trié des larves de *Crepidula plana* en 3 groupes à vitesse de croissance faible, moyenne et élevée et ont mesuré le naissain à 3, 6 et 9 jours après la métamorphose. Aucune différence de croissance n'a pu être mise en évidence au stade juvénile entre ces 3 groupes. Ce résultat peut être dû au fait que cet auteur a utilisé comme paramètre de croissance une vitesse plutôt qu'un paramètre absolu tel que le poids total ou la longueur.

4.4. La fixation est-elle dépendante de la taille ou de l'âge des larves ?

Pour les 4 groupes de tamisage, seules les larves ayant atteint 280 μm de longueur à une date donnée ont été mises en fixation. Le coefficient de variation pour une longueur autour de 100 μm allait de 8,5 % à 18,7 % de j6 à j9, ce qui est très élevé comparé à la moyenne de 4 % obtenue par Nascimento (1983) pour des larves d'une longueur similaire. Ceci est la conséquence du maintien de conditions d'élevage non sélectives (densités larvaires faibles et quantité de nourriture non limitante). Par conséquent, dans cette expérience, le groupe de tamisage est un bon indicateur de la vitesse de croissance larvaire. Cette observation est en accord avec les résultats de Pechenik et Lima (1984) sur des larves du gastéropode *Crepidula* élevé individuellement. Ces auteurs ont montré qu'il existait une relation négative entre la vitesse de croissance larvaire et la durée de vie larvaire. D'autre part ils ont également mis en évidence une forte corrélation positive entre la vitesse de croissance larvaire et la vitesse de différenciation estimée à partir du temps nécessaire au développement des rudiments de branchie et au passage de la coquille du type larvaire au type adulte. Ces observations sont en faveur de l'hypothèse d'une fin pré-programmée de la vie larvaire dépendant plus de la taille et de l'état de différenciation plutôt que de l'âge. Néanmoins cette question est encore débattue et certains auteurs montrent que la croissance larvaire et la compétence à la métamorphose peuvent être découplées sous certaines conditions (Pechenik et Heyman, 1987; Pechenik *et al.*, 1996b). Comparer la croissance larvaire et post-larvaire grâce à l'analyse de groupes de larves séparées sur la base de leur date de fixation (Newkirk *et al.*, 1982) requiert que la date de métamorphose soit dépendante de la taille plutôt que de l'âge des larves.

Les facteurs déterminant le déclenchement de la métamorphose ont été discutés à maintes reprises. Pechenik *et al.* (1996a) expliquent que l'apparition de la compétence à la métamorphose n'est pas dépendante de la taille chez *Crepidula fornicata* sous certaines conditions (jeûne et manipulation chimique). Coon *et al.* (1990) ont montré que la compétence des larves de *Crassostrea gigas* est corrélée avec la taille mais peut être obtenue plus tôt par des manipulations




chimiques. Dans ce chapitre, les larves ont été mises en fixation dans des conditions d'élevage non sélectives, sans aucun inducteur de métamorphose. A chaque opération de tamisage les individus les plus petits ont été remis dans le bac d'élevage larvaire où aucune fixation n'a eu lieu malgré le fait que le GRP soit reconnu comme étant un substrat très favorable pour les larves de *C. gigas* (Holliday, 1996; observations personnelles). De plus, les larves retenues par le tamis ($> 280 \mu\text{m}$) se sont fixées rapidement lorsqu'elles étaient placées dans le bac avec les plaques collectrices. Ces observations sont compatibles avec une fixation dépendante de la taille plutôt que de l'âge dans les conditions de l'expérience. Par conséquent, l'hypothèse d'un lien étroit entre compétence à la métamorphose et la taille est supportée.

4.5. Une nouvelle méthode de fixation chez les bivalves marins

La fixation des larves sur des collecteurs plans permet de conserver toute la variabilité de taille des animaux. En effet, aucune compétition pour l'espace n'existe entre les individus après élimination des individus surnuméraires. De très forts taux de fixation et de survie ont déjà été obtenus avec des plaques de verre utilisées comme collecteur (*Ostrea edulis*, Rodriguez *et al.*, 1992) et des lames en PVC (*Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*, Hidu *et al.*, 1981). Des lames de PVC ont également déjà été utilisées comme méthode de croissance après fixation (Smith *et al.*, 1995; décrit également par Sheridan *et al.*, 1996). Des juvéniles étaient collés sur ces plaques par un ciment spécial. La croissance apparaît être plus efficace sur ce type de collecteur par rapport à la brisure ou à d'autres techniques traditionnelles, observation qui peut aisément s'expliquer par l'absence de compétition pour l'espace entre les individus. Sur de telles surfaces collectrices, la croissance est très homogène donnant une relation entre longueur et poids total très forte comme il a été observé sur des huîtres fixées sur des coquilles St Jacques élevées en laboratoire (Haley et Newkirk, 1978; Winter *et al.*, 1984; Toro et Newkirk, 1989; 1990). La forte variabilité de taille des individus venant d'être fixés (facteur entre 3 et 4) montre que les individus à forte croissance aussi bien que les individus à faible croissance ont les mêmes chances de survivre, ce qui n'est pas forcément le cas dans des systèmes de fixation utilisant la micro-brisure comme substrat. A la forte variabilité de la croissance inter-individuelle, s'ajoute une variabilité de la date de fixation des individus contribuant à la production d'une population génétiquement très variable. L'automatisation du suivi de croissance dès les stades très précoces par analyse d'image peut également être envisagée sur ce type de collecteurs. D'autre part, le détachement et le marquage des animaux, opérations en général stressantes, possibles uniquement sur des individus âgés de plusieurs mois, peuvent ici se faire très tôt (dès le stade 1 à 2 cm de long) grâce à la couche de paraffine séparant PVC et résine.

Toutes les étapes d'élevage de la population de référence, de l'échantillonnage des géniteurs jusqu'aux conditions d'élevage des descendants, ont été effectuées sans sélection et en maintenant des conditions d'élevage optimales. De nombreuses études antérieures ont été effectuées chez différentes espèces dans le but de trouver un moyen de sélectionner les individus à fort potentiel de croissance aussi précocement que le stade larvaire. Les résultats présentés dans ce chapitre montrent une relation significative et positive entre la croissance post-larvaire précoce et la croissance chez *Crassostrea gigas* dans des conditions d'élevage d'une éclosérie expérimentale. Ce résultat est certainement une caractéristique très importante pour la sélection d'individus à des stades précoces. La caractérisation génétique des différents groupes de tamisage serait d'un intérêt important. Les résultats présentés justifient les pratiques d'éclosérie, à savoir l'élimination des larves les plus petites par tamisage. L'importance de la croissance aux stades précoces pour la croissance future chez *Crassostrea gigas* est considérable, et il est probable que les différentiels de croissance observés aux stades juvéniles et adultes soient la conséquence directe d'une différenciation des individus aux stades précoces. L'analyse de la croissance aux stades plus avancés (chapitre 2 et 3) apportera des éléments de réponse et de discussion.

Bilan - Synthèse

-  Production d'une population expérimentale de référence à large base génétique chez *Crassostrea gigas*
-  Séparation de lots d'individus ayant des croissances larvaires et des dates différentes de fixation
-  Effet positif de la croissance larvaire sur la croissance après métamorphose chez *Crassostrea gigas*

CHAPITRE 2

**Analyse de la croissance en milieu contrôlé
du stade naissain au stade adulte: stabilité des performances de
croissance au cours d'un cycle annuel et incidence de la mortalité chez
*Crassostrea gigas***

1. Introduction

La croissance, la survie juvénile et la résistance aux maladies sont des caractères reconnus comme étant les plus importants en aquaculture. La vitesse de croissance d'un organisme est la résultante d'un grand nombre de paramètres physiologiques, environnementaux et génétiques. Différents travaux montrent que, chez l'huître creuse comme chez la plupart des bivalves marins, il existe entre les individus une variabilité pour la croissance très forte aussi bien en conditions contrôlées que dans le milieu naturel (Medcof, 1961; Galtsoff, 1964; Haley et Newkirk, 1977; Singh et Zouros, 1977; 1978; Singh, 1978; 1979; Zouros *et al.* 1980). En effet, la vitesse de croissance chez l'huître est fortement influencée par des facteurs environnementaux mais une part significative de la variabilité individuelle serait d'origine génétique. Jarayabhand et Newkirk (1989) ont ainsi montré que la croissance chez *Ostrea edulis* était fortement dépendante de la compétition intraspécifique. Newkirk *et al.* (1977) ainsi que Haley et Newkirk (1977) ont estimé des héritabilités élevées pour la taille respectivement chez *Crassostrea virginica* et *Ostrea edulis* et ont conclu qu'il y avait une forte composante génétique dans la vitesse de croissance chez les huîtres. Envisager l'amélioration génétique d'une espèce sur un critère de vitesse de croissance sujet à de telles variations en fonction du milieu, implique des études préalables dans des conditions d'élevage les plus constantes possibles, en éclosion expérimentale.

Cette variabilité observée pour la taille à une date donnée chez des animaux de même âge est la conséquence d'une forte variabilité pour la vitesse de croissance. Chez l'huître, la taille commerciale est atteinte sur les côtes Atlantiques françaises après 24 à 36 mois de croissance selon la quantité de nourriture disponible dans l'environnement. Ainsi, une des difficultés majeure de l'amélioration génétique des huîtres est de pouvoir identifier les individus performants pour la croissance au stade le plus précoce possible. De plus, en éclosion, les effectifs des stades jeunes (larves et naissain) sont considérables ce qui permet d'appliquer des pressions de sélection très fortes et faciles à mettre en œuvre (simple tamisage en nurserie). Ce type de sélection est en fait la pratique courante en éclosion mais ne repose sur aucun résultat publié à ce jour et ne peut être efficace que si le caractère précoce utilisé pour la sélection est corrélé positivement avec ce même caractère à taille commerciale ou du moins ultérieurement. Par ailleurs, des vitesses de croissance très variables affectent l'efficacité de production en augmentant la manipulation des animaux et donc le stress, et en diminuant la possibilité de prédire précisément le résultat économique. Ces problèmes sont limités dans la pratique par l'élimination des animaux à faible croissance des systèmes de production.

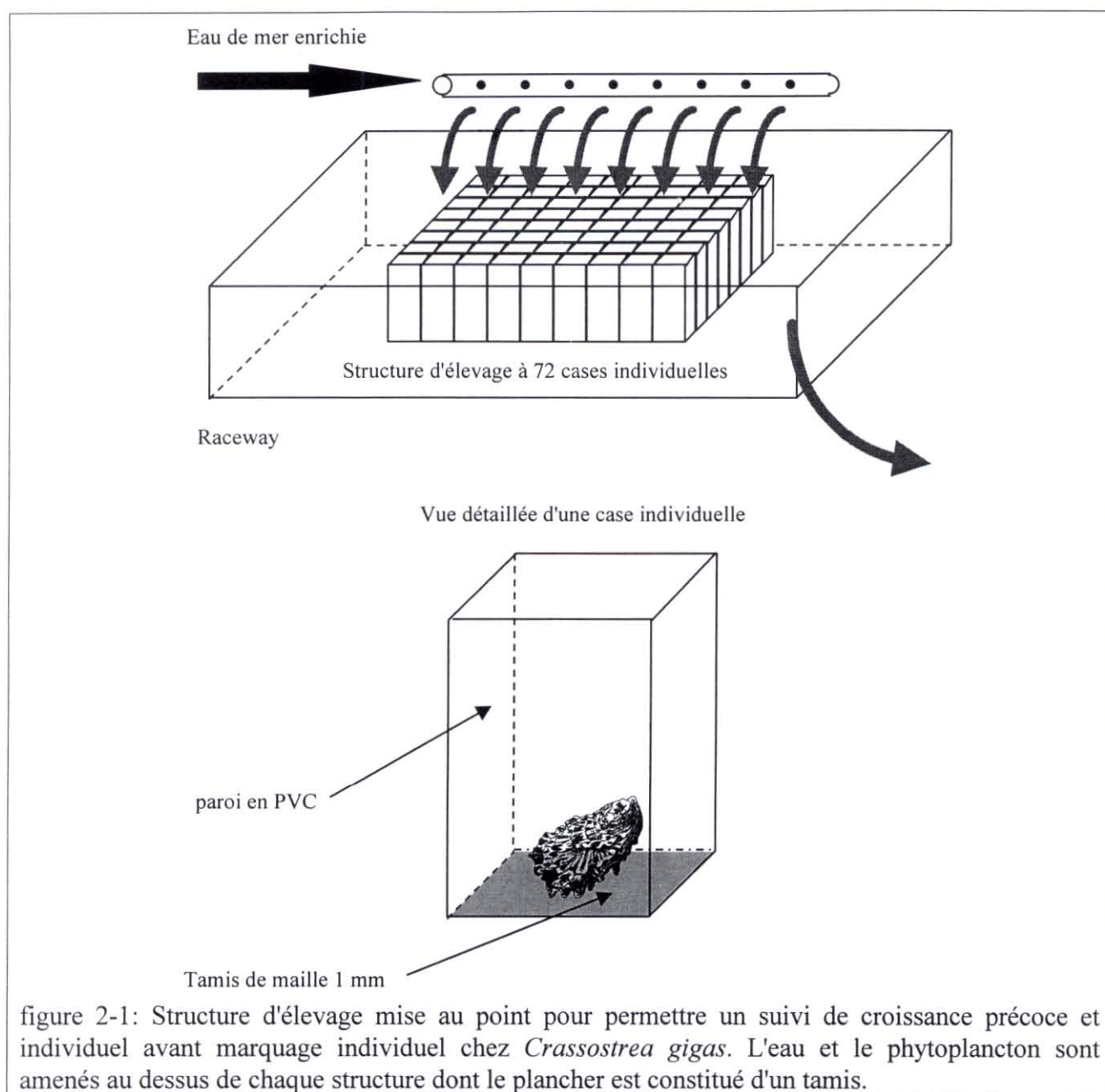
Très peu de travaux sur la croissance se basent sur des données individuelles. La plupart des analyses porte sur la modélisation de la croissance individuelle (par exemple chez les poissons, Sainsbury, 1980; Hampton, 1991). Chez les espèces de bivalves à intérêt commercial, de nombreux travaux visent à caractériser des sites d'élevage vis à vis de la croissance moyenne d'une population d'individus dans le but d'accroître la rentabilité d'un élevage (Stirling et Okumus, 1995; Puigcerver, 1996) ou à comparer la croissance de deux espèces (Mallet et Carver, 1995). Ces études s'appuient sur des comparaisons globales de la croissance de populations. Quelques expérimentations concernant des programmes d'amélioration génétique de la croissance nécessitent le marquage individuel des animaux (*Ostrea chilensis*, Toro *et al.*, 1995; 1996b; *Tapes decussatus*, Puigcerver, 1996) et parfois la croissance individuelle est prise en compte (Baud *et al.*, 1997).

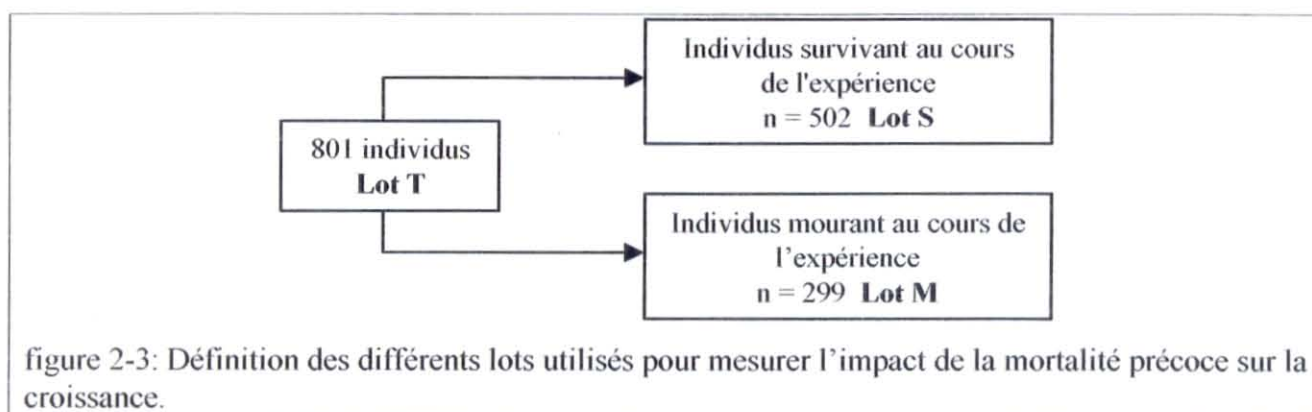
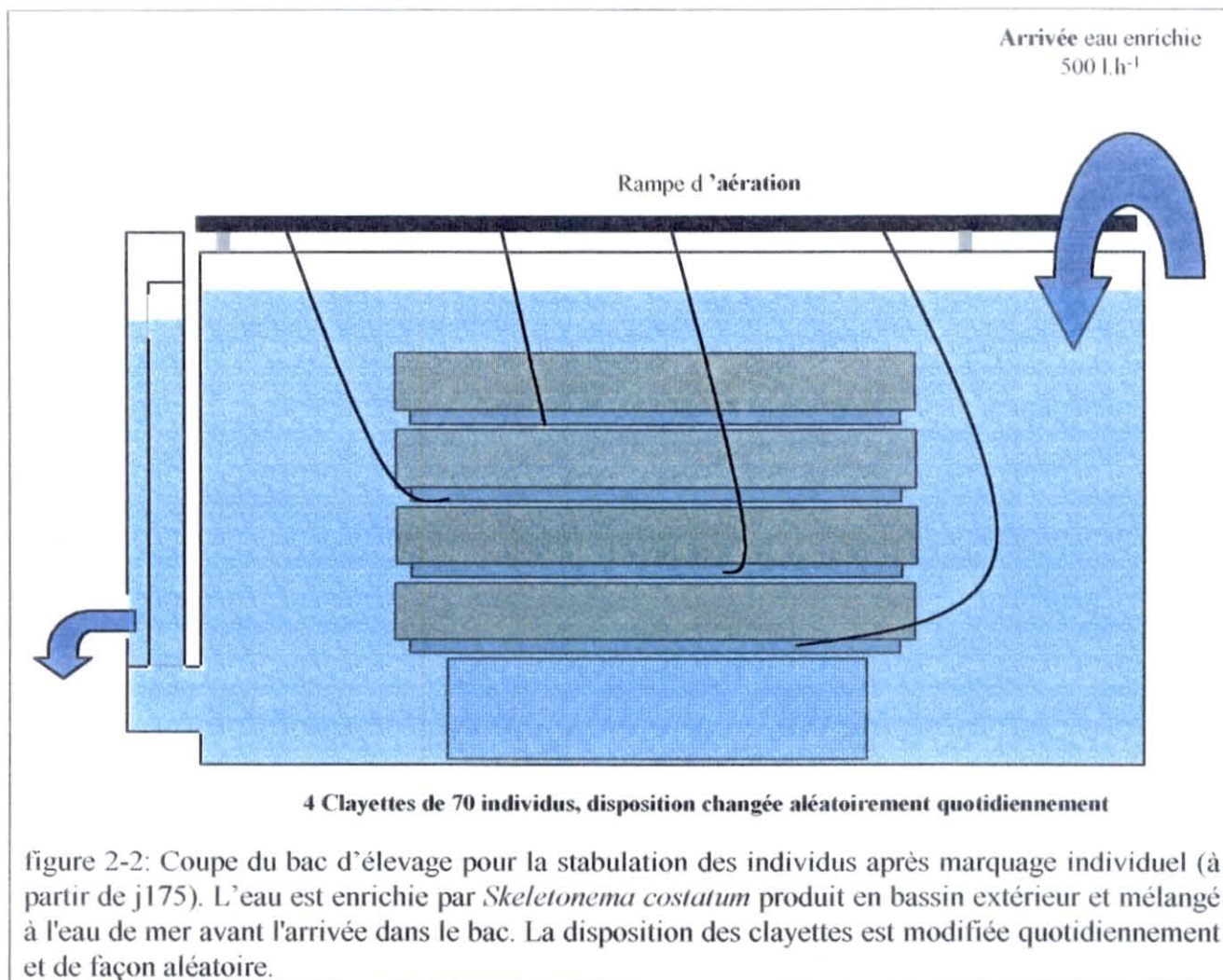
Au chapitre 1, la corrélation entre la croissance des larves et du naissain a été étudiée, mettant en avant l'importance de la forte croissance des stades jeunes pour la croissance future. Dans ce chapitre, la croissance individuelle d'un échantillon de différentes populations obtenues en laboratoire a été suivie régulièrement au cours du temps pendant 11 mois. L'impact de la croissance juvénile sur la croissance adulte est étudiée. L'effet de la mortalité sur la croissance ainsi que la corrélation entre croissance précoce et croissance tardive sont analysés et discutés.

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériel biologique

Un échantillon de 200 individus issus des croisements intra-population (chapitre 1) ont été pris au hasard: Arcachon x Arcachon (arc), Bonne Anse x Bonne Anse (ba), Port des Barques x de Port des Barques (pdb) et Seudre x Seudre (seu). Le quatrième groupe de tamisage (SG4, défini au chapitre 1) a été utilisé et sera noté sg4. Les modalités de croisement, d'élevage larvaire, de micro-nurserie et d'obtention des groupes de tamisage sont détaillées dans le chapitre 1. Le choix de ce groupe de tamisage plutôt qu'un autre a été motivé par la date de fixation qui coïncide avec celle des quatre autres lots. Chaque lot n'est pas une population au sens strict. On emploiera dans la suite le terme "population" par simple commodité. Le temps est noté jX, avec X le nombre de jours après la fécondation (chapitre 1). Tous les individus ont été identifiés précocement au 91^{ème} jour après fécondation (j91) grâce à des structures d'élevage à 72 micro-casiers où chaque animal est disposé dans une cellule individuelle (figure 2-1). L'eau de mer et la nourriture arrivent en continu par une rampe au dessus de chaque structure avant d'être évacuées du raceway. Un tamis constitue le plancher de la structure.





Les animaux ont été identifiés par leur coordonnées dans la structure par un code à 6 caractères avec les deux premiers caractères identifiant la structure et les 4 caractères suivants identifiant la position de l'individu dans la structure. Les microstructures ont été disposées dans des raceways alimentés en eau de mer préalablement filtrée et enrichie à deux reprises par *Skeletonema costatum* produit en bacs extérieurs et un mélange d'*Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* et *Pavlova lutheri* produits en monoculture en intérieur. La température fluctuait avec celle du milieu

naturel (Estuaire de la Seudre). Dès que les animaux ont été assez gros, à j170 environ, ils ont été marqués de manière classique par étiquetage à la colle epoxy puis transférés dans des bacs d'élevage de 800 l à raison de environ 70 individus par clayette et 4 clayettes par bac avec un renouvellement de 500 l.h⁻¹ (figure 2-2).

2.2 *Suivi de croissance et de mortalité*

Les animaux ont été pesés toutes les semaines au dixième de gramme près à partir du 91ème jour après la fécondation (Balance Sartorius). Quotidiennement, les individus morts ont été identifiés puis immédiatement enlevés du bac d'élevage. Après chaque pesée, les animaux sont regroupés puis redistribués de façon aléatoire entre les clayettes, elles mêmes disposées de façon aléatoire dans les bacs de 800 l (figure 2-2). Une macro Excel a été développée en Visual Basic pour les traitements préliminaires et la réorganisation des données (voir annexe 7).

Pour estimer l'impact de la mortalité sur la croissance individuelle, l'ensemble des individus est séparé en deux sous ensembles: les individus qui survivent tout au long du suivi de croissance (lot S) et les individus qui meurent en cours de suivi (lot M) (figure 2-3).

2.3 *Analyses statistiques*

Les résultats ont été analysés par le logiciel statistique SAS (SAS 6,12 SAS Institute, 1988). Les vitesses de croissance sont calculées par régression linéaire simple et analysées par la procédure SAS. Les données de survie sont analysées par test G (Sokal et Rohlf, 1995, p 738). Le coefficient de corrélation de Kendall a été utilisé pour l'analyse de corrélation des rangs (Sokal et Rohlf, 1995, p 594). L'analyse de l'effet de la population et de la mortalité sur la croissance a été faite par analyse de covariance (SAS Proc GLM), à l'aide du modèle suivant:

$$\text{Poids total} = \alpha + \beta_1.\text{POP} + \beta_2.\text{SET} + \beta_3.\text{DPF} + \varepsilon$$

POP est la population (arc, ba, seu, pdb ou sg4), SET est l'appartenance au lot (S ou M, figure 2-3) et DPF est le nombre de jours après fécondation, variable de temps continue. Les comparaisons multiples ont été faites par la méthode de Duncan.

3. Résultats

3.1 *Analyse de la variabilité et de l'effet de la mortalité*

Le coefficient de variation du poids total initial est de 72,6 % avec un facteur 350 entre le plus petit individu (0,01 g) et le plus gros (3,53 g). Le coefficient de variation diminue brutalement entre j91 et j119 pour se stabiliser autour de 45 %. A la fin du suivi de croissance (j307), un facteur

13 sépare le plus petit individu (3,35 g) du plus gros (44,62 g).

Au cours des 11 mois de suivi de croissance, un épisode précoce de mortalité a été détecté entre le départ du suivi (j91) jusqu'à environ 20 semaines (j119). Les effectifs initiaux (lot T) étaient de 193 pour la population d'Arcachon, 237 pour la population de Bonne Anse, 238 pour la population de Port des Barques, 133 pour la population de la Seudre et 208 pour le 4^{ème} groupe de tamisage. L'effet de la population sur le taux de survie cumulé (pourcentage de survivants à une date donnée par rapport à l'effectif initial) à j307 est très significatif (test G: $\chi^2 = 28,4$; $P < 0,0001$; figure 2-4) et le taux de survie, après une chute initiale, se stabilise à 56,0 % pour Arcachon, 82,7 % pour Bonne Anse, 75,5 % pour le 4^{ème} groupe de tamisage, 63,9 % pour la Seudre et 47,5 % pour Port des Barques alors qu'il atteint 65,3 % pour la totalité des individus (figure 2-4).

La comparaison des lots M et S, définis à la figure 2-3, montre que les individus du lot M sont significativement plus petits en moyenne que les individus du lot S au début du suivi (Analyse de covariance, $F = 3237,2$; $P < 0,0001$; figure 2-5). Les résultats de l'analyse par date de mesure sont regroupés au tableau 2-1 et montrent que l'impact de la mortalité sur le poids total est significatif de j91 à j112. Après j112, les lots M et S ne sont pas significativement différents (excepté pour j293), mais le poids total moyen du lot M est constamment plus élevé que celui du lot S, entraînant donc une inversion de l'effet de la mortalité sur la croissance (figure 2-5).

La vitesse de croissance de chaque individu a été calculée entre le j91 et le j154 par régression linéaire (F moyen sur tous les individus = 589,4; $p < 0,001$ pour tous les individus; R^2 moyen = 0,97). Pour les individus morts entre j91 et j154, la vitesse de croissance a été estimée sur les points de mesure disponibles. La vitesse de croissance moyenne des individus du lot M est de $0,078 \pm 0,094 \text{ g.j}^{-1}$ alors qu'elle est de $0,131 \pm 0,063 \text{ g.j}^{-1}$ pour les individus du lot S. L'effet de la mortalité sur la dispersion des poids totaux est illustrée à la figure 2-6. Le coefficient de variation a été calculé sur les individus du lot T, du lot S et du lot M. Le coefficient de variation montre une évolution dans le temps très différente entre les 3 lots avec une valeur initiale plus faible pour le lot S que pour le lot M (figure 2-6).

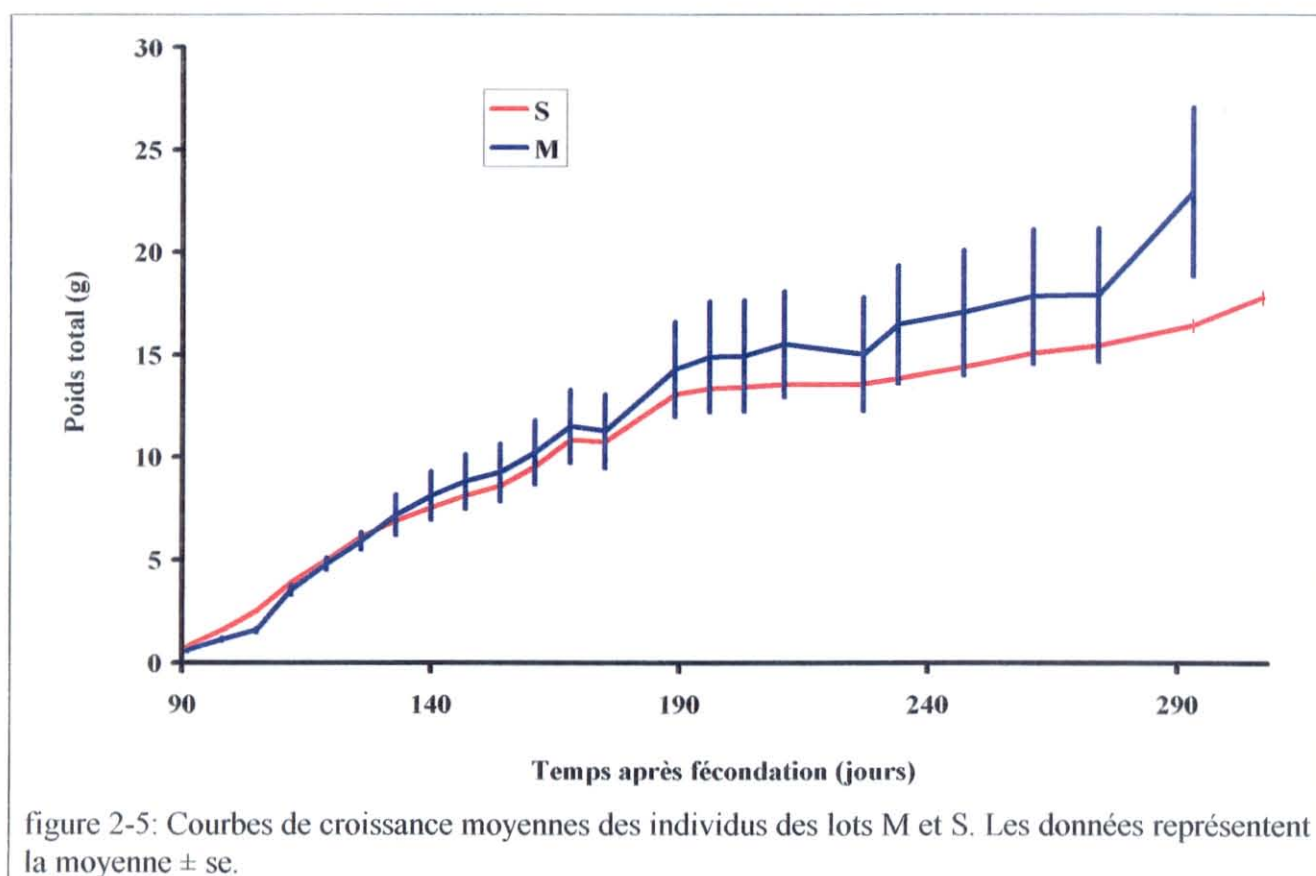
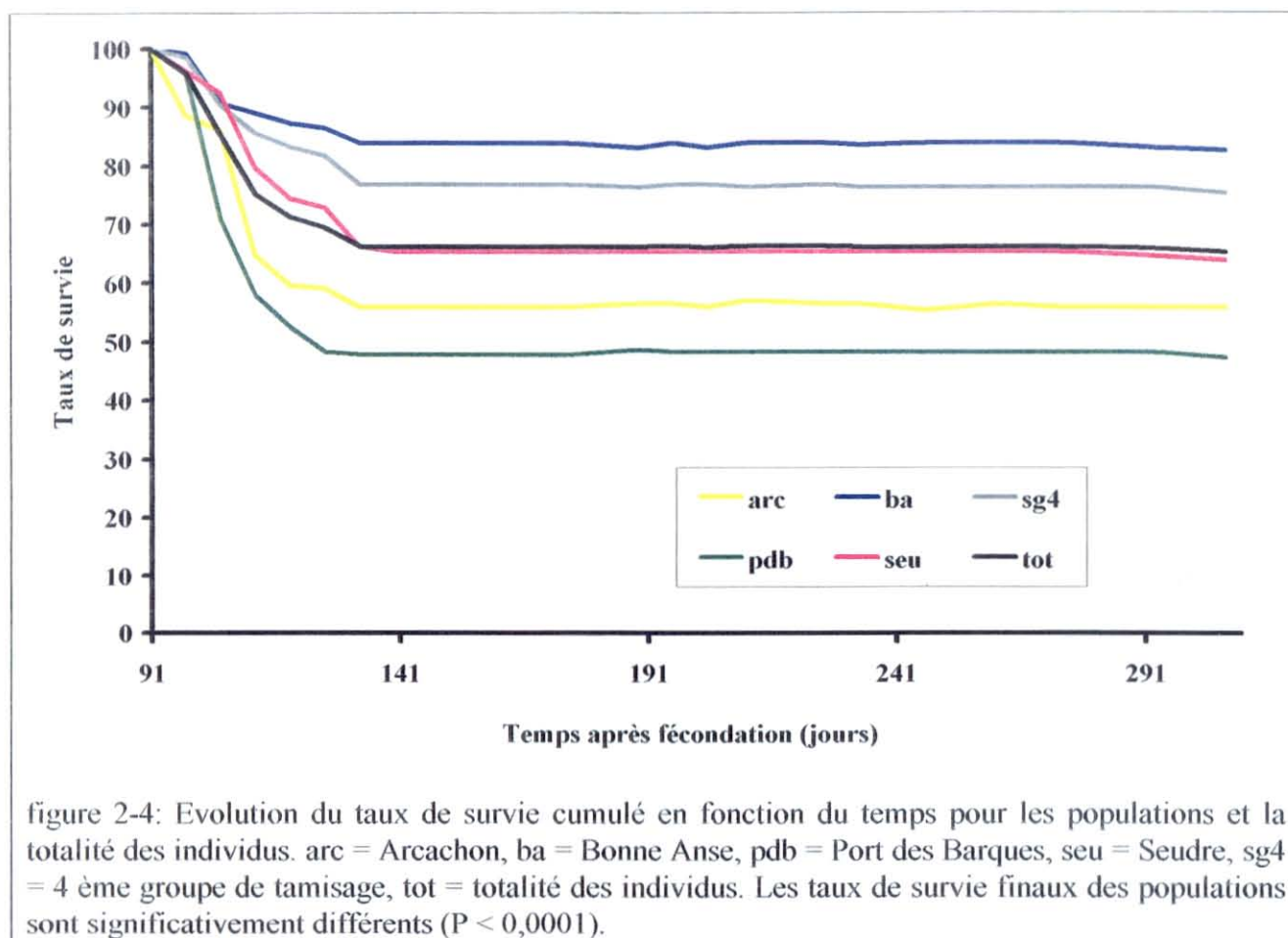


tableau 2-1: Analyse statistique de l'effet de la mortalité sur le poids total moyen des animaux par jour de mesure: analyse de variance à deux facteurs (POP = population, SET = lot M ou S). DPF = temps après fécondation en jours, statistique F et probabilité pour le modèle.

modèle					modèle				
DPF	POP	SET	F	P	DPF	POP	SET	F	P
91	0,0001	0,0001	52,02	0,0001	175	0,0001	0,6598	33,71	0,0001
98	0,0001	0,0001	55,3	0,0001	189	0,0001	0,4743	33,26	0,0001
105	0,0001	0,0001	60,11	0,0001	196	0,0001	0,3315	32,51	0,0001
112	0,0001	0,0161	46,66	0,0001	203	0,0001	0,3460	31,4	0,0001
119	0,0001	0,3598	41,29	0,0001	211	0,0001	0,1574	30,53	0,0001
126	0,0001	0,6235	44,25	0,0001	227	0,0001	0,3768	31,83	0,0001
133	0,0001	0,7240	40,22	0,0001	234	0,0001	0,2043	32,28	0,0001
140	0,0001	0,4874	39,61	0,0001	247	0,0001	0,1056	31,08	0,0001
147	0,0001	0,4520	37,21	0,0001	261	0,0001	0,1936	30,02	0,0001
154	0,0001	0,4922	36,18	0,0001	274	0,0001	0,2552	29,01	0,0001
161	0,0001	0,5168	35,74	0,0001	293	0,0001	0,0102	27,81	0,0001
168	0,0001	0,5856	33,66	0,0001	307	0,0001	-	29,9	0,0001

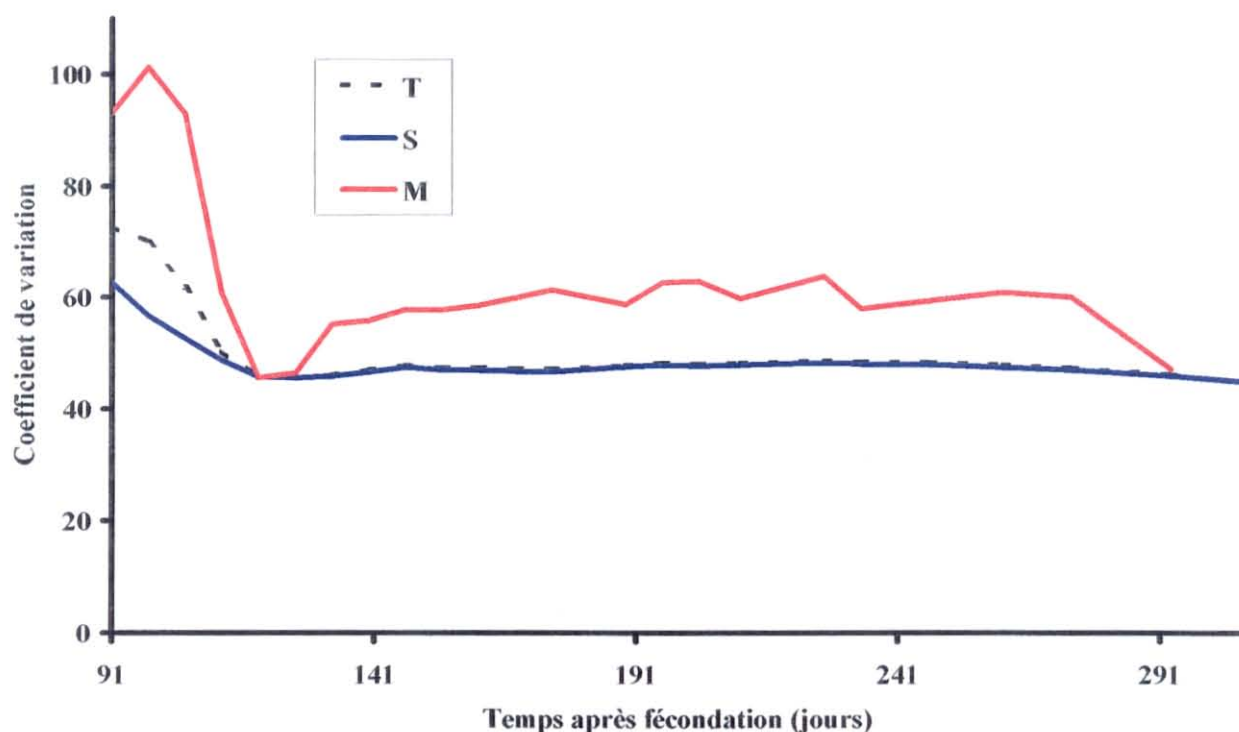


figure 2-6: Evolution du coefficient de variation au cours du temps du poids total des individus des lots S, M et T.

L'analyse a ensuite été détaillée par population pour évaluer l'effet de l'origine des parents sur la relation entre croissance et mortalité. L'ensemble des individus a été analysé par population et par lot (S ou M). Les cinétiques de croissance des lots S et M pour chacune des populations révèlent un comportement particulier de Port des Barques (figure 2-7C). En effet, dans cette population, il n'y a pas l'inversion de l'effet de la mortalité sur le poids total moyen mis en évidence sur l'ensemble

des individus (figure 2-5) et sur les 4 autres populations. D'autre part, cette population a eu le plus de mortalité (effectif initial = 238, 125 appartenant au lot M et 113 au lot S, donnant un taux de survie de 47,5 %; figure 2-4).

L'analyse statistique globale montre un effet significatif de la population ($p < 0,001$) et de la mortalité ($p < 0,001$) avec une interaction significative ($p < 0,001$) entre ces deux facteurs sur le poids total ($p < 0,0001$). Dans les populations Arcachon, Bonne-Anse, 4^{ème} groupe de tamisage et Seudre, on retrouve les résultats de l'analyse globale entre j91 et j105, les individus qui meurent au cours du suivi étant significativement plus petits que les survivants (tableau 2-2). Cependant, entre j105 et j293, excepté pour la population de Port des Barques, l'effet de la mortalité montre une tendance inverse, les survivants étant en moyenne systématiquement plus petits que les individus qui meurent. Ceci n'est qu'une tendance (non significative) pour les populations de Bonne-Anse, Seudre et Arcachon mais est statistiquement significatif pour la population sg4 (tableau 2-2).

3.2 Effet de la population parentale sur le taux de croissance

L'analyse de covariance montre qu'il existe un effet très significatif de la population sur la croissance ($F = 3232,9$; $p < 0,0001$). Deux groupes sont significativement différents (test multiple de Duncan): un premier groupe à faible croissance est constitué des individus issus des populations sg4 et arc, un second groupe à forte croissance étant constitué des individus issus des populations ba, pdb et seu (figure 2-8). Cependant, il n'y a pas d'association significative entre le taux de survie et le taux de croissance (test de rang, coefficient de Kendall $\tau = 0$; NS). La croissance entre j91 et j147 est linéaire et la vitesse de croissance de chaque individu a été calculée par la pente de la régression linéaire (F moyen sur tous les individus = 589,4; $p < 0,001$ pour tous les individus; R^2 moyen = 0,97). La moyenne pour l'ensemble des individus est de $138,74 \pm 2,56 \text{ mg.j}^{-1}$. La population parentale affecte significativement la vitesse de croissance précoce ($F = 41,6$; $p < 0,001$; figure 2-9).

3.3 Conservation du taux de croissance au cours du temps

La corrélation entre le poids total à 91 et 307 jours après fécondation est significative ($F = 399,02$ $p < 0,0001$; figure 2-10). Cependant, moins de 40 % du poids total final est expliqué par le poids total initial ($r^2 = 0,378$). Le classement des individus est conservé dans le temps entre j91 et j307 (Coefficient de Kendall, $\tau = 0,46$; $t = 25,7$; $p < 0,0001$). D'autre part, la vitesse de croissance individuelle initiale estimée entre j91 et j147 est très significativement corrélée au poids total final à j307 ($F = 426,9$; $p < 0,001$; figure 2-11) et l'explique à plus de 70 % ($R^2 = 0,73$).

La croissance spécifique (pourcentage de croissance relative à la taille initiale) a été calculée

entre j91 et j147 et entre j203 et j307 (figure 2-12 A et B); elle montre une relation négative en fonction du poids total initial. Ainsi, les petits individus ont un gain de poids relatif à leur poids initial plus petit que les gros individus. Cette tendance est plus forte aux stades jeunes qu'aux stades plus avancés (coefficient de - 0,037 entre j91 et j147 et de - 0,0061 entre j203 et j307).

4. Discussion

4.1 Variabilité pour la vitesse de croissance

Les descendants des croisements 5X5 et 20X20 n'ont subi aucune compétition interindividuelle du stade larvaire au stade de 1 an. De telles conditions ont été maintenues pour les stades plus tardifs, naissain et juvénile, par des dispositifs d'élevage en casiers individuels, puis par un contrôle strict de la densité d'élevage. La forte variabilité de taille observée entre les individus est due principalement aux performances intrinsèques des animaux et non aux variations du milieu comme c'est le cas, au moins partiellement, dans les populations issues du milieu naturel. Les conditions d'élevage ont été optimisées pour la croissance et les individus les moins performants ont pu néanmoins exprimer tout leur potentiel ce qui n'aurait pas été le cas dans le milieu naturel. Cette procédure a permis de générer une variabilité considérable pour la taille avec un facteur de 300 entre le poids total du plus petit et celui du plus gros individu.

Chez les populations d'huîtres creuses obtenues en éclosérie, de même âge et maintenues dans des conditions environnementales identiques, il est courant d'observer une très forte diversité de taille même lorsque aucune précaution particulière n'est prise pour préserver la diversité (Singh et Zouros, 1978; Fujio *et al.*, 1979). Dans les écloséries privées, la pratique courante est la réduction de cette variabilité à tous les stades de développement pour des raisons techniques et économiques. Malinowski (1988) a pu évaluer précisément l'intérêt économique de l'élimination du naissain de *Mercenaria mercenaria* de petite taille dans une éclosérie. Dans les écloséries d'huîtres, les larves sont tamisées à différentes étapes de leur développement pour deux principales raisons: réduire la période de fixation au maximum pour éviter de prolonger les manipulations de larves, obtenir des lots les plus homogènes possibles et éviter une compétition entre individus trop importante (impact de la compétition trophique sur différentes classes de taille: voir chapitre 3). Cette dernière pratique repose sur la relation positive démontrée au chapitre 1 entre croissance larvaire et croissance du naissain. La densité affectant la croissance chez de nombreuses espèces de bivalves (*Crassostrea gigas*: Neudecker, 1981; *Mercenaria mercenaria*: Rawson et Hilbish, 1990), il est donc important pour exprimer le maximum de la variabilité inhérente à une population de pratiquer un élevage sans compétition spatiale. Les individus ont ainsi été fixés sur brisure à des densités faibles et avec des

quantités de phytoplancton en excès, limitant la compétition pour la nourriture entre les individus.

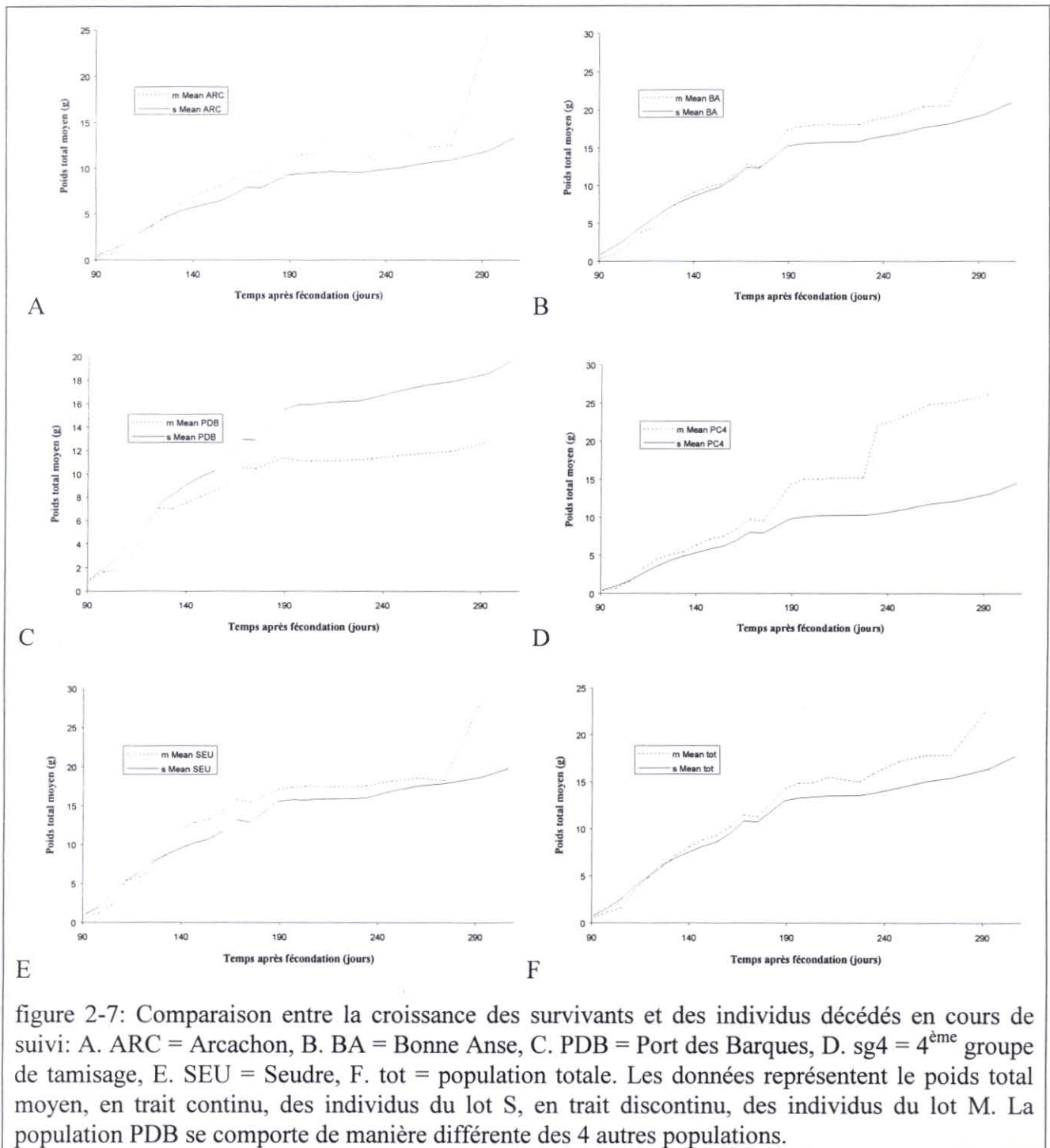


tableau 2-2: Effet de la mortalité sur le poids total testé par population (POP) et par date de mesure (DPF). Seules les dates et les populations pour lesquelles un effet de la mortalité sur le poids total est significatif à 5 % ont été représentées.

POP	DPF	P	POP	DPF	P
arc	91	0,0012	sg4	91	0,0023
	98	0,0001		98	0,0012
	105	0,0001		112	0,0383
	293	0,0388		119	0,0443
ba	91	0,0001		234	0,0045
	98	0,0001		247	0,0038
	105	0,0210		261	0,0031
seu	91	0,0001		274	0,0036
	98	0,0001		293	0,0045
	105	0,0002	pdb	105	0,0001
				112	0,0001

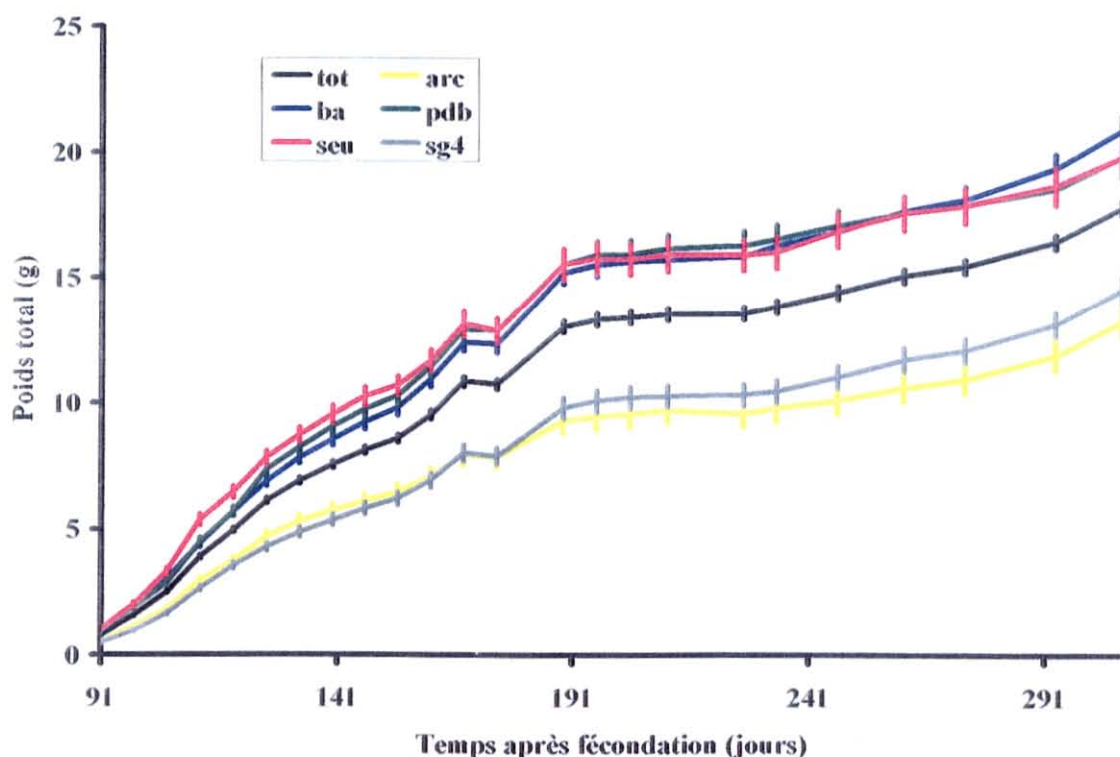


figure 2-8: Cinétique de croissance des individus issus des croisements intra population 5X5 entre j91 et j307 (arc = Arcachon n = 108, ba = Bonne Anse n = 196, pdb = Port des Barques n = 113 et seu = Seudre n = 85) et du 4^{ème} groupe de tamisage issu du croisement complet 20X20 (sg4 n = 157). Les données représentent la moyenne \pm SE.

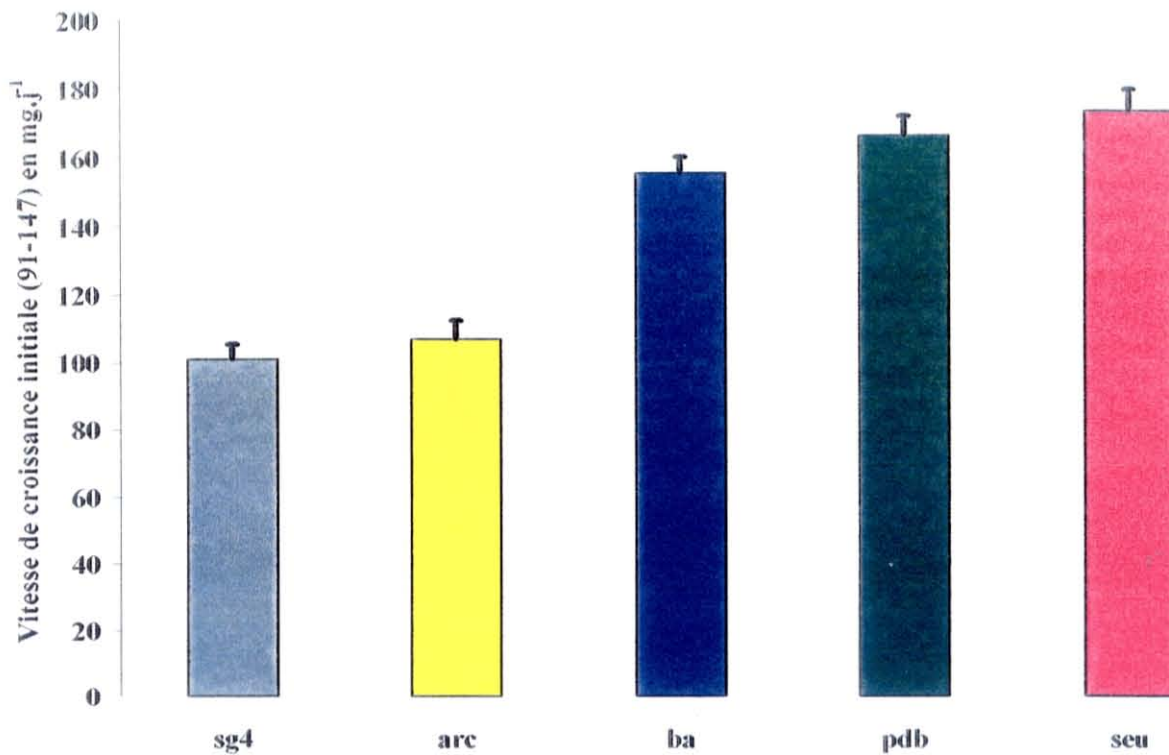


figure 2-9: Taux de croissance moyen (moyenne \pm SE) par population, estimé entre j91 et j147. Deux groupes sont significativement différents: sg4 + arc et ba + pdb + seu.

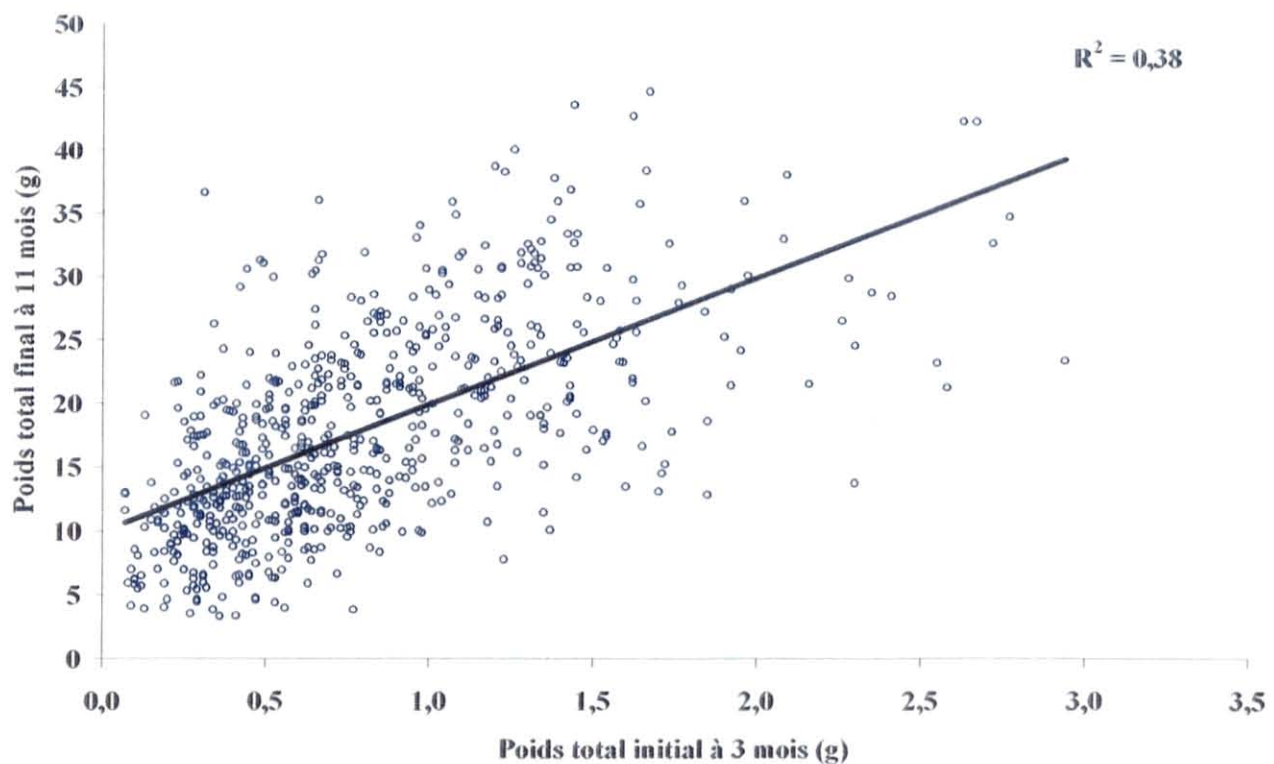
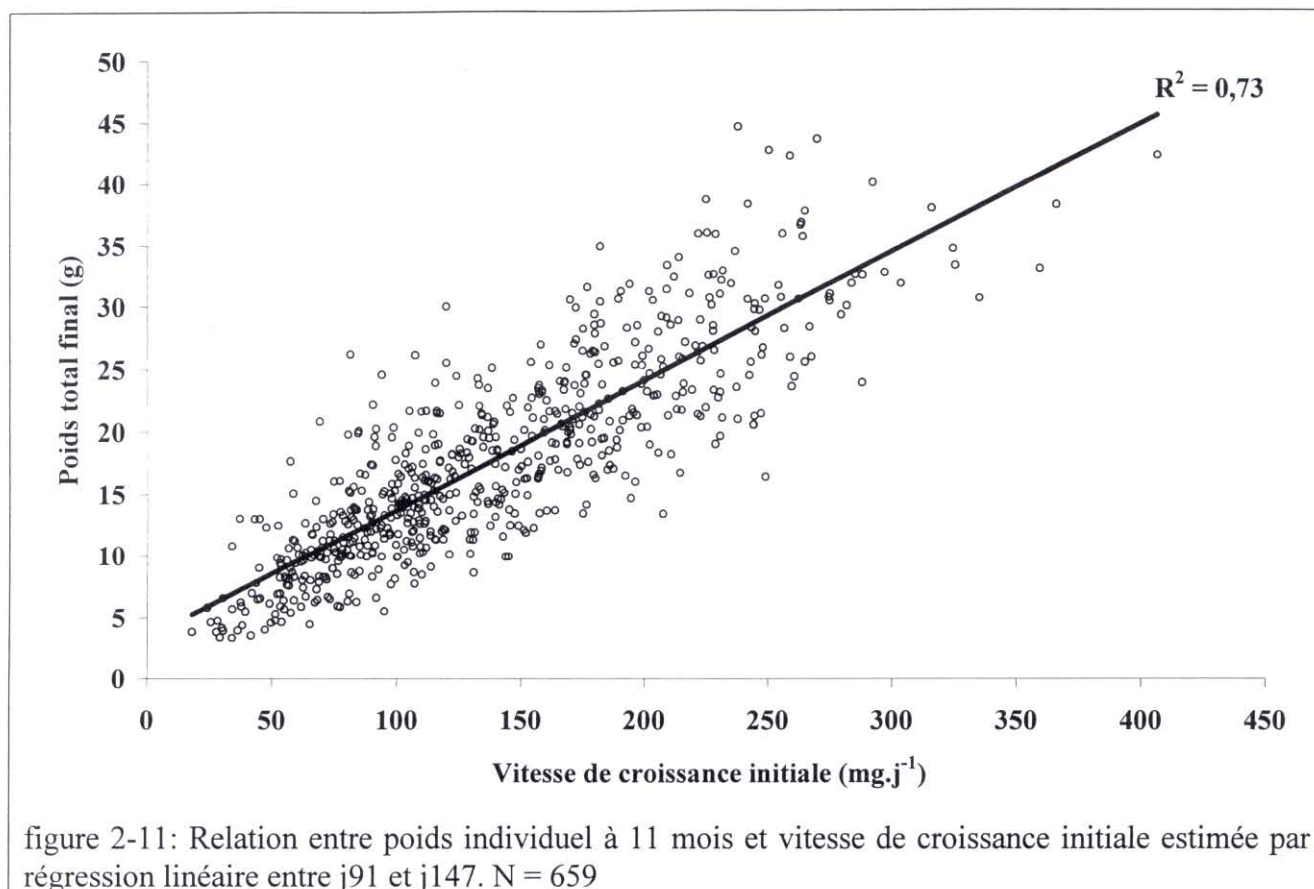
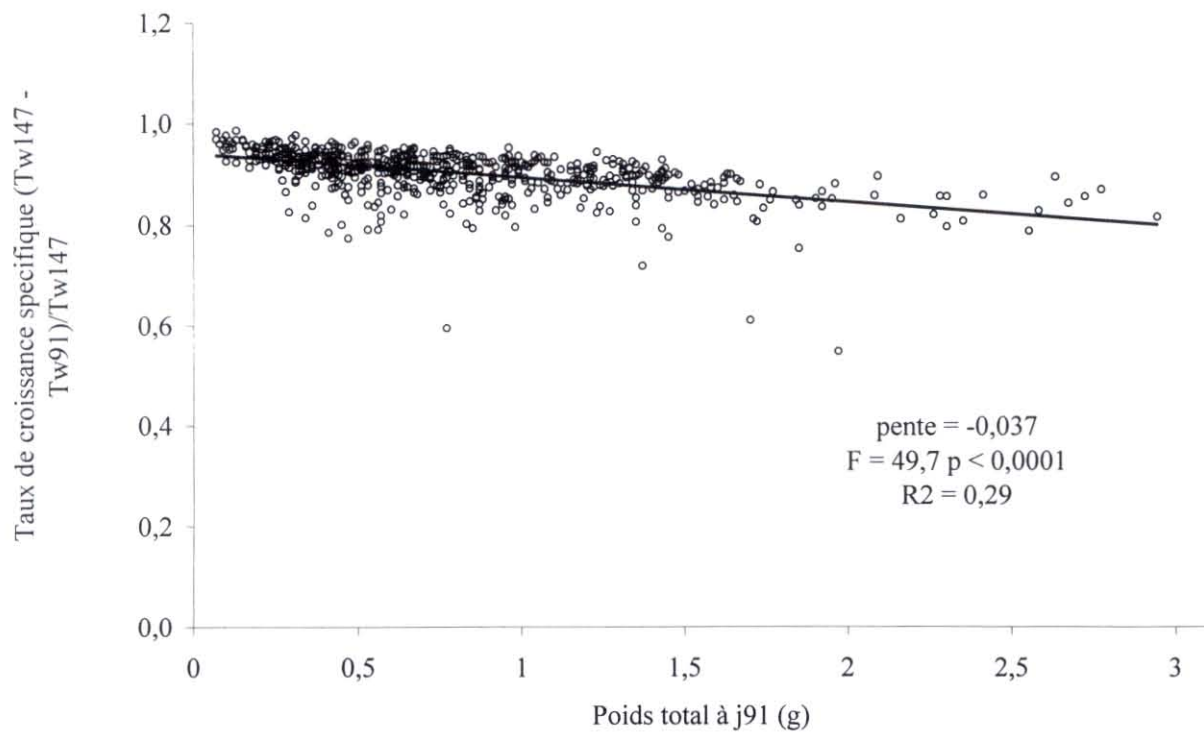


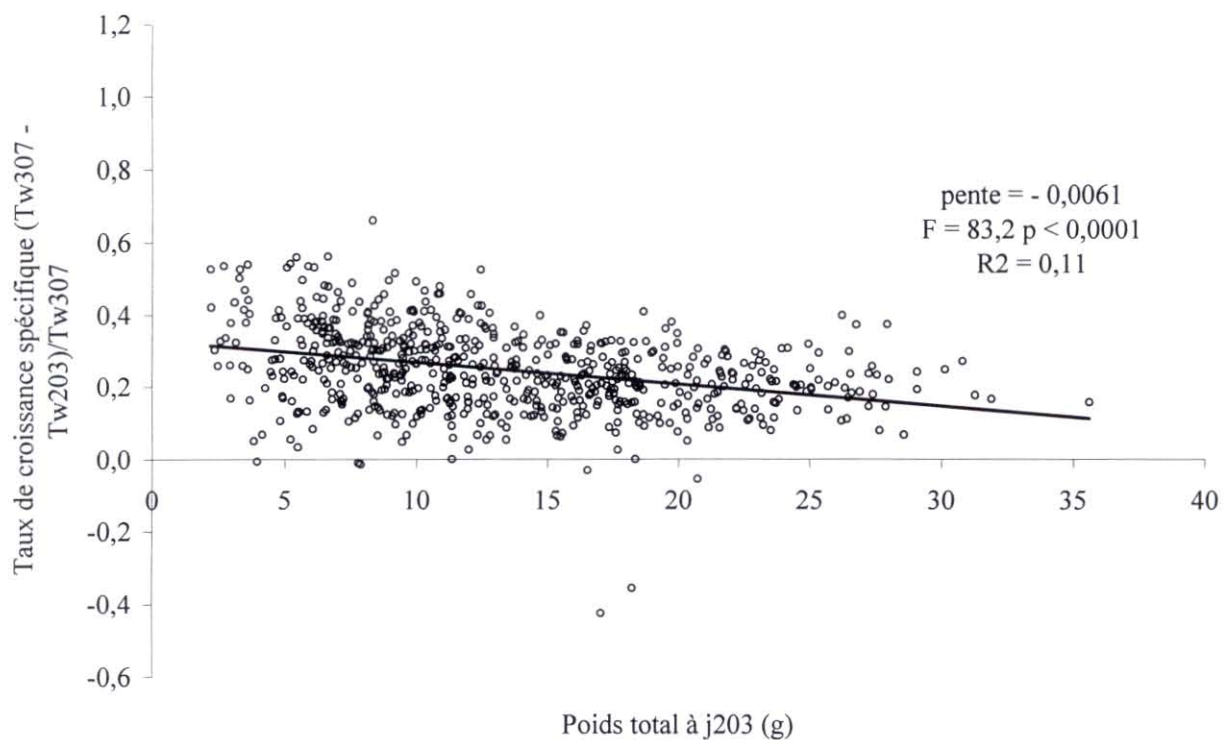
figure 2-10: Relation entre poids individuel à 3 mois (j91) et à 11 mois (j307). N = 659



Par la suite, l'hétérogénéité éventuelle du milieu a été supprimée en changeant quotidiennement et de façon aléatoire la disposition des structures d'élevage dans les raceways. Ces structures d'élevage particulières permettent de s'affranchir de toute compétition spatiale. Un système similaire avait été utilisé par Smith *et al.* (1995) et décrit par Sheridan *et al.* (1996; 1997) où l'importance des conditions de "voisinage" (compétition spatiale) pour la croissance est discutée. Il existe souvent au sein d'un même bac d'élevage des gradients de quantité de nourriture (Hadley et Manzi, 1984) et la position même de l'animal dans le bac influe sur la croissance (Sheridan, 1996). L'hétérogénéité pour la température et la quantité de nourriture sont les deux principaux facteurs affectant la croissance chez les bivalves (Laing, 1987); ces deux paramètres sont restés identiques pour l'ensemble des individus tout au long du suivi de croissance. Dans le milieu naturel, la variabilité des performances de croissance est la résultante d'un très grand nombre de facteurs à la fois environnementaux, physiologiques et génétiques. Uniformiser l'environnement permet d'augmenter la probabilité de révéler des différences de caractères déterminés génétiquement, comme la croissance. Les conditions de production des bivalves à intérêt commercial génèrent des variations environnementales entre les individus. Par conséquent, les méthodes d'élevage utilisées dans les programmes d'amélioration génétique se doivent de réduire au maximum les variations environnementales.



A



B

figure 2-12: A. Croissance spécifique (pourcentage du gain de poids j91-j147 par rapport au poids total final j147) en fonction du poids total initial (j91). B. Croissance spécifique (pourcentage du gain de poids j203-j307 par rapport au poids total final j307) en fonction du poids total initial (j203).

Différents auteurs obtiennent des valeurs de coefficient de variation du même ordre de grandeur (de 40 % à 60 %) que celles mesurées dans ce chapitre (*Ostrea edulis*: Newkirk et Haley, 1983; *Crassostrea virginica*: Singh et Zouros, 1978; 1981). L'évolution dans le temps du coefficient de variation sur la population montre une chute brutale aux stades précoces puis une stabilisation autour de 40 % (figure 2-6). Une baisse de coefficient de variation en fonction de l'âge des individus est mathématiquement explicable, mais ici on observe une chute brutale suivie d'une phase constante. Deux hypothèses peuvent être avancées pour interpréter ce phénomène. Il peut s'agir d'un artefact de mesure dû, soit à la faible sensibilité de la balance pour des animaux de poids total faible, soit à l'eau résiduelle après égouttage dont la masse peut être très importante relativement à la masse de l'animal. La seconde hypothèse est l'effet de la mortalité, discuté dans le prochain paragraphe. Une population exprimant une telle variation dans les performances de croissance obtenue dans des conditions environnementales strictement contrôlées est une base précieuse pour une sélection basée sur le taux de croissance précoce, représentatif du taux de croissance tardif.

4.2 La mortalité affecte la croissance

La mortalité observée dans cette population est probablement associée à la présence d'un virus de type herpès dont la présence a été détectée par diagnostic PCR (Renault, comm. Pers.). Ce type de mortalité a été détecté pour la première fois en France et Nouvelle Zélande en 1991 et est souvent associé aux températures élevées de l'eau de mer en été (Renault *et al.*, 1995). L'effet de la mortalité sur la croissance précoce (stade juvénile, 3-5 mois) s'oppose à son effet sur la croissance tardive (stade adulte, 5-11 mois): les individus de petite taille sont plus sujets à la mortalité précoce alors que ce sont les individus de grande taille qui sont plus sujets à la mortalité tardive. Seule la population Port des Barques se comporte différemment puisque les individus sujets à la mortalité sont de plus petite taille que les survivants (figure 2-7C). Le taux de survie est très fortement dépendant de la population. Cette mortalité précoce différentielle se répercute sur la variabilité de la distribution des tailles. En effet, la chute initiale du coefficient de variation est plus forte sur l'ensemble des individus survivants que sur les individus morts en cours de suivi (figure 2-6). Cette différence s'estompe un mois après le début du suivi, lorsque la mortalité s'arrête. Ces différences peuvent être également dues au fait que des individus aux stades très jeunes morts, avec les valves colmatées, ont pu être considérés comme vivants et pesés. L'étude bibliographique chez un grand nombre d'espèces marines benthiques non exploitées montre une relation positive entre le taux de croissance et le taux de mortalité (Brey et Gage, 1997). Il existe une relation positive entre la croissance et la mortalité, démontrée empiriquement chez les poissons par Beverton et Hold (1959)

et Pauly (1980). Menzel et Hopkins (1955) ont étudié l'effet de l'infection de *Crassostrea virginica* par un champignon ou par un trématode sur la croissance, montrant que les individus non infectés par le champignon ont une croissance très retardée. Cependant, les individus infectés par le trématode ont une croissance plus forte que les individus non infectés. Ce résultat montre que la relation entre infection/mortalité et croissance n'est pas forcément négative. Certains travaux concernent l'effet du taux d'infection par des parasites et de l'état physiologique des individus (Exemple du parasite *Haplosporidium nelsoni* chez *Crassostrea virginica*: Barber *et al.*, 1991).

4.3 La population parentale influe sur le taux de croissance

Deux groupes significativement différents pour leur performance de croissance ressortent de l'analyse des cinétiques de croissance. Arcachon et la population sg4 constituent un groupe à faible croissance alors que Bonne Anse, Port des Barques et Seudre constituent un groupe à forte croissance. De nombreux résultats montrent que la taille d'un bivalve est un caractère héritable pour les stades précoces (larvaire: Lannan, 1972; Longwell et Stiles, 1973) et il n'est pas surprenant de trouver des différences de croissance entre ces populations.

4.4 Les taux de croissance se conservent au cours du temps

La mortalité n'affecte pas l'analyse de la stabilité dans le temps des performances de croissance étant donné qu'elle repose sur les données individuelles d'animaux survivants tout au long de l'expérience.

Dans notre expérience, nous avons démontré que plus de 80 % du poids total d'un individu de 11 mois peut être expliqué par sa vitesse de croissance estimée sur les premiers mois dans une population expérimentale de *Crassostrea gigas*.

De nombreuses tentatives ont été faites dans le passé pour prédire le poids d'un individu à taille commerciale à partir de sa taille à un stade précoce (Losee, 1978; Newkirk, 1981). Un tel résultat serait très important en aquaculture puisque cela permettrait de réduire le temps de génération dans les programmes d'amélioration génétique. La question principale qui est soulevée est l'existence de mécanismes de compensation pour la croissance, l'interaction négative entre la taille d'un individu et sa vitesse de croissance permettant aux animaux de petite taille de rattraper ceux de plus grosse taille. Le phénomène de compensation pour la croissance a été suggéré par Ricker, 1975 puis mis en évidence chez différentes espèces de bivalves (*Argopecten irradians* Auster et Stewart, 1984; *Mercenaria mercenaria* Eldridge et Eversole, 1982). Les études précédentes sur l'existence d'une relation entre croissance précoce et croissance tardive ne sont en

général pas concluantes (Newkirk, 1981; Malinovski, 1987; 1988; voir chapitre introductif). Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude de ce type n'a porté sur une population de bivalves obtenue en laboratoire avec un suivi individuel dans des conditions de densité et quantité de nourriture contrôlées. Ces conditions sont très particulières comparées aux conditions de production des écloséries où les densités sont particulièrement élevées. L'effet de la compétition trophique sur la croissance individuelle est étudiée au chapitre 3 et permet de se rapprocher des conditions d'une nurserie intensive.

Dans la plupart des écloséries, les individus à faible croissance sont éliminés, malgré la perte de matériel biologique que cela implique. En effet, les résultats présentés ici montrent que les individus à faible croissance au stade jeune resteront toujours à faible croissance dans des conditions de densité très faible et ne rattraperont jamais les individus de plus grosse taille. En d'autres termes, il n'existe pas de phénomène de compensation pour la croissance chez l'huître creuse dans les conditions de notre étude. Dans la première partie de l'expérience, les petits individus et les gros individus sont dans des conditions optimales de croissance en absence de toute interaction de "voisinage" et, même dans de telles conditions, les petits individus ont une vitesse de croissance qui reste faible. Ainsi, la taille de l'individu ne serait pas la résultante de facteurs externes de milieu mais bien déterminée par des facteurs endogènes.

Une conséquence de ce résultat est que la forte variabilité observée fréquemment chez les bivalves marins a une origine probablement précoce. Il est clair, sur les cinétiques de croissance, que les différences observées entre les populations sont apparues dans les premiers mois. La forte conservation du taux de croissance après cette période maintient ces différences tout au long de la première année.

Le degré avec lequel la taille est fonction de facteurs autres que génétiques, tels que des artefacts dans le système d'environnement de l'écloserie, détermine avec quelle précision la croissance d'un individu peut être prédite à partir de sa taille relative. Toro *et al.* (1995) ont trouvé des coefficients de corrélation (Spearman) importants entre le poids total et la longueur à 8 et 14 mois chez *Ostrea chilensis*.

En Octobre 1997, la totalité de la population faisant l'objet de notre travail a été transférée pendant un mois dans des bassins d'élevage extérieurs où la température et la qualité de l'eau sont celles de l'estuaire de la Seudre. Durant cette courte période, l'ordre des individus est resté inchangé et la relation entre croissance pré et post transfert reste significative et importante. Ceci est encore une conséquence de l'absence de mécanismes de compensation pour la croissance chez *Crassostrea gigas* dans les conditions de notre expérience, celles d'une écloserie expérimentale.

Bilan - Synthèse

- ☞ Stabilité temporelle très forte de la croissance: pas de compensation pour la croissance chez *Crassostrea gigas*, les petits individus restent petits. La croissance serait dépendante de facteurs endogènes et/ou génétiques.
- ☞ La mortalité affecte essentiellement les individus les plus petits.
- ☞ La vitesse de croissance est dépendante de la "population parentale".
Encore un élément en faveur d'une base génétique forte de la croissance

CHAPITRE 3

Etude de la croissance chez *Crassostrea gigas* au stade adulte: effet de la densité d'élevage et analyse de la stabilité temporelle en éclosion et dans le milieu naturel

1. Introduction

La quantité de nourriture disponible et la densité d'élevage sont les sources de variation les plus importantes pour la croissance des espèces aquatiques (Purdom 1974; Mann et Taylor, 1977; Malecha 1977, 1983; Kinghorn, 1983; Doyle and Talbot, 1986). Cependant, une série de questions fondamentales concernant la croissance des bivalves marins ne trouve encore aucune réponse à l'heure actuelle. Dans quelle mesure les conditions environnementales, et en particulier le niveau de compétition trophique engendré par des densités élevées, peuvent-elles modifier la croissance et sa stabilité dans le temps comme on l'a mis en évidence au chapitre 2 ?

L'amplitude des différences de croissance observées dépend de la variabilité génétique présente dans le matériel étudié ainsi que des conditions environnementales. La difficulté ici est que les individus représentent eux-mêmes une part de "l'environnement" à travers la densité d'élevage. Cette dernière peut être appréhendée à travers la comparaison de différents niveaux de densité (lots) que l'on peut établir de 3 manières différentes:

1. La biomasse est constante: la quantité de nourriture apportée est égale pour chaque lot mais le nombre d'individus par lot est ajusté dans le temps de manière à maintenir une biomasse constante. Les lots à plus forte croissance sont représentés par moins d'individus que les lots à plus faible croissance. En conséquence, la quantité de nourriture par individu est différente d'un lot à l'autre mais constante par gramme d'huître.

2. Les effectifs sont constants: la quantité de nourriture apportée est égale pour chaque lot mais la masse totale d'individus varie d'un lot à l'autre. Les lots à plus forte croissance ont une biomasse plus élevée que les lots à plus faible croissance. En conséquence, la quantité de nourriture par gramme d'huître est différente d'un lot à l'autre mais identique par individu.

3. La quantité de nourriture par individu est constante, ce qui suppose que la compétition entre les individus soit nulle ou suffisamment faible pour espérer pouvoir être négligée. Cette situation est envisageable dans la pratique, dans le cas d'un petit nombre d'individus de petite taille maintenus dans des microstructures (chapitre 2). Pour des individus de plus grande taille, cela n'est pas pratiquement envisageable.

Les questions qui se posent concernent précisément l'aptitude à croître en conditions trophiques limitantes, comme c'est le cas par exemple pour le bassin de Marennes-Oléron, donc en présence d'un niveau de compétition trophique fort entre les individus. Si on veut pouvoir sélectionner des individus qui valorisent au mieux leur nourriture, travailler exclusivement en milieu *ad libitum* limiterait considérablement la portée des conclusions.

Des questions fondamentales sur les facteurs influençant la croissance restent sans réponse chez les bivalves marins élevés en milieu contrôlé: comment agit la compétition intra spécifique sur la vitesse de croissance ? Quel est son impact sur la variabilité de la croissance ? Influence-t-elle la conservation dans le temps de la vitesse de croissance (chapitre 2) ?

Dans ce chapitre, les mêmes aspects de la croissance étudiés au chapitre 2 seront abordés dans des conditions de densité d'élevage différentes en utilisant la modalité n° 2 décrite ci-dessus (nursérie de Bouin, Vendée). L'absence de compensation pour la vitesse de croissance mise en évidence au chapitre 2 sera également réexaminée dans un site d'élevage naturel à forte productivité (Etang de Thau).

2. Matériels et méthodes

Le matériel biologique utilisé dans ces deux expériences de croissance est issu des croisement intra-population dont les modalités sont décrites au chapitre 1. Une partie de ce matériel est utilisé dans l'expérience de Bouin et le reste dans l'expérience de Palavas (figure 3-1).

2.1. Expérience de Bouin

2.1.1. Matériel biologique

Une partie des 3 populations "5x5" (chapitre 1) a été transférée en deux temps de l'écloserie de La Tremblade (Estuaire de la Seudre, Charente maritime, France) vers la nurserie de Bouin (Baie de Bourgneuf, Vendée, France): une partie au printemps 1996 puis le reste en automne 1996, donnant ainsi deux sites de pré grossissement différents, notés "B" pour la nurserie de Bouin et "T" pour l'écloserie de La Tremblade. Les conditions de croissance ayant été différentes au cours de l'été entre Bouin et La Tremblade, nous disposons donc en fait de $2 \times 3 = 6$ lots distincts. Le tableau 3-1 présente le matériel biologique qui a été suivi pour la croissance à la nurserie de Bouin au début 1997.

2.1.2. Dispositif expérimental

La solution technique choisie pour disposer de différents niveaux de compétition trophique consiste à utiliser plusieurs densités de "compétiteurs". Cette solution est en effet plus légère à mettre en œuvre qu'un triple ajustement quotidien des débits de phytoplancton. Il est en effet plus facile de réguler une densité que d'ajuster la quantité de phytoplancton dans chaque bac. Ces "compétiteurs" sont des huîtres de 60 g, issues d'un lot unique, les plus homogènes possible en poids.

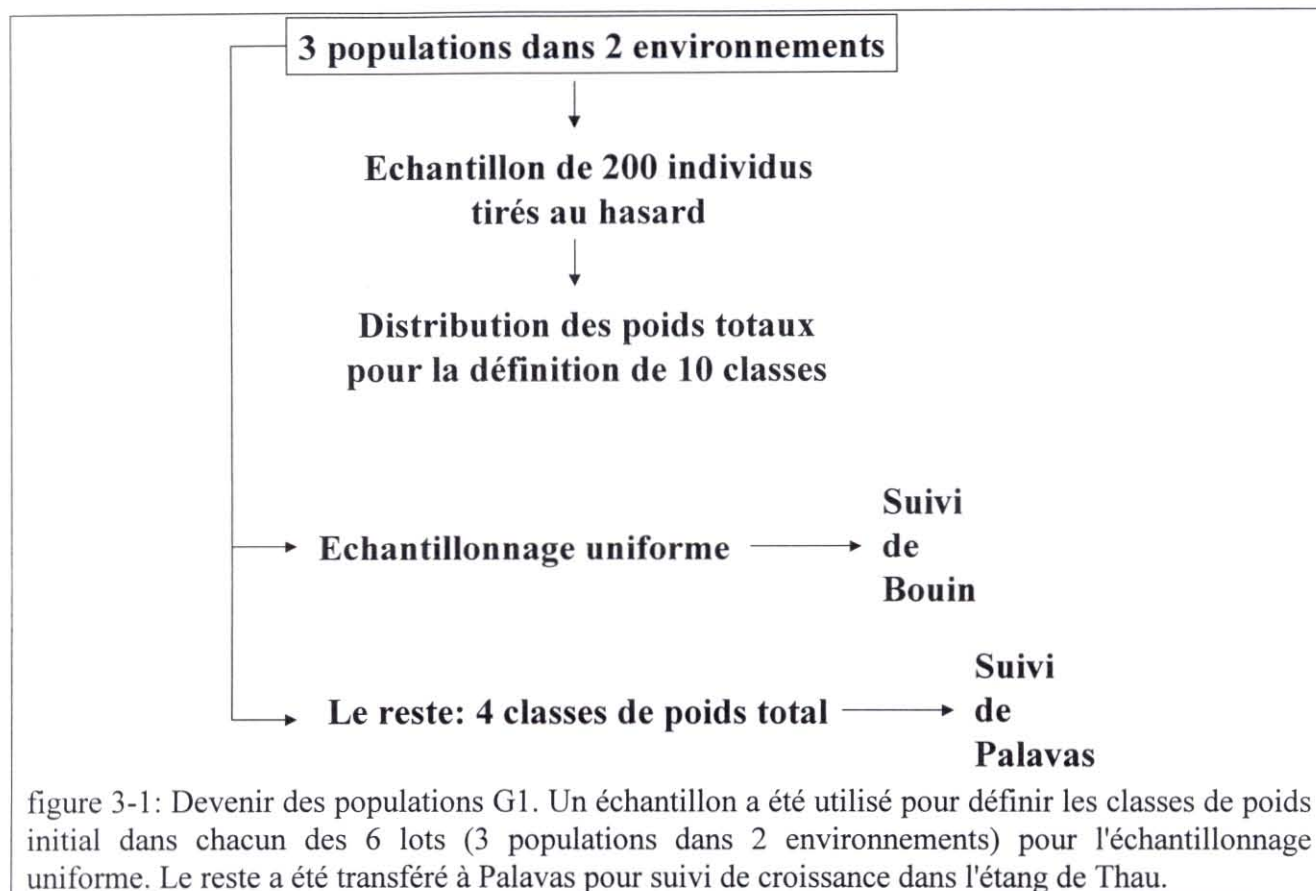


tableau 3-1: Effectifs totaux par population pour les 2 parcours.

Population	Individus transférés à Bouin en juin 1996	Individus transférés à Bouin en novembre 1996
BA	1743	2182
PDB	1394	2515
ARC	849	788

tableau 3-2: Bornes des classes de taille (en g) définies sur un échantillon de 200 individus par population et par site de pré grossissement (Bouin ou La Tremblade). pdb = Port des Barques, ba = Bonne-Anse, arc = Arcachon.

Classe	Bouin			La Tremblade		
	pdb	ba	arc	pdb	ba	arc
1	0 - 7,5	0 - 9,6	0 - 8,4	0 - 6,6	0 - 7,5	0 - 4,9
2	7,5 - 10,6	9,6 - 12,9	8,4 - 11,3	6,6 - 9,4	7,5 - 11,2	4,9 - 7,8
3	10,6 - 13,6	12,9 - 16,3	11,3 - 14,1	9,4 - 12,2	11,2 - 14,8	7,8 - 10,6
4	13,6 - 16,7	16,3 - 19,6	14,1 - 17	12,2 - 15	14,8 - 18,4	10,6 - 13,5
5	16,7 - 19,8	19,6 - 23	17 - 19,8	15 - 17,8	18,4 - 22,1	13,5 - 16,4
6	19,8 - 22,8	23 - 26,4	19,8 - 22,6	17,8 - 20,5	22,1 - 25,7	16,4 - 19,2
7	22,8 - 25,9	26,4 - 29,7	22,6 - 25,5	20,5 - 23,3	25,7 - 29,3	19,2 - 22,1
8	25,9 - 28,9	29,7 - 33,1	25,5 - 28,3	23,3 - 26,1	29,3 - 33	22,1 - 24,9
9	28,9 - 32	33,1 - 36,4	28,3 - 31,2	26,1 - 28,9	33 - 36,6	24,9 - 27,8
10	> 32	> 36,4	> 31,2	> 28,9	> 36,6	> 27,8

Le poids total moyen de "compétiteurs" (67,9 g) est choisi plus important que celui des individus étudiés (20-40g) afin de rendre aussi constant que possible leur prélèvement trophique. Trois bacs (3 modalités) ont été fixés. La quantité de "compétiteurs" par bac varie de la manière suivante:

Bac N° 0 = compétition trophique faible: 100 individus par lot (voir échantillonnage ci-après), soit 600 individus marqués individuellement, pas de "compétiteurs".

Bac N° 1 = compétition trophique moyenne: 100 individus par lot (voir échantillonnage ci-après), soit 600 individus marqués individuellement + 489 "compétiteurs" (soit une biomasse de 33 kg).

Bac N° 2 = compétition trophique forte: 100 individus par lot (voir échantillonnage ci-après), soit 600 individus marqués individuellement + 1333 "compétiteurs" (soit une biomasse de 66 kg).

Les notations 0, 1 et 2 font référence aux quantités de compétiteurs contenues dans chaque modalité.

Dans chaque bac, les huîtres marquées individuellement et les compétiteurs ont été mélangés et placés dans 6 clayettes en plastique ajouré. La densité est de 100, 180 et 280 individus par clayette, respectivement pour les bacs 0, 1 et 2. Le positionnement des clayettes dans les bacs est aléatoire et modifié à chaque lavage hebdomadaire. Chaque bac est alimenté en continu (débit $2,4 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) en eau de mer préalablement décantée. La température est régulée à 16°C . Le phytoplancton (*Skeletonema costatum*) est produit sur eau salée souterraine et mélangé dans le système. L'apport en oxygène est assuré par une rampe de bullage alimentée en air pulsé au fond de chaque bac. Le niveau théorique de compétition trophique a été défini à 20, 60 et 80 % de prise de nourriture respectivement pour les bacs 0, 1 et 2.

2.1.3. Echantillonnage

Afin de maximiser la variabilité de taille des huîtres qui seront suivies au cours de l'expérience, l'échantillonnage n'a pas été réalisé de manière aléatoire mais de manière quasiment uniforme (figure 3-2). Pour chacun des 6 lots, une première pesée de 200 huîtres a permis de dresser un histogramme de distribution des poids en 10 classes (tableau 3-2). Ensuite, les huîtres ont été pesées individuellement jusqu'à obtention de 30 individus par classe et par lot (soit 10 individus par lot par classe et par bac), qui ont été étiquetés individuellement. Il n'a pas été possible d'obtenir 10 individus pour les classes de poids extrêmes (tableau 3-3).

2.1.4. Suivi de croissance

L'ensemble des individus marqués a été pesé les 2, 18 et 29 avril 1997, les 7 et 21 mai 1997, les 7 et 16 juin 1997 et le 1^{er} juillet 1997, soit de manière quasi hebdomadaire sur 90 jours. Ces dates correspondent respectivement à 351, 367, 378, 386, 400, 417, 429 et 441 jours après fécondation.

A la température 16 °C, on évite la maturation des animaux. La durée de l'expérience dépend notamment de la possibilité d'ajuster le niveau de prise du bac N° 2 à 80%: une croissance trop importante des huîtres pourrait amener à dépasser ce seuil et donc entraîner un niveau de compétition trophique trop important entraînant des mortalités. Les poids totaux individuels sont donnés au tableau 3-4.

Les paramètres hydrobiologiques suivants ont été mesurés tout au long du suivi de croissance:

- débit (éprouvette graduée et chronomètre)
- température (thermomètre mini maxi à 0,1 °C près)
- salinité (conductimètre Kent LFI96 WTW à 0,1 ‰ près)
- turbidité en NTU (Unité Néphélométrique de Turbidité, turbimètre HACH)
- oxygène (oxymètre YSI S8, à 0,1 % de saturation près)
- quantité de nourriture (comptage de cellules phytoplanctoniques sur cellule de Mallasez)

2.2. Expérience de Palavas

Une partie des 3 populations "5x5" (figure 3-1) a été transférée vers l'étang de Thau (Station IFREMER de Palavas les flots):

- Bonne Anse, préalablement transférée à Bouin en juin 1996 (noté BANB)
- Bonne Anse, préalablement transférée à Bouin en novembre 1996 (noté BANR)
- Port des Barques préalablement transférée à Bouin en juin 1996 (noté PBAB)

Chaque population a été divisée en 4 classes de poids total, notées 1 à 4 et équivalant respectivement à < 16 g, [16 g, 20 g[, [20 g, 24 g[et > 24g. La technique de culture locale repose sur le collage des individus sur une corde qui est suspendue à une table (voir plan de disposition à la figure 3-3). Le collage étant définitif, il est impossible d'envisager un suivi de croissance individuel dans la pratique. Seul le poids initial individuel est connu, il a été déterminé entre le 8 et le 11 Avril 1997. Presque un an plus tard, le 2 février 1998, le poids total final moyen par corde a été estimé par le rapport suivant: (poids de la corde entière - poids de la corde à vide)/nombre d'individus sur la corde. La période de croissance a duré 297 jours.

tableau 3-3: Echantillonnage uniforme de chaque classe de taille. Effectifs par classe, par bac et par population.

		Classe de poids total											
Population	Site de pré-grossissement	Bac	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PDB	Bouin	0	7	10	10	10	10	10	10	10	10	6	
		1	7	10	10	10	10	10	10	10	10	5	
		2	6	10	10	10	10	10	10	10	10	6	
	La Tremblade	0	10	10	10	10	10	10	10	10	9	3	2
		1	10	10	10	10	10	10	10	10	9	3	2
		2	10	10	10	10	10	10	10	10	9	3	2
BA	Bouin	0	9	10	10	10	10	10	10	10	10	6	3
		1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	3
		2	9	10	10	10	10	10	10	10	10	5	3
	La Tremblade	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	5
		1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	6
		2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	5
ARC	Bouin	0	6	10	10	10	10	10	10	10	10	5	3
		1	5	10	10	10	10	10	10	10	10	5	3
		2	5	10	10	10	10	10	10	10	10	5	3
	La Tremblade	0	7	10	10	10	10	10	7	3	1	0	1
		1	7	10	10	10	10	10	7	3	1	0	0
		2	7	10	10	10	10	10	6	4	1	0	0
Total général	1495	Total par classe	145	180	180	180	180	170	160	150	92	58	

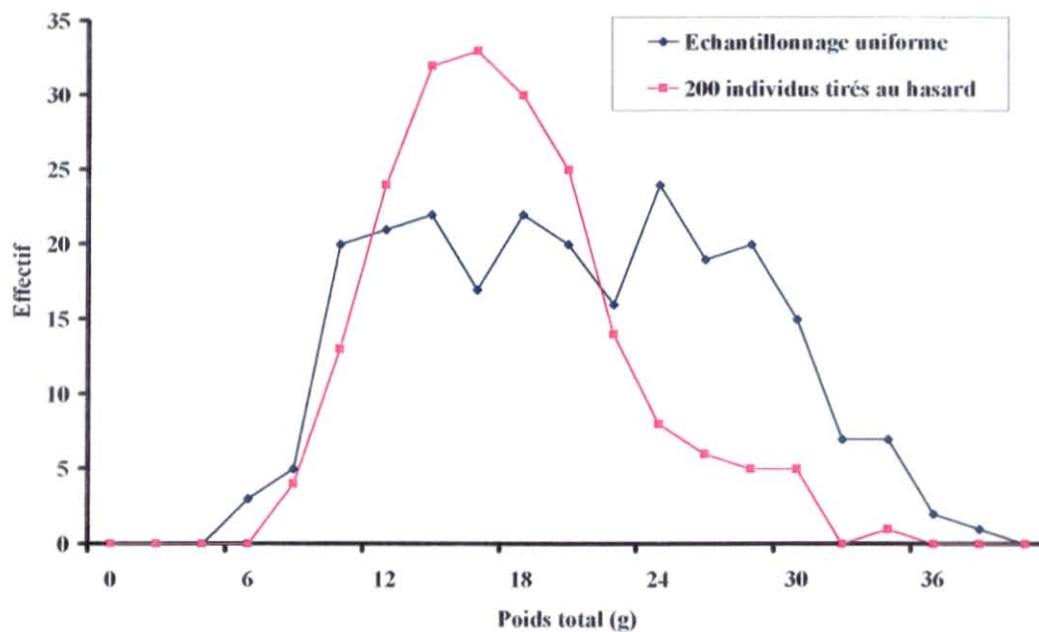


figure 3-2: Distribution des poids totaux pour la population d'Arcachon pré-grossie à Bouin, population et échantillon uniforme.

tableau 3-4: Poids total moyen (g) par population et par site de pré grossissement. pdb = Port des Barques, ba = Bonne Anse, arc = Arcachon. Sites de pré grossissement: T = La Tremblade, B = Bouin

Population	B	T	moyenne
pdb	21,2	16,4	18,9
ba	22,8	21,9	22,3
arc	19,4	12,0	16,3
Moyenne	21,2	17,5	19,4

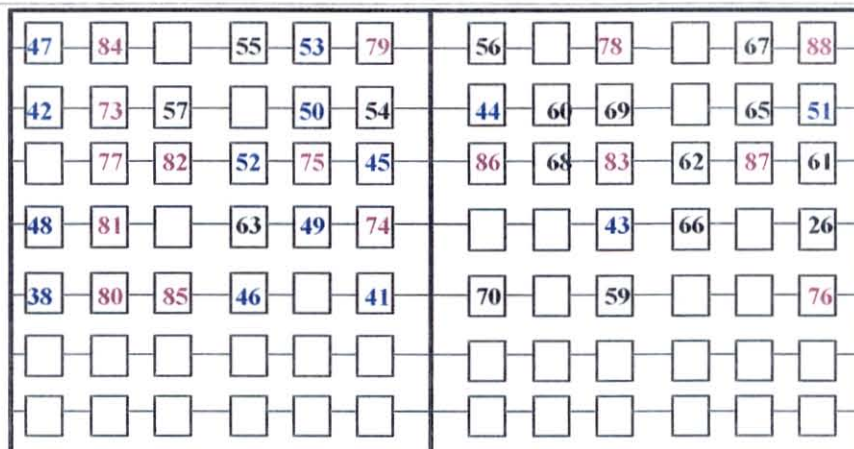


figure 3-3: Suivi de Palavas. Disposition des cordes sur la table (vue de dessus). **BANR** 16 cordes de 60 individus, $n = 960$, **BANB** 15 cordes de 60 individus et 1 corde de 39 individus, $n = 939$ et **PBAB** 15 cordes de 60 individus, $n = 900$. Chaque carré blanc représente une corde portant des individus externes à cette expérience

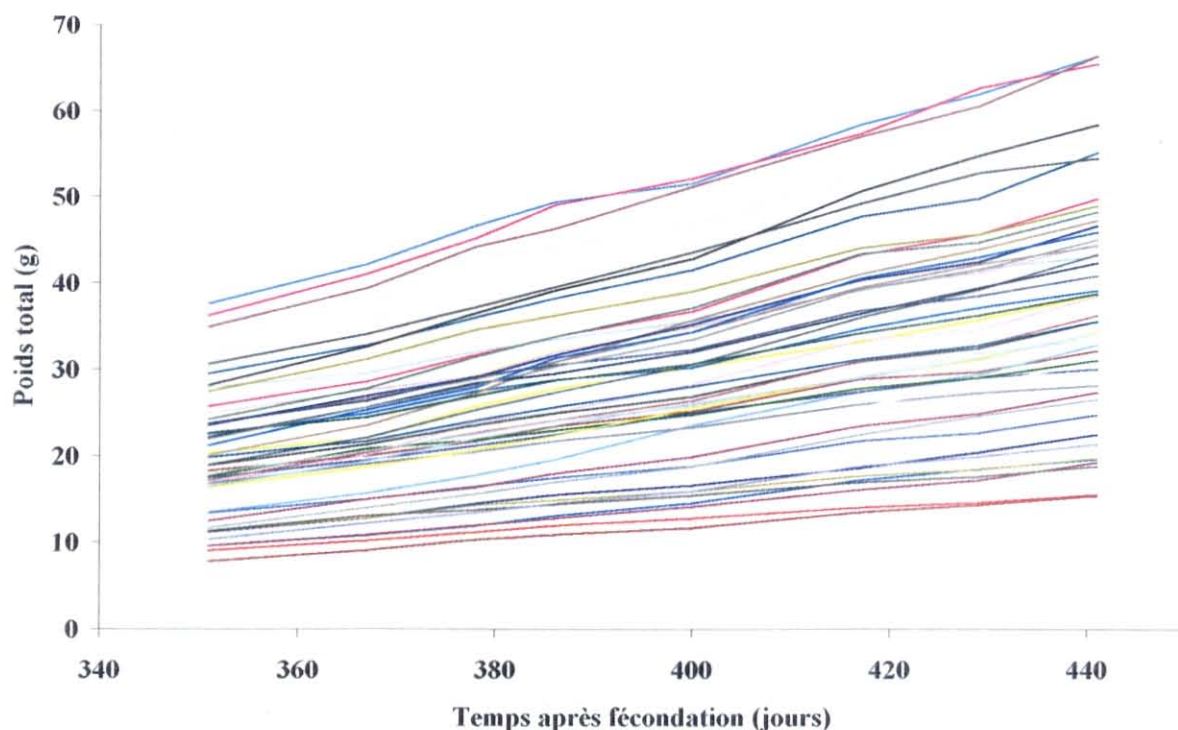


figure 3-4: Suivi de Bouin. Exemple de 50 courbes de croissance individuelles chez *Crassostrea gigas* âgée de 1 an. La croissance est très significativement linéaire pendant le suivi de croissance.

2.3. Analyses statistiques

Tous les traitements statistiques ont été faits à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute, 1988). Les vitesses de croissance individuelles du suivi de Bouin, ont été déterminées par régression linéaire simple sur les courbes de croissance (SAS PROC GLM) puis ont été utilisées comme variables. Le modèle complet suivant a été utilisé pour décrire les différents effets:

$$GR = \alpha.COMPET + \beta.POP + \delta.ORIGINE(POP) + \gamma.POIDSINI + a.POP*POIDSINI + b.COMPET*POIDSINI + \varepsilon$$

COMPET: Niveau de compétition trophique (3 modalités: 0, 1 ou 2)

POP: Population des parents (3 modalités: ARC, BA ou PDB)

ORIGINE: Site de pré grossissement (2 modalités: Bouin ou La Tremblade), hiérarchisé dans POP

POIDSINI: Poids initial (covariable continue)

COMPET*POIDSINI et POP*POIDSINI sont les interactions éventuelles entre la taille initiale et le niveau de compétition ou la population. Ces deux dernières interactions renseignent sur l'aspect taille-dépendance des effets de la population et du niveau de compétition trophique.

Dans le suivi de Palavas, le gain de poids moyen par corde entre les 2 mesures (en g) et le gain relatif (croissance spécifique en %) ont été calculés puis testés dans le modèle d'analyse de variance suivant:

$$GAIN\ ABSOLU\ ou\ GAIN\ RELATIF = \alpha.CLASSE + \beta.POP + \varepsilon$$

CLASSE: Classe de poids initial (4 modalités: 1, 2, 3 et 4)

POP: Population parentale et site de pré grossissement (3 modalités: BANB, BANR et PBAB)

L'effet de la corde a été testé par analyse de variance sur le poids initial et sur le poids final séparément, dans un modèle d'analyse de variance prenant également en compte les facteurs CLASSE et POP.

Avant d'analyser les sources de variation au sein du modèle complet, la pertinence de ce dernier est testée par comparaison avec les modèles emboîtés par test F (Tomassone, 1993). L'estimation des sommes des carrés est faite selon le Type I de SAS, adaptée pour les plans expérimentaux équilibrés comme c'est le cas dans ces 2 expériences.

3. Résultats

3.1. *Suivi de Bouin*

3.1.1. Hydrobiologie

Après une brève période de variation des températures au début du mois d'Avril, la température de l'eau s'est stabilisée pour tous les bassins aux alentours de 16 °C durant toute la durée du suivi de croissance. La moyenne des températures est de 15,7 °C pour les minimales et 16,6 °C pour les maximales. La salinité moyenne est de 34,7 ‰ et n'a que très peu varié. La turbidité de l'eau était peu élevée et assez stable avec une moyenne de 3,8. La concentration d'oxygène est restée à un haut niveau de saturation avec 93,9 % en moyenne. Les débits moyens par animal sont de 4,9, 2,5 et 1,4 l.h⁻¹ respectivement pour les niveaux de compétition 0, 1 et 2. Les taux moyens de prise de nourriture, calculés à partir des quantités de chlorophylle *a* et de phéopigment, sont respectivement de 18,1, 49,7 et 72,2 % pour les niveaux de compétition 0, 1 et 2. L'apport moyen de nourriture est très similaire entre les bacs, avec des valeurs moyennes de concentration en chlorophylle de 21,2, 21,6 et 23,1 µg.l⁻¹ respectivement pour les bacs 0, 1 et 2.

3.1.2. Courbes de croissances individuelles

La mortalité, très faible (2,27 %) pendant l'expérience, n'a pas modifié la biomasse globale. L'ensemble des mesures effectuées entre j351 et j441 a généré 1461 courbes de croissance individuelles.

La croissance est très significativement linéaire sur toute la période de mesure comme le montre la figure 3-4 où les cinétiques de croissance de 50 individus sont représentées. La courbe de croissance de chaque individu peut donc être décrite par un modèle linéaire simple à deux paramètres: le poids total initial (en g) et la vitesse de croissance (en g.j⁻¹). Les ajustements linéaires sont significatifs pour tous les individus (F allant de 12,5 à 10456; P allant de 5,9.10⁻¹¹ à 0,01; R² moyen = 0,98). Les vitesses de croissance estimées vont de 0,0139 à 0,6779 g.j⁻¹, donnant une variation de 1 à 48. Ces vitesses de croissance correspondent à une prise de poids annuelle respectivement de 5 g et de 250 g. La vitesse de croissance moyenne de tous les individus est de 0,230 ± 0,003 g.j⁻¹ correspondant à un taux de croissance spécifique de 114,5 ± 1,3 %.

3.1.3. Modèle global

Le modèle global explique de manière significative les différentiels de vitesse de croissance. Le tableau 3-5 donne les différentes sources de variations pour le modèle complet. La pertinence du modèle complet a été testée par la comparaison avec les modèles emboîtés.

3.1.4. Effet du niveau de compétition trophique sur la croissance

Comme prévu, les différences de densité entre les bacs entraînent des différences de prise de nourriture se répercutant sur la vitesse de croissance dont les valeurs moyennes sont de $0,264 \pm 0,005$, $0,250 \pm 0,005$ et $0,174 \pm 0,003 \text{ g.j}^{-1}$ respectivement pour les bac 0, 1 et 2. Ces vitesses de croissance correspondent à des taux de croissance spécifique de $130,7 \pm 2,3 \%$, $124,2 \pm 2,1 \%$ et $87,8 \pm 1,6 \%$ respectivement pour les bacs 0, 1 et 2. Le niveau trophique affecte significativement la vitesse de croissance ($F = 25,8$; $P < 0,0001$). Cependant, les niveaux 0 et 1 ne sont pas significativement différents entre eux mais sont différents du niveau 2 (figure 3-5). La quantité de nourriture est donc un facteur limitant pour la croissance dans le bac 2 mais pas dans les bacs 0 et 1.

La croissance observée dans les bacs 0 et 1 peut être considérée comme la croissance maximale, ou potentiel de croissance, des huîtres marquées à la température de l'expérience, 16°C . Les modalités 0 et 1 seront regroupées dans la suite des analyses.

La variabilité de la taille peut être quantifiée par le coefficient de variation; l'évolution de celui-ci dans le temps et entre les 3 niveaux de compétition montre que la variabilité chute de manière assez importante quel que soit le niveau de compétition (diminution en moyenne de $46,5 \%$ à $41,8 \%$).

Cependant, pour le niveau de compétition plus élevé (2), la baisse est plus lente. Le coefficient de variation à la fin du suivi de croissance est plus élevé pour le fort niveau de densité (2; figure 3-6) que pour le faible (0 et 1). Les coefficients de variation de la vitesse de croissance respectivement pour les niveaux de compétition 0, 1 et 2 sont respectivement de $42,2$, $40,8$ et $42,7 \%$.

3.1.5. Différences de croissance entre populations et entre sites de pré grossissement

De la même manière que le suivi de croissance de la première année (chapitre 2), les 3 populations montrent des performances de croissance significativement différentes ($F = 55,9$; $P < 0,0001$). Arcachon a une croissance de $0,1885 \pm 0,0048 \text{ g.j}^{-1}$, significativement plus faible que les deux autres populations (BA: $0,2572 \pm 0,0045 \text{ g.j}^{-1}$ et PDB: $0,2355 \pm 0,0045 \text{ g.j}^{-1}$).

Le site de pré grossissement affecte également la vitesse de croissance ($F = 32,5$; $P < 0,0001$) mais l'interaction entre populations et sites de pré grossissement n'est pas significative ($F =$

1,27 NS). Dans les 3 populations, la croissance des huîtres pré-grossies à Bouin est plus rapide que celle des huîtres pré-grossies à la Tremblade (figure 3-7).

3.1.6. Influence de la taille (poids total initial)

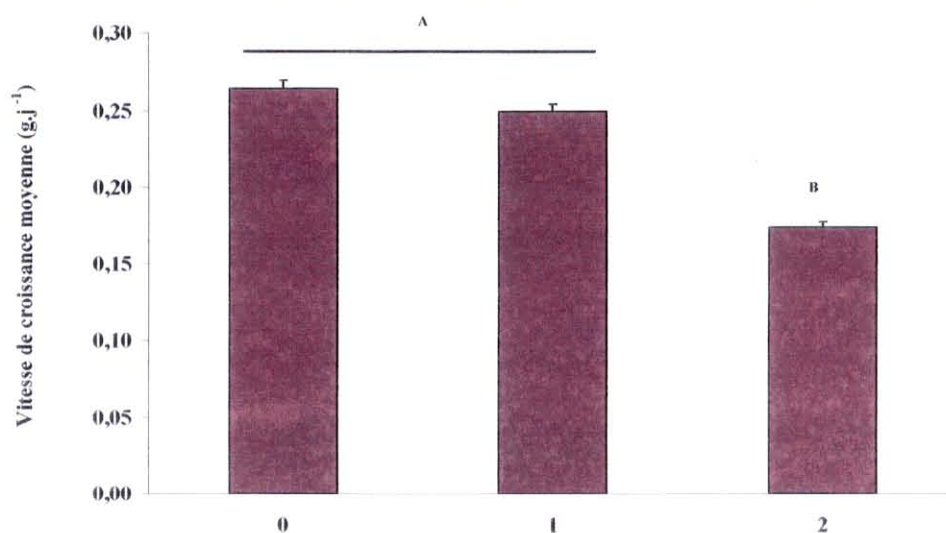
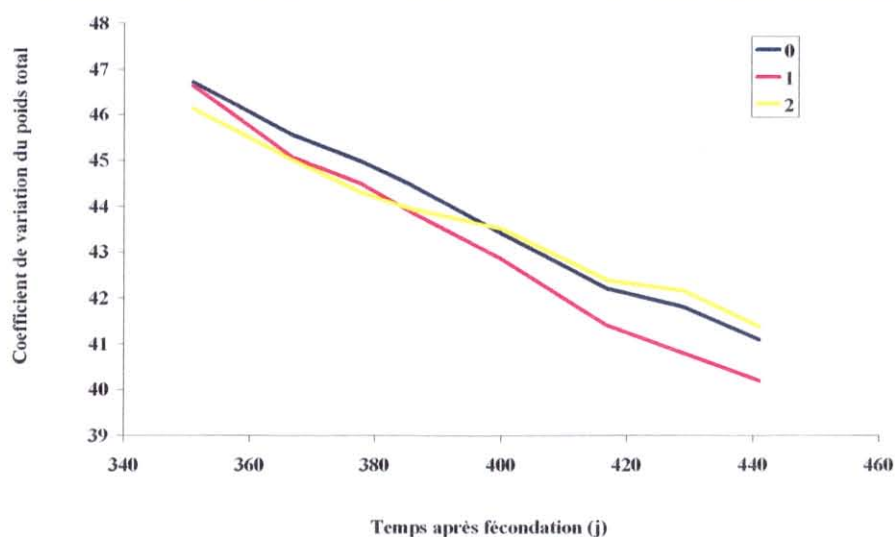
Le modèle global montre des interactions significatives entre le poids initial et le niveau de densité d'élevage (tableau 3-5). Dans le but d'illustrer ce résultat, 10 classes de poids total ont été déterminées au premier point de mesure (j351) dans chaque population d'une part et dans chaque niveau de compétition d'autre part. L'échantillonnage de départ n'étant pas aléatoire mais uniforme (aux déséquilibres entre les effectifs des classes près), il est plus rigoureux de redéfinir les classes de poids total initial à partir des individus de chacune des populations (tableau 3-6).

L'analyse de l'effet du niveau de compétition trophique sur la relation entre la vitesse de croissance et le poids total en début d'expérience est représentée à la figure 3-8A. L'analyse de covariance révèle un effet du niveau de compétition trophique sur cette relation ($F = 124,2$; $P < 0,0001$). En effet les individus les plus petits ne sont pas influencés de la même manière par une forte densité d'élevage que les gros individus. Néanmoins, la diminution relative de vitesse de croissance entre compétition trophique faible (0 et 1) et forte (2) est très peu dépendante du poids initial: cette baisse relative est de l'ordre de 40 % quelle que soit la classe de poids initiale (figure 3-8B).

L'interaction significative entre la population et le poids total initial (tableau 3-5) peut être représentée par la relation entre la vitesse de croissance et le poids total initial pour les 3 populations (figure 3-9). Les relations par population sont significativement linéaires et de pentes différentes pour chaque population, illustrant l'interaction entre population et poids total initial. La pente pour la population d'Arcachon est plus forte que pour les deux autres populations (Arcachon: 0,0086; Bonne Anse: 0,0067; Port des Barques: 0,0078), signifiant que, parmi les individus les plus gros, les individus d'Arcachon sont plus performants que dans les 2 autres populations. En revanche, parmi les individus les plus petits, les populations Bonne Anse et Port des Barques prennent l'avantage. Etant donné que la population d'Arcachon est constituée d'un plus grand nombre d'individus, de plus petite taille que les deux autres populations, l'effet global de la population est en défaveur d'Arcachon (figure 3-7).

tableau 3-5: Suivi de Bouin. Analyse du modèle complet et des sources de variation.

Source de Variation	F (SAS Type I)	P
Poids total initial (TWINI)	7516,0	0,0001
Niveau de compétition trophique (COMPET)	1651,1	0,0001
Population parentale (POP)	265,3	0,0001
Site de prégrossissement (ORIGINE)	31,3	0,0001
TWINI*COMPET	90,1	0,0001
TWINI*POP	63,8	0,0001

figure 3-5: Suivi de Bouin. Effet du niveau de compétition trophique sur la vitesse de croissance de *Crassostrea gigas*. A et B sont significativement différents ($P < 0,05$). Les données représentent la moyenne \pm se.figure 3-6: Suivi de Bouin. Evolution de la variabilité du poids total en fonction du temps et du niveau de compétition trophique chez *Crassostrea gigas*.

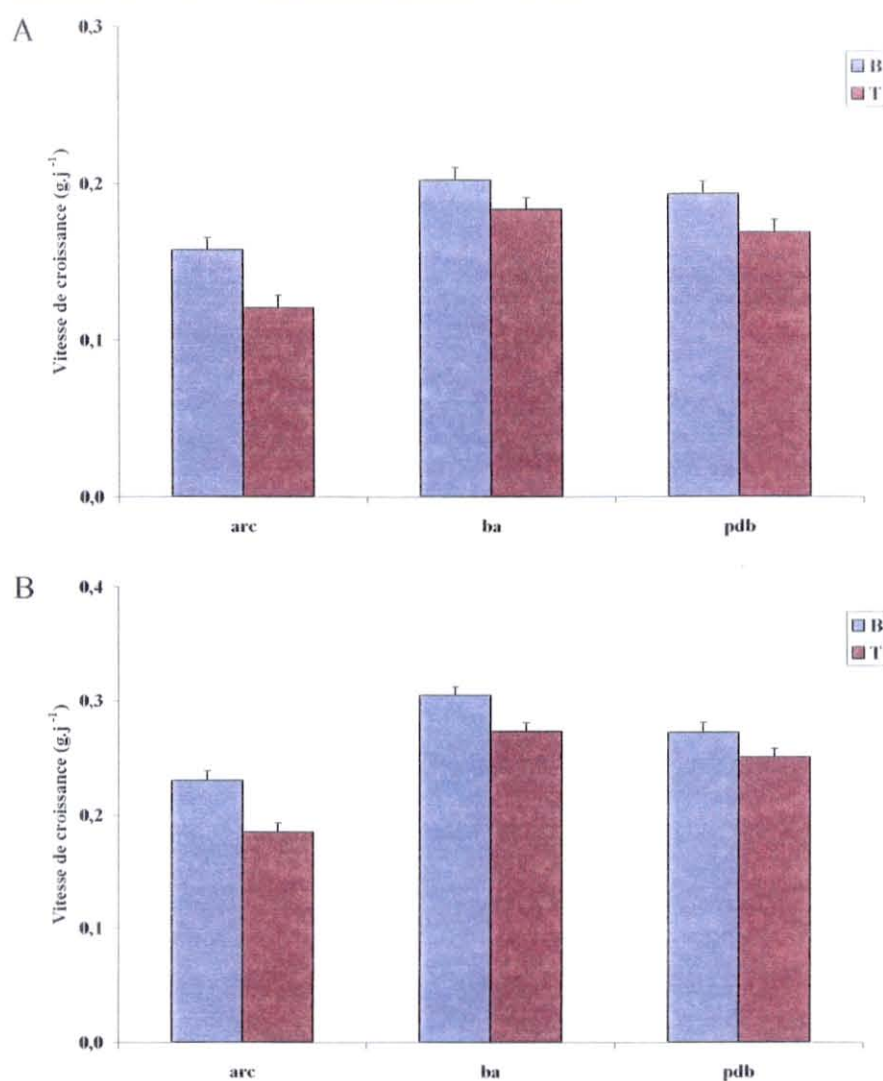


figure 3-7: Effet du site de pré grossissement (B = nurserie de Bouin, T = éclosérie de La Tremblade) sur la vitesse de croissance pour les 3 populations (ARC = Arcachon, BA = Bonne Anse et PDB = Port des Barques), en conditions de forte densité (A) et de faible densité (B). Arcachon se distingue des deux autres populations par une vitesse de croissance plus faible pour les 2 sites de pré grossissement et les deux conditions de densité. Les données représentent la moyenne \pm se.

tableau 3-6: Classes de poids total initial (j351). Chaque classe est caractérisée par des effectifs différents. Les bornes délimitent des classes de même taille.

Classe	arc	ba	pdb
1	0-3,9	0-5,5	0-4,8
2	3,9-7,8	5,5-11	4,8-9,6
3	7,8-11,7	11-16,5	9,6-14,4
4	11,7-15,6	16,5-22	14,4-19,2
5	15,6-19,5	22-27,5	19,2-24
6	19,5-23,4	27,5-33	24-28,8
7	23,4-27,3	33-38,5	28,8-33,6
8	27,3-31,2	38,5-44	33,6-38,4
9	31,2-35,1	44-49,5	38,4-43,2
10	>39	>55	>48

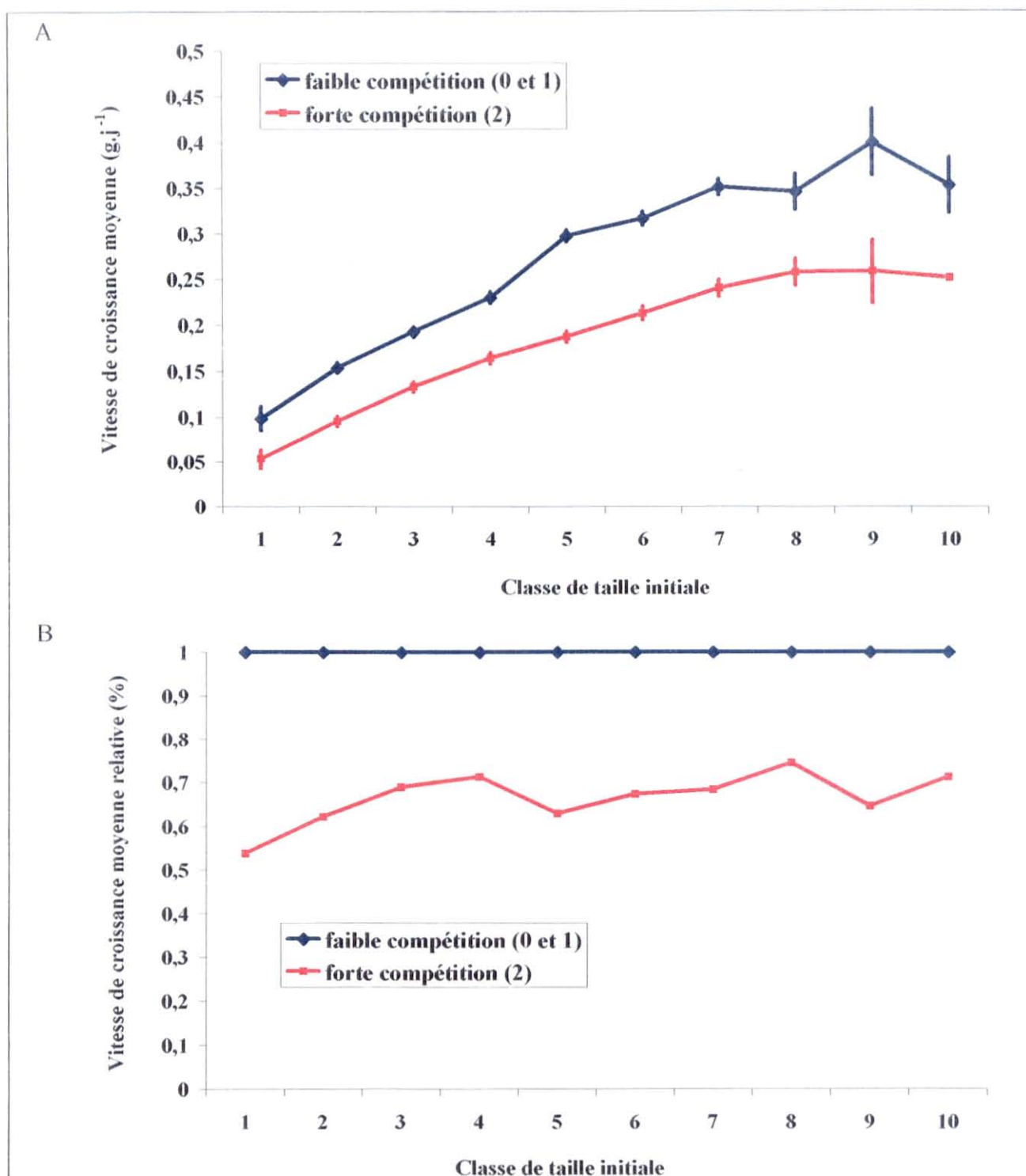


figure 3-8: Représentation de l'interaction entre le niveau de compétition trophique et le poids initial chez *Crassostrea gigas*. Les données représentent la vitesse de croissance moyenne par classe de poids total initial et par niveau de compétition trophique (A). La vitesse de croissance moyenne à forte compétition est représentée relativement à celle à faible compétition (B). La croissance dans le bac 2 représente environ 60 % de la croissance dans le bac 0-1 (courbe rouge, B).

3.1.7. Corrélation entre poids total initial et final

La corrélation entre le poids total en début d'expérience (huîtres âgées de 12 mois) et le poids final en fin d'expérience (huîtres âgées de 15 mois) est représentée figure 3-10 pour les deux niveaux de densité. Plus de 80 % du poids total à la fin de l'expérience est expliqué par le poids total en début d'expérience, illustrant la très bonne conservation dans le temps de la vitesse de croissance. La relation est un peu modifiée en fonction de la densité, illustrant l'effet de cette dernière sur le gain de poids entre j351 et j532.

3.2. Suivi de croissance dans l'étang de Thau

Le système d'élevage sur corde, typique de l'étang de Thau, ne permet pas de faire un suivi individuel de croissance. L'analyse a donc porté sur des poids moyens par corde qui constituent les unités expérimentales. Les vitesses de croissance moyenne dans l'étang de Thau sont de $0,271 \pm 0,004 \text{ g.j}^{-1}$ pour BANB, $0,268 \pm 0,004 \text{ g.j}^{-1}$ pour BANR et $0,278 \pm 0,006 \text{ g.j}^{-1}$ PBAB.

Le gain brut moyen est de $81,1 \pm 0,8 \text{ g}$ soit une vitesse de croissance moyenne de $0,27 \text{ g.j}^{-1}$. La population et la classe de poids initial n'ont aucune influence sur le gain brut de poids ($F = 1,44$ $P = 0,2321$, figure 3-13A). Le gain a tendance à augmenter avec la classe de taille initiale pour la population de Port des Barques (PBAB) et à diminuer pour la population de Bonne Anse (BANB).

La classe de poids initial modifie très significativement ($F = 201$ $P < 0,0001$, figure 3-13B) le gain relatif au poids initial (% de croissance ou croissance spécifique), mais pas la population ($F = 1,05$ $P = 0,3584$). Les individus les plus gros (classe 4) ont une croissance spécifique faible (en moyenne de $298,6 \pm 9,7 \%$) comparée aux individus les plus petits (classe 1) avec $630,0 \pm 13,6 \%$.

La stabilité des performances de croissance a été évaluée par la relation entre le poids total initial moyen d'une corde et le poids final moyen de cette même corde. Les résultats sont présentés à la figure 3-12. La relation, très significativement linéaire ($P < 0,0001$), montre que 57 % du poids total final moyen d'une corde est expliqué par son poids moyen initial.

4. Discussion

Les résultats présentés ici constituent l'une des premières études précises dans la littérature sur l'effet de la densité d'élevage sur la croissance en milieu strictement contrôlé chez un bivalve marin. La densité est un des paramètres les plus importants en aquaculture étant donné son effet négatif sur la croissance.

Les vitesses de croissance mesurées dans ces deux expériences (de l'ordre de $0,2 \text{ g.j}^{-1}$ pour la nurserie de Bouin et de $0,27 \text{ g.j}^{-1}$ pour Palavas) sont supérieures aux vitesses de croissance mesurées

au chapitre 2 dans l'écloserie de La Tremblade (de l'ordre de $0,15 \text{ g.j}^{-1}$), malgré les densités très faibles. Les différences entre La Tremblade et Bouin peuvent s'expliquer par les quantités de nourriture distribuées, la qualité et le type d'eau de mer, la température et les débits. L'étang de Thau est un milieu réputé pour donner des croissances considérables, beaucoup plus importantes que les valeurs obtenues en milieu naturel dans le bassin de Marennes-Oléron ou Arcachon.

Les différences entre sites sont régulièrement mises en évidence dans les rapports du REseau MOllusques du département Ressources Aquacoles (REMORA) qui est le réseau de suivi de la croissance de l'huître creuse sur les côtes françaises. L'étang de Thau est le site le plus poussant en France, avec un gain moyen de 120 g pour des huîtres âgées de 18 mois (plus de $0,4 \text{ g.j}^{-1}$), le poids pouvant tripler en 10 mois (REMORA, Goyard, 1994). Les caractéristiques climatiques et un milieu particulièrement riche, mais aussi l'absence d'exondation, expliquent ces performances. D'autre part, le système de culture des huîtres dans l'étang de Thau est de type "extensif", sans compétition pour l'espace ni pour les ressources trophiques qui sont présentes en grande quantité. Il est également connu que, dans le milieu naturel, les rations sont constituées de nombreuses espèces phytoplanctoniques produisant des huîtres à plus forte croissance en comparaison aux rations des écloseries basées sur un faible nombre d'espèces (Epifanio, 1979).

4.1. *Relation vitesse de croissance et poids total initial*

La vitesse de croissance dans l'expérience de Bouin est très fortement dépendante de la taille initiale, comme cela est souvent observé par exemple chez la palourde où cette taille explique 48,8 % de la croissance (Severein *et al.*, 1996). La vitesse de croissance représente le gain par unité de temps. Un individu a une vitesse de croissance d'autant plus élevée que son poids initial est élevé (figure 3-9) comme cela a été démontré lors du suivi de croissance effectué à La Tremblade. Dans l'étang de Thau, on ne retrouve pas cette tendance. Les individus suivis pour leur croissance ont atteint un âge d'environ 2 ans et il est probable qu'ils aient atteint leur taille limite. Ainsi, les différences de vitesse de croissance entre individus sont très diminuées par rapport à des individus moins âgés et d'autres facteurs externes peuvent alors s'exprimer. Il est connu qu'un des problèmes pour l'ostréiculture locale dans l'étang de Thau est le biofouling, qui est la fixation d'épibiontes en grand nombre. Même si la quantité de nourriture présente dans l'étang de Thau est très importante, les épibiontes peuvent agir comme compétiteurs trophiques et perturber la croissance, par rapport aux conditions d'élevage dans l'écloserie de La Tremblade ou la nurserie de Bouin. Ce type de compétition trophique peut être lié à la taille de l'huître, une huître de grosse taille offrant une surface plus importante pour les éventuels épibiontes.

compétition trophique peut être liée à la taille de l'huître, une huître de grosse taille offrant une surface plus importante pour les éventuels épibiontes.

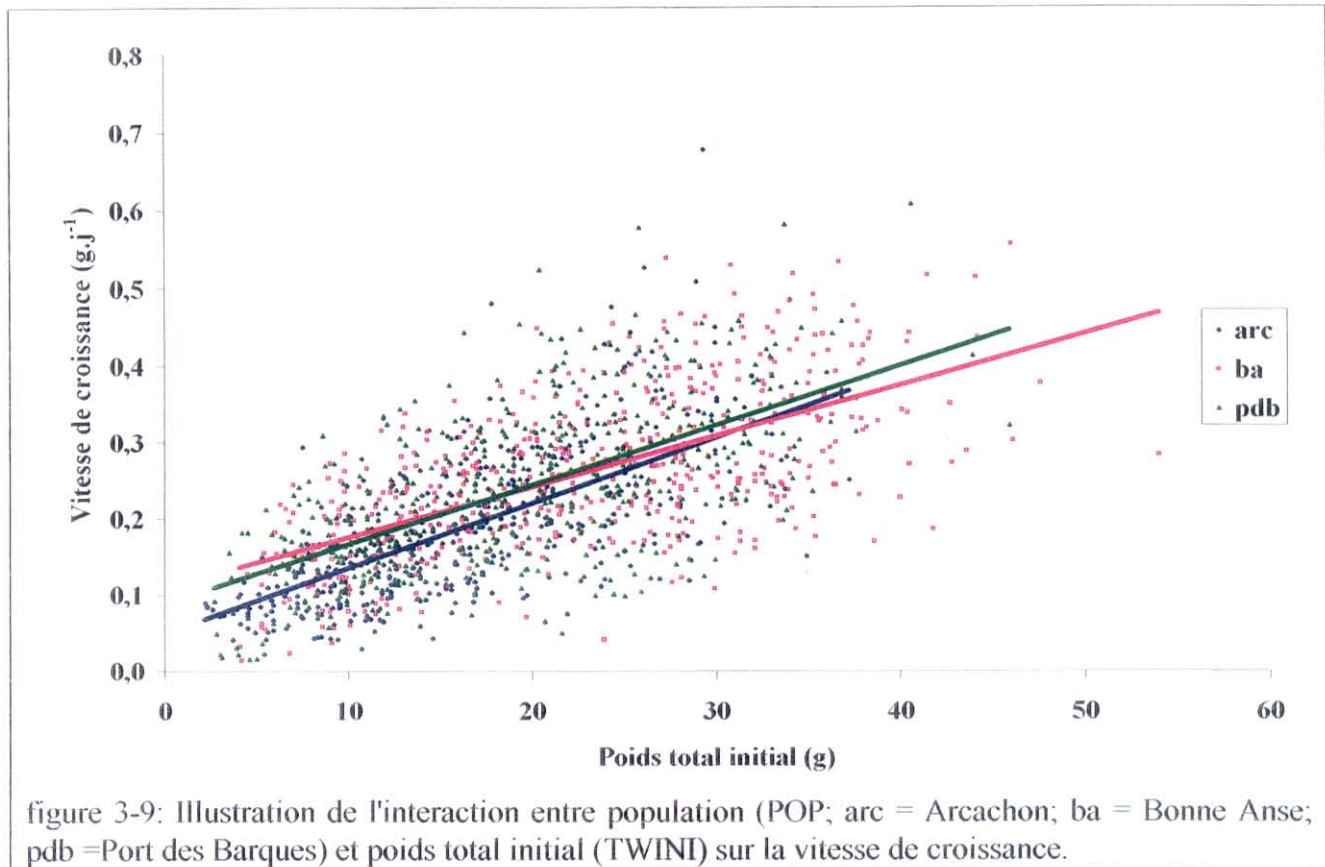


figure 3-9: Illustration de l'interaction entre population (POP; arc = Arcachon; ba = Bonne Anse; pdb = Port des Barques) et poids total initial (TWINI) sur la vitesse de croissance.

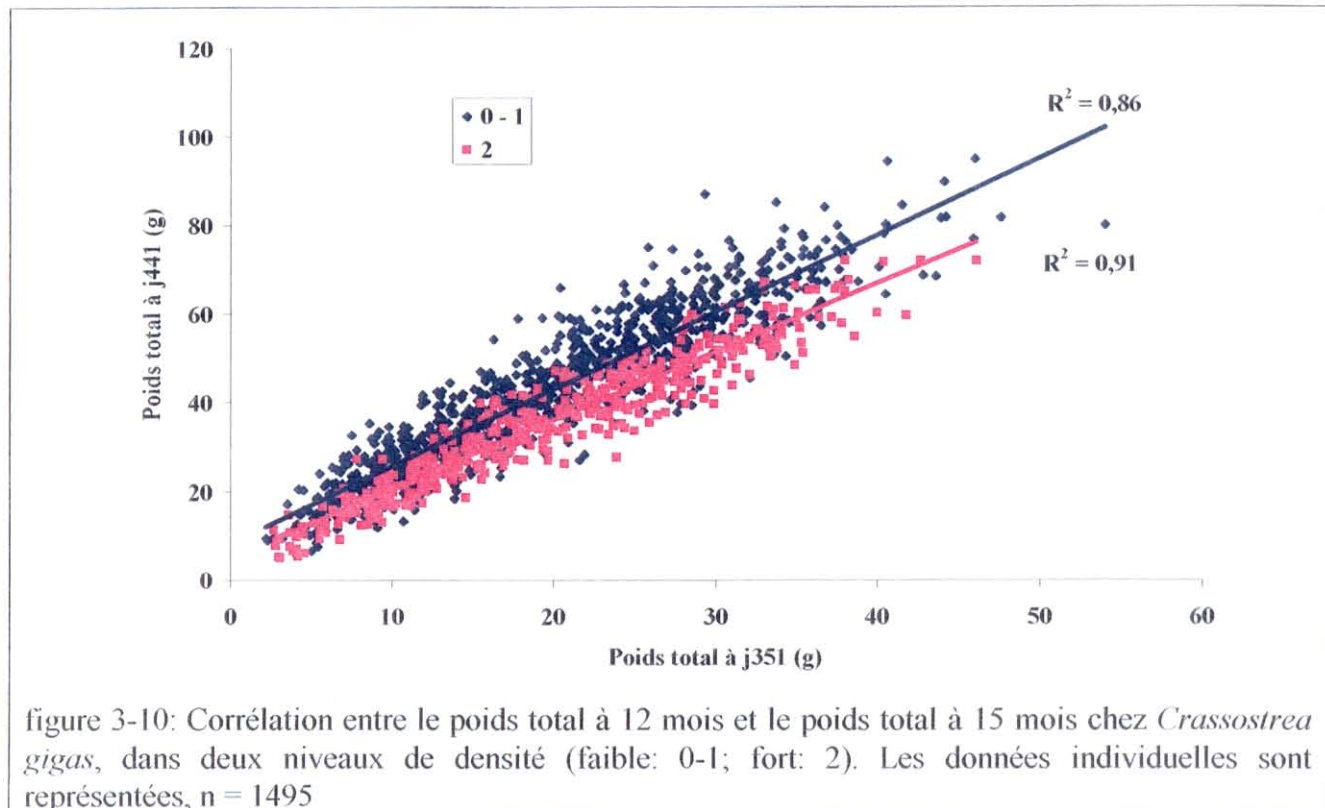


figure 3-10: Corrélation entre le poids total à 12 mois et le poids total à 15 mois chez *Crassostrea gigas*, dans deux niveaux de densité (faible: 0-1; fort: 2). Les données individuelles sont représentées, n = 1495

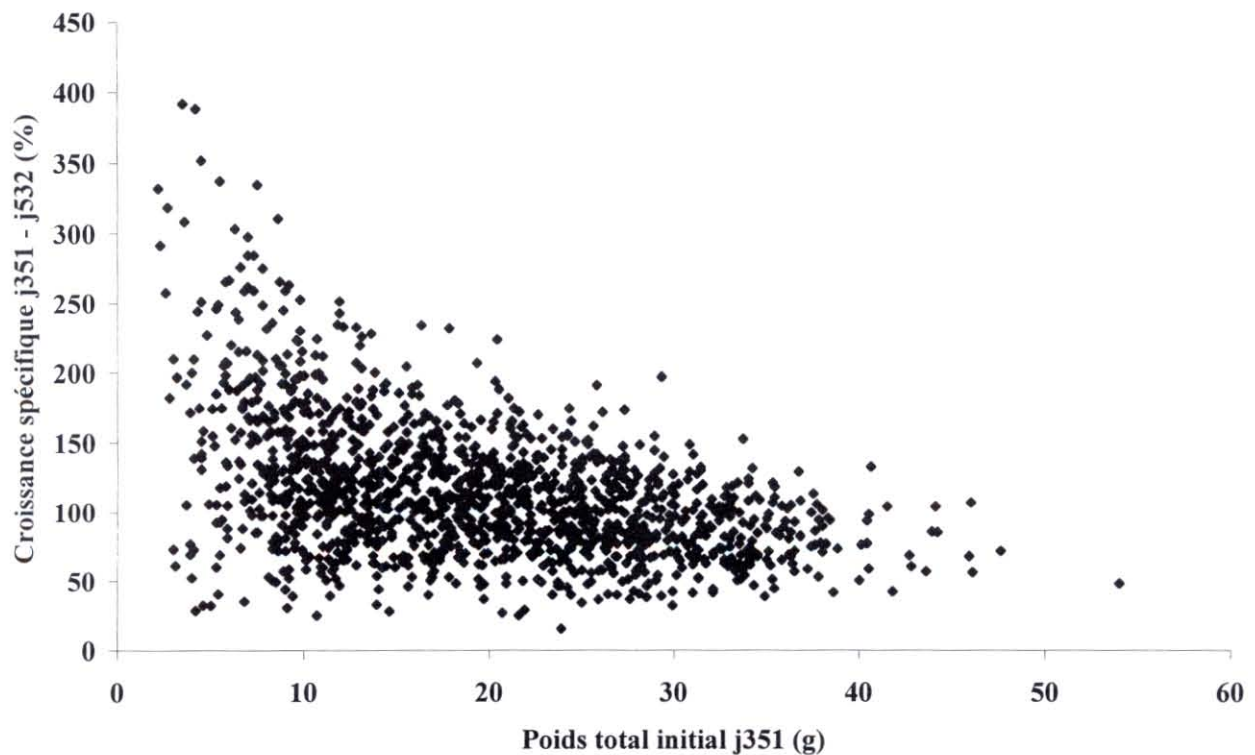


figure 3-11: Croissance spécifique chez *Crassostrea gigas* en fonction du poids initial. Les individus les plus petits grossissent proportionnellement plus que les gros individus.

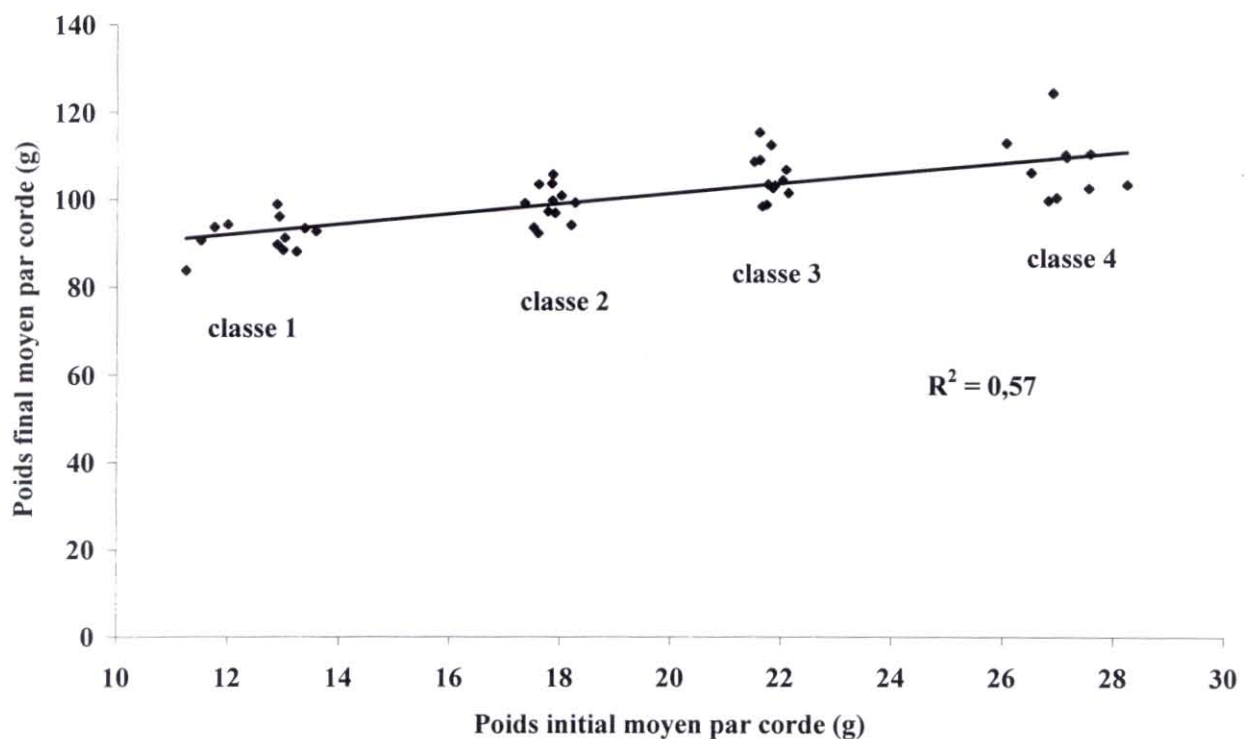
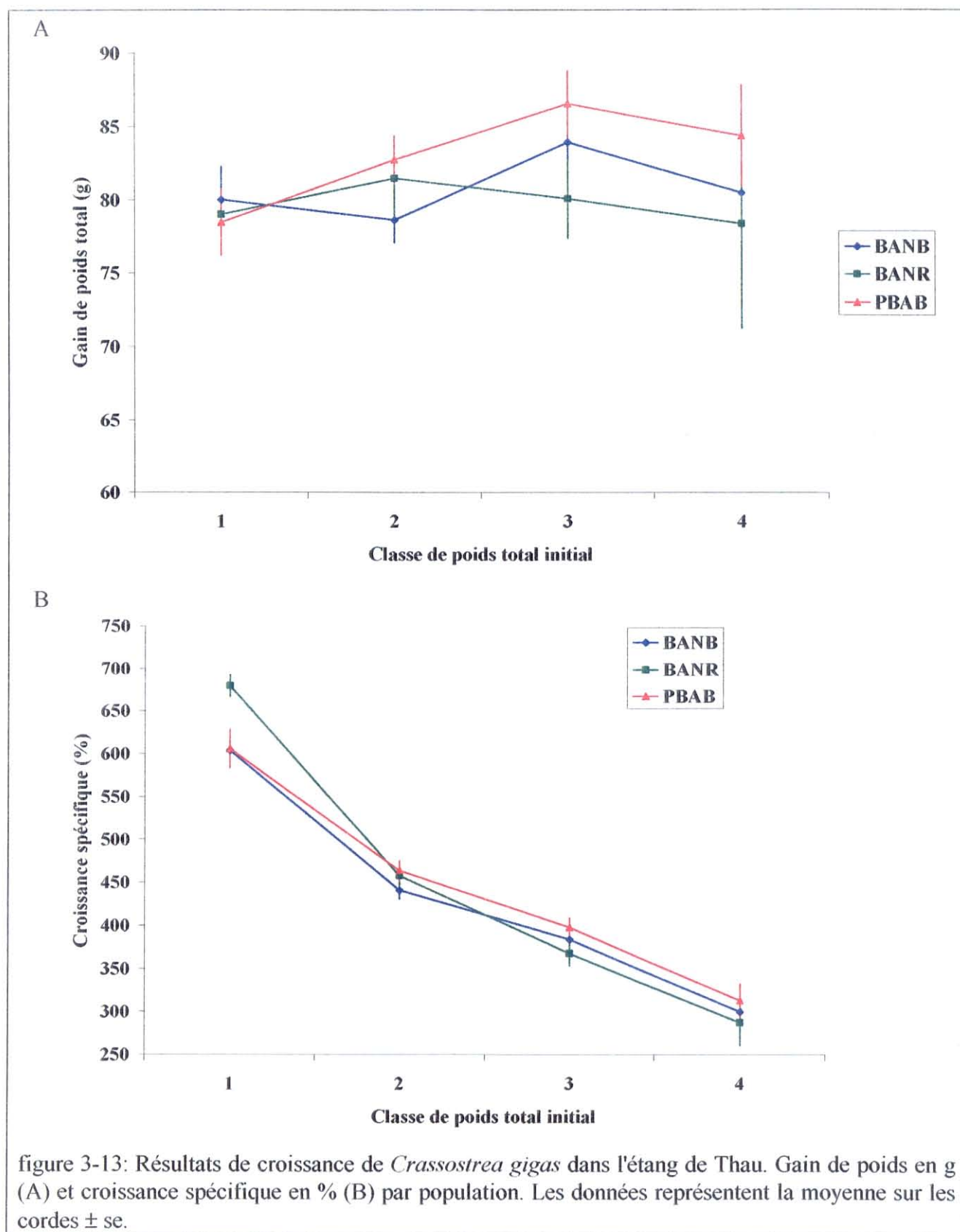


figure 3-12: Relation entre le poids total, initial et final, chez *Crassostrea gigas* élevée dans l'étang de Thau. Chaque point représente la valeur moyenne d'une corde. La relation est très significativement linéaire et explique 57 % de la variabilité totale.



Une autre explication serait l'existence d'une biomasse au delà de laquelle la fonction de filtration serait affectée: les gros individus sur une corde constituerait un niveau de compétition intra-spécifique plus important que le même nombre de petits individus sur une corde. Ainsi, la compétition engendrée par les petits individus n'affecterait pas la filtration et donc la croissance des classes 1, 2 et 3, d'où une vitesse de croissance moyenne à peu près croissante (figure 3-13). La gamétogénèse peut également être un élément d'explication: le suivi de Bouin est fait sur 3 mois hors période de reproduction et à une température trop basse pour le développement de gamètes (16 °C). Cependant, le suivi dans l'étang de Thau est fait sur presque une année en condition naturelle où la maturation se fait normalement. Les gros individus (classe 4) auraient pu consacrer une énergie plus importante pour la reproduction que les petits (classes 1 à 3). La conséquence serait un retard de croissance des gros individus par rapport aux petits, se répercutant sur le poids final.

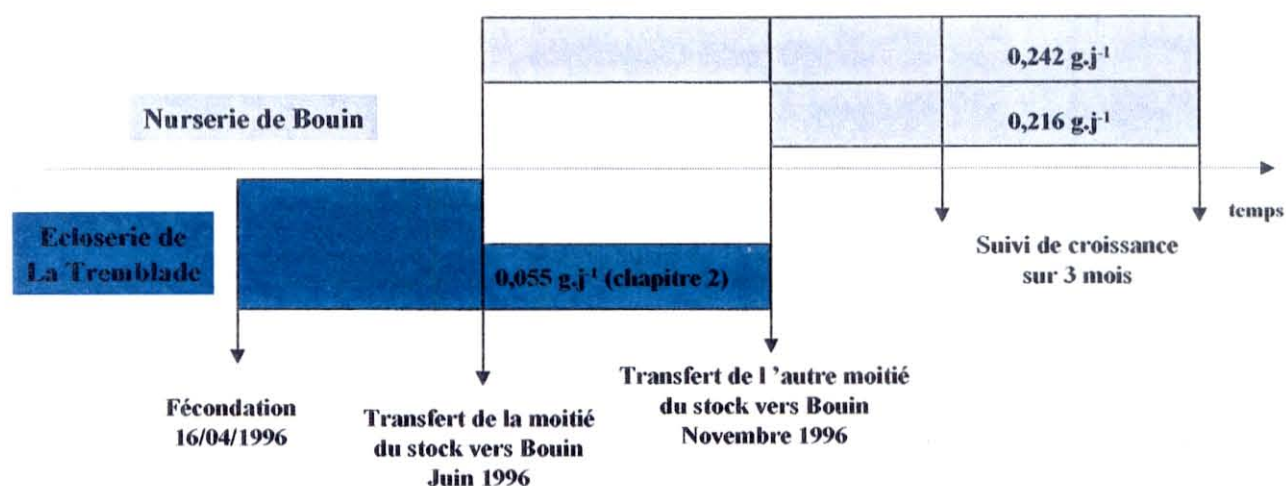
La croissance dite spécifique, qui est la part de gain par rapport au poids total initial, varie négativement avec le poids initial. Ce dernier résultat est évident étant donné la liaison entre ces 2 variables, mais il est néanmoins intéressant car il montre qu'un petit individu grossit plus vite proportionnellement qu'un gros individu. Ce résultat est d'autant plus fort que le suivi fait dans l'étang de Thau confirme cette tendance. Cependant, ce phénomène observé dans un très grand nombre d'espèces, n'a aucun rapport avec le phénomène de compensation pour la croissance défini au chapitre 2 et se caractérisant par une relation négative entre la vitesse de croissance (et non la croissance spécifique) et le poids de l'individu.

Les courbes de croissance individuelles sont strictement parallèles et ne se croisent pas, démontrant encore l'absence de toute compensation pour la vitesse de croissance au moins sur la durée de l'expérience, 3 mois.

4.2. *Effet de la population et du parcours de pré-grossissement*

Le site de pré-grossissement affecte de manière significative, plusieurs mois après, la vitesse de croissance chez *Crassostrea gigas*. La différence entre l'écloserie de La Tremblade et la nurserie de Bouin repose sur le phytoplancton utilisé et sur la qualité de l'eau. Pour l'écloserie de La Tremblade, l'eau provenant de l'estuaire de la Seudre est traitée par décantation, double filtration et supplémentation en phytoplancton. La nurserie de Bouin utilise de l'eau de mer suppléementée en phytoplancton avec des débits beaucoup plus importants qu'à La Tremblade. Les conditions de stockage des huîtres à La Tremblade avant le transfert sont très différentes du suivi de croissance exposé au chapitre 2. En effet, les densités étaient assez importantes, indéterminées mais identiques

pour tous les lots. On peut estimer la vitesse de croissance à La Tremblade de l'ordre de $0,055 \text{ g.j}^{-1}$ et l'historique de l'élevage peut se résumer comme suit:



L'historique d'élevage modifie donc la vitesse de croissance mesurée en fin d'expérience. Il est possible que les taux de mortalité soient différents entre les deux sites d'élevage. Il a été mis en évidence un effet positif de la mortalité sur la croissance au chapitre 2: les individus à plus faible croissance subissent plus l'effet de la mortalité que les individus à plus forte croissance. Lorsque les deux lots sont séparés, si la mortalité à Bouin est plus forte qu'à la Tremblade, les survivants auront une vitesse de croissance plus importante. Cependant, au chapitre 2, la mortalité était de cause inconnue et, dans cette hypothèse, les mortalités à La Tremblade et à Bouin sont supposées provoquer les mêmes effets sur la croissance des huîtres, ce qui ne peut pas être vérifié ici.

Il est possible que les individus stockés à La Tremblade n'aient pas pu exprimer tout leur potentiel de croissance. Les individus ainsi "réprimés" se retrouvent ensuite dans un milieu leur permettant d'exprimer leur croissance maximale.

4.3. Effet du niveau de densité d'élevage

Les résultats de ce suivi individuel de croissance chez *Crassostrea gigas* quantifient de manière précise l'effet d'une baisse de nourriture disponible dans le milieu due à la compétition inter individuelle. Le taux de prise varie de manière monotone avec la densité dans la gamme de valeurs de l'expérience: 495 individus par bac donnent un taux de prise de 18 %, 3144 individus par bac donnent un taux de 72 %. Une valeur de densité intermédiaire (1462 individus par bac) donne un taux de prise intermédiaire (50 %).

La littérature est assez pauvre en études précises sur les effets de la densité en milieu contrôlé malgré que cette dernière représente un des paramètres influençant le plus le résultat

économique d'une éclosérie. Quelques travaux mettent en évidence un effet négatif de la densité sur la croissance des bivalves dans le milieu naturel (Murawski et Fogarty, 1984; Menesguen et Dreves, 1987; Peterson et Beal, 1989; Vincent *et al.*, 1989).

En revanche, la relation entre la densité et la vitesse de croissance n'est pas linéaire mais serait plutôt du type "en plateau" avec une biomasse-seuil au-delà de laquelle la vitesse de croissance diminue: les densités 495 et 1462 individus par bac donnent exactement les mêmes vitesses de croissance alors qu'avec 3144 individus par bac, on diminue significativement la vitesse de croissance. La densité seuil se situe entre 1462 et 3144 individu par bac.

Un résultat également intéressant est que le niveau de densité modifie la relation entre vitesse de croissance et taille initiale. Ce résultat est cohérent avec les conclusions de Jarayabhand et Newkirk (1989), sur *Ostrea edulis*, où un effet semblable a été mis en évidence avec également une relation négative entre le niveau de densité d'élevage et la vitesse de croissance. Cependant, contrairement à ces auteurs, les résultats montrent que l'impact du niveau densité d'élevage sur la croissance relative ne dépend pas de la taille des individus: en condition de forte densité, la vitesse de croissance diminue de 30 % quelle que soit la taille des individus, par rapport aux conditions de faible densité. En conséquence, la densité d'élevage agit de manière identique sur les gros comme sur les petits individus. Par conséquent, dans notre expérience, le prélèvement de nourriture par les compétiteurs est homogène et se répercute instantanément sur la concentration en phytoplancton. Sheridan (1997) suggérait, qu'à forte densité, une huître pouvait avoir une croissance plus faible lorsqu'elle étaient adjacente à une huître de forte croissance par rapport à une huître à faible croissance. Les résultats présents montrent que de telles interactions de proximité n'existent pas dans les conditions d'une nurserie expérimentale. Dans d'autres conditions, Peterson et Beal (1989) ont montré, dans des suivis de croissance chez *Mercenaria mercenaria*, que la réduction de croissance entre un lot à faible densité (10 individus par m²) et un lot à forte densité (80 individus par m²) était de 18 % pour les individus de taille 6 cm et de 10 % pour ceux de 3 cm. En d'autres termes, la croissance des gros individus est presque deux fois plus affectée par une forte densité que celle des petits individus. La compétition intra spécifique est un phénomène complexe qui ne se résume pas uniquement à une baisse de quantité de nourriture disponible. En effet, les interactions entre les individus au sein d'un bac ou d'une poche d'élevage sont nombreuses: des micro variations au niveau des sels nutritifs, des quantités de nourriture, de matières particulières en suspension (remise en suspension des biodépôts), peuvent exister au niveau d'un bac d'élevage. Cependant, dans tous les dispositifs d'élevage utilisés dans ce chapitre et dans le chapitre 2, le milieu est brassé en permanence par un système d'aération et les animaux lavés quasiment quotidiennement. De telles




pratiques homogénéisent le milieu de manière à ce que les petits individus soient dans des conditions similaires aux gros individus, rendant négligeables les effets de voisinage. Le stress engendré par la promiscuité des animaux peut également être en lui même une cause de perturbation de la croissance. Seul le dispositif d'élevage utilisé au chapitre 2 peut permettre de s'affranchir des interactions entre individus.

La dispersion de taille peut être quantifiée par le coefficient de variation. La variabilité du poids total diminue en fonction de la densité. Ce résultat est cohérent avec des observations chez d'autres groupes d'animaux (Wilbur et Collins, 1973; Purdom, 1974; Malecha, 1977; Brett, 1979; Doyle et Talbot, 1986). Cependant, la baisse du coefficient de variation en fonction de l'âge des individus est plus difficile à interpréter. Une telle diminution avait été également observée au chapitre 2 mais pouvait être facilement interprétée par la mortalité. Dans le cas présent, la mortalité de 2,25 % ne peut expliquer une baisse de 7 % dans le coefficient de variation. Le coefficient de variation diminue moins fortement chez les individus maintenus en forte densité d'élevage. Cet effet de la densité sur le niveau de variabilité confirme les observations de Jarayabhand et Newkirk (1989) et Smith *et al.* (1995). A terme, la forte densité d'élevage maintient la variabilité de la taille en éclosérie.

4.4. Constance dans le temps des performances de croissance

Cette expérience montre que plus 80 % du poids final d'un animal de 1 an et demi est expliqué par son poids 3 mois auparavant. Ceci confirme encore le fait que la croissance chez *Crassostrea gigas* est extrêmement stable (Chapitre 2). Cette stabilité n'est absolument pas altérée par des densités élevées en compétiteurs et montre que la croissance chez *Crassostrea gigas* est un caractère fortement déterminé par le génotype. On retrouve le même résultat dans les mêmes populations élevées dans l'étang de Thau, lorsque l'on raisonne sur la moyenne par corde: le poids à 1 an est très bien corrélé au poids à 2 ans chez *Crassostrea gigas*. Un suivi individuel est néanmoins nécessaire pour valider ce résultat. Toro et Newkirk (1990b) ont trouvé chez *Ostrea chilensis* des corrélations de l'ordre de 82 % entre le poids total à 14 mois et de le poids total à 26 mois. Cependant les corrélations ne sont pas toujours aussi élevées dans la littérature. Newkirk (1981) obtient des coefficients beaucoup plus faibles chez *Ostrea edulis* et conclue que la taille des juvéniles n'est pas un bon estimateur de la croissance adulte. D'après les données des chapitres 1 et 2, la variabilité pour la taille s'acquiert très tôt durant les premiers mois de croissance, puis, si les conditions sont maintenues identiques pour tous les individus, les vitesses de croissance se maintiennent tout le long du stade adulte.

Bilan - Synthèse

-  Existence d'une densité seuil au-delà duquel la vitesse de croissance est affectée.
-  L'effet de la densité d'élevage sur la vitesse de croissance est indépendant de la taille: la vitesse de croissance avec 66 kg de compétiteurs est de 30 % plus faible que celle avec 0 ou 33 kg de compétiteurs, quelle que soit la taille des animaux
-  Stabilité de la croissance très forte dans le temps, quel que soit le niveau de densité à Bouin et en milieu naturel riche (étang de Thau).

TROISIEME PARTIE

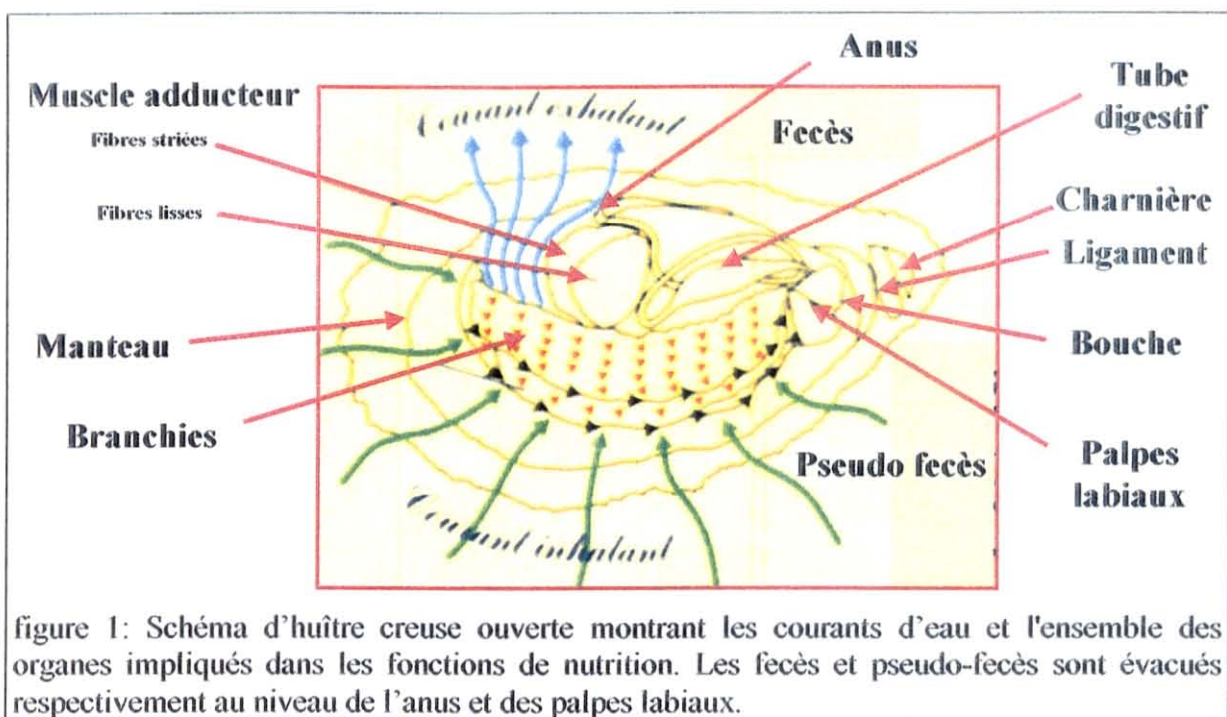
Physiologie

Introduction

1. Définitions et rappels morphologiques

Plusieurs paramètres caractérisent les différentes étapes de la nutrition des bivalves. La **rétenction** qualifie la soustraction des particules du milieu par le filtre branchial, quantifiée par le pourcentage de rétenction, proportion de particules prélevées du milieu par l'animal. L'entrée de la nourriture dans le tube digestif par l'orifice buccal est l'**ingestion**. Une partie de la nourriture retenue n'est pas ingérée mais rejetée sous forme de pseudo-fécès: c'est le phénomène de **réjection**. Une partie de la nourriture ingérée traverse la barrière intestinale: c'est l'**absorption**, l'autre partie se retrouve sous forme de fécès: c'est l'**égestion**.

La plupart des bivalves sont capables d'arrêter toute alimentation et consommation d'oxygène. L'**activité** de filtration ou de consommation d'oxygène désigne l'état de l'animal qui respectivement filtre ou consomme de l'oxygène.



2. Les bivalves, des organismes filtreurs

L'huître fait partie du type trophique des filtreurs ("suspensive feeders", voir classification des bivalves de Reid, 1971) se nourrissant en filtrant les particules contenues dans l'eau de mer naturelle. Elle est également capable d'absorber directement la matière organique dissoute par les cellules en contact avec le milieu extérieur (Bamford et Gingles, 1974; Héral *et al.*, 1984). La rétenction des particules en suspension se fait par agglomération à

du mucus sécrété par des cellules spécialisées. Des courants ciliaires au niveau des branchies et des palpes labiaux dirigent les particules soit vers l'orifice buccal pour les particules sélectionnées soit vers des voies de rejet. Les particules évacuées au niveau des palpes labiaux et des branchies se retrouvent écartées de la cavité palléale sous forme de pseudo-fèces. Les adaptations morphologiques des branchies et des palpes labiaux chez les bivalves ont été résumées par Yonge (1949), Purchon (1968) et Pohlo (1973).

Le contrôle de la quantité et de la qualité de la nourriture absorbée se fait par des variations du volume d'eau filtrée, du degré de sélection des particules (processus pré-ingestifs) et par des modifications dans les processus de digestion et d'absorption de la nourriture incluant la sélection au niveau du tube digestif ou la modification des enzymes digestives (processus post ingestifs). Le tri particulière a été mis en évidence chez quelques espèces de bivalves (Kjørboe et Moehlenberg, 1981; Shumway *et al.*, 1985; Bougrier *et al.*, 1997a; Ward *et al.*, 1997; Raby *et al.*, 1997; Bacon *et al.*, 1998) par l'étude de la classe de taille ou l'espèce préférentiellement filtrée. Ce tri pré-ingestif se fait au niveau des branchies (préférence alimentaire) et au niveau des palpes labiaux (Bougrier *et al.*, 1997a).

La relation entre la filtration ou l'ingestion est fonction de la concentration en phytoplancton disponible dans le milieu environnant. En condition de forte concentration en particules, les études expérimentales montrent une diminution de la filtration et par conséquent de l'ingestion (Widdows *et al.*, 1979, Bayne et Newell, 1983; Van Haren et Kooijman, 1993). Il existe également une concentration seuil en dessous de laquelle la consommation est nulle. Foster-Smith (1975), en comparant la filtration et la production de pseudo-fèces de 3 espèces de bivalves soumis à des concentrations variables de phytoplancton, a montré qu'il existait une concentration seuil pour la production de pseudo-fèces (pour revue, Bayne et Newell, 1983).

Pour des concentrations de phytoplancton plus élevées que le seuil de production de pseudo-fèces, la quantité de pseudo-fèces augmente rapidement avec la concentration, entraînant un taux d'ingestion relativement constant (Foster-Smith, 1975). Des études complémentaires ont montré que la ration ingérée est plus riche en matières organiques que la nourriture disponible dans le milieu (Kjørboe *et al.*, 1980; Defossez et Hawkins, 1997). L'animal est ainsi capable de contrôler à la fois la quantité de nourriture ingérée mais aussi la qualité de celle-ci.

3. Bioénergétique

Le bilan énergétique d'un organisme découle des lois fondamentales de la thermodynamique (Kleibern, 1961; Wiegert, 1968). En considérant l'animal comme un système à l'état stationnaire, la quantité d'énergie consommée s'écrit:

$$C = P + R + F + PF + U$$

C est l'énergie contenue dans les particules retenues par les branchies, F est l'énergie contenue dans les fèces, PF est l'énergie contenue dans les pseudo-fèces, U est l'énergie excrétée (urine, mucus), R est l'énergie équivalente aux pertes de chaleur et à la consommation d'oxygène, P est l'énergie accumulée sous forme de tissus somatiques, produits de reproduction, sécrétions rémanentes (coquille) et non rémanentes (mucus) et tissus éliminés (Winberg, 1956; Ricker, 1968). L'énergie absorbée, notée A, est l'énergie consommée moins l'énergie perdue sous forme de biodépôts, fèces et pseudo-fèces.

La quantité $A - R - U$, également appelée "Scope For Growth" (SFG) ou espérance de croissance, informe sur l'état physiologique de l'animal. Si le SFG est positif, l'acquisition globale d'énergie est supérieure aux dépenses énergétiques, l'animal peut ainsi augmenter sa masse corporelle en augmentant la masse de ses tissus somatiques, reproducteurs ou de réserve. Si le SFG est négatif, l'acquisition d'énergie est trop faible face aux dépenses énergétiques: l'animal est obligé de puiser dans ses réserves au détriment de la croissance. Si les réserves s'épuisent avant que les conditions environnementales soient modifiées et que le SFG redevienne positif, l'animal meurt.

L'espérance de croissance s'est avérée être bien corrélée à la croissance réelle chez certaines espèces de Bivalves (*Mytilus edulis*: Riisgard *et al.*, 1981; Okumus et Stirling, 1994; *Mya arenaria*: Gilfillan et Vandermeulen, 1978; *Ostrea edulis*: Beiras *et al.*, 1994). Dans la plupart de ces travaux, les analyses sont faites en population plutôt qu'individuellement et sur des animaux issus du milieu naturel.

En fonction des ressources trophiques disponibles, différents schémas d'allocation de l'énergie entre maintenance, croissance et reproduction existent selon les espèces (Jokela et Mutikainen, 1995). Certaines études ont montré que la reproduction est sacrifiée au profit de la maintenance et de la croissance somatique (*Mytilus edulis*: Bayne *et al.*, 1983; *Placopecten magellanicus*: MacDonald et Thompson, 1985). Cependant ce n'est pas une règle générale et une série d'études sur *Chlamys islandica* (Vahl 1978, 1981 a, b et c) a montré que la règle de priorité était, dans l'ordre décroissant: maintenance, reproduction et croissance somatique.

La croissance d'un organisme est déterminée par son génotype (voir revues par Newkirk 1980, 1983b) et par l'intermédiaire de facteurs physiologiques qui déterminent l'acquisition (consommation, ingestion et absorption) et la dépense d'énergie (maintenance, croissance et la reproduction). Ainsi, certaines études sur la relation entre hétérozygotie aux locus allozymiques et croissance montrent qu'une des bases physiologiques de la forte croissance des hétérozygotes est une énergie de maintenance plus faible (Diehl *et al.*, 1986; Koehn et Shumway, 1982; Hawkins *et al.*, 1986; 1989; Jorgensen, 1992; Bayne et Hawkins, 1997; Toro *et al.*, 1996a) ou une ingestion plus importante (Garton, 1984; Holley et Foltz, 1987; Hawkins *et al.*, 1989). Les fonctions physiologiques sont dépendantes à la fois de facteurs intrinsèques tels que la taille ou les conditions de reproduction, et de facteurs externes tels que la température ou la quantité de nourriture disponible (Bayne et Newell, 1983; Bougrier *et al.*, 1995).

Ces paramètres ont souvent été utilisés pour quantifier l'état d'un animal sujet à un stress (Sobral et Widdows, 1997; Widdows et Johnson, 1988; Bardouil *et al.*, 1996; Widdows *et al.*, 1995; Ward, 1982; Donkin *et al.*, 1997), pour caractériser des espèces ou populations (Labarta *et al.*, 1997; Diettman et Ford, 1991; Fisher *et al.*, 1996; Iglesias *et al.*, 1996; Okumus et Stirling, 1994), pour caractériser l'influence d'un milieu naturel particulier (Hawkins *et al.*, 1998; 1996) ou pour étudier les conséquences d'une pathologie (Wildish *et al.*, 1998; Paynter, 1996; Choi *et al.*, 1989; Camacho *et al.*, 1997).

L'activité est aussi depuis longtemps reconnue comme étant un facteur influençant les performances physiologiques (voir revue de Shumway, 1982; Bayne et Newell, 1983). Cette donnée est cependant très peu utilisée dans le calcul des bilans énergétiques.

3.1 Paramètres de filtration des mollusques filtreurs: terminologie

Les termes de l'écophysiologie des bivalves sont souvent ambigus ou redondants (Anonyme, 1987). De plus, les termes français et anglais sont souvent différents. Il convient donc de préciser le vocabulaire utilisé avec son équivalent anglo-saxon ainsi que les unités utilisées. Le tableau 1 donne les principaux paramètres physiologiques avec leur équivalent anglo-saxon, utilisés dans les bilans énergétiques des bivalves marins. Les termes FR, RR, ER, IR et AR sont exprimés en mg.h^{-1} et concernent une masse sèche totale par unité de temps. Par extension, avec les mêmes unités, on définit les équivalents pour la partie inorganique (préfixe I: IFR, IRR, IER, IIR et IAR) et pour la partie organique (préfixe O: OFR, ORR, OER, OIR et OAR).

tableau 1: Vocabulaire, unités et définitions en écophysiologie des bivalves.

Sigle	Terme anglais	Terme français	Unité	Définition
CR	Clearance Rate	filtration	l.h^{-1}	Volume théorique épuré à 100 % de toute particule par unité de temps
FR	Filtration Rate	consommation	mg.h^{-1}	Quantité de nourriture consommée par unité de temps
RR	Rejection Rate	production de pseudofèces	mg.h^{-1}	Quantité de pseudofèces produite par unité de temps
ER	Egestion Rate	production de fèces	mg.h^{-1}	Quantité de fèces produite par unité de temps
IR	Ingestion Rate	ingestion	mg.h^{-1}	Quantité ingérée par unité de temps
AR	Absorption Rate	absorption	mg.h^{-1}	Quantité absorbée par unité de temps
OCR	Oxygen Consumption Rate	consommation d'oxygène	$\text{mg O}_2.\text{h}^{-1}$	Quantité d'oxygène consommée par unité de temps
SFG	Scope For Growth	espérance de croissance	J.h^{-1}	Energie potentiellement utilisable pour la croissance
PIM	Particle Inorganic Matter	matière minérale particulaire	mg.l^{-1}	Concentration du milieu en matière particulaire minérale
POM	Particle Organic Matter	matière organique particulaire	mg.l^{-1}	Concentration du milieu en matière particulaire organique
TPM	Total Particle Matter	matière totale particulaire	mg.l^{-1}	Concentration du milieu en matière particulaire

La terminologie anglo-saxonne est la plus couramment utilisée et la plus pertinente. Elle sera utilisée tout au long de cette partie (chapitres 4 et 5).

Les paramètres physiologiques sont dépendants de facteurs intrinsèques dont la taille (Teissier, 1937). En effet, la filtration est étroitement dépendante de la surface du filtre branchial comme le montrent les études comparées entre espèces ou entre populations de bivalves (Meyhoefer et Riisgaard, 1979; Winter, 1977; 1978; Meyhoefer, 1985; Lei *et al.*, 1996). Cependant, il est également probable que des caractéristiques biométriques plus complexes tels que le volume et la surface d'absorption du tube digestif, la taille des palpes labiaux, ... influencent les fonctions physiologiques et expliquent les relations allométriques couramment observées. Le relation entre la taille et le paramètre physiologique Y s'écrit $Y = a.(DW)^b$ avec DW, la taille (poids sec), a et b étant des coefficients. Le coefficient b décrit la relation entre le paramètre et la classe de taille de l'animal. Le coefficient a décrit le paramètre pour une huître standard théorique de 1 g de poids sec. La littérature montre une grande variation dans les coefficients (Bayne et Newell, 1983; Jorgensen, 1990; Jones *et al.*, 1992). Très peu d'études physiologiques au niveau individuel ont été reportées. La raison principale est la variabilité considérable qui existe entre les individus de la même espèce, de

la même origine, du même âge et élevés dans les mêmes conditions (chapitre 4). Cette variabilité inter individuelle très forte peut elle-même être associée à l'activité des animaux qui n'est en général pas prise en compte dans les bilans énergétiques. Foster-Smith (1976) a étudié les différentes possibilités pour un bivalve de réguler son activité d'alimentation, le plus courant étant la fermeture des valves, comme observée chez de nombreuses espèces (Brand et Roberts, 1973).

La périodicité du comportement chez les bivalves filtreurs a été étudiée à de nombreuses reprises dans le passé. Les premières études ont concerné l'activité valvaire des huîtres (Higgins, 1980). La plupart de ces études tentait de relier l'activité valvaire à la consommation de nourriture. Loosanoff et Nomejko (1946) ont montré que les huîtres consomment du phytoplancton en moyenne 94,3 % de leur temps. Cependant, Galtsoff (1964) a obtenu des valeurs plus faibles, de l'ordre de 71 %. Les différences peuvent être expliquées, comme le suggère Higgins (1980), par le fait que les mesures de Loosanoff et Nomejko ont été faites dans le milieu naturel alors que celles de Galtsoff ont été faites en laboratoire. Par la suite, de nombreuses études ont tenté de corrélérer l'activité valvaire avec des variables telles que l'alternance jour-nuit et/ou le rythme des marées (Salànki, 1964, Morton, 1970). Certains ont trouvé des effets significatifs, d'autre non (Higgins, 1980). Plus récemment, l'effet de la quantité de nourriture disponible dans le milieu sur l'activité valvaire a été testé. Higgins (1980) a montré que des juvéniles de *Crassostrea virginica* étaient actives 94 % de leur temps lorsqu'ils étaient nourris contre 35 % en situation de jeûn. D'autres travaux ont concerné la réponse à des stress tels que la température (His, 1972), des quantités faibles d'Oxygène (Famme et Kofoed, 1980) ou des pH faibles (Pynnönen et Huebner, 1995).

L'évolution au cours du temps des performances physiologiques a précédemment été étudiée en population chez *Chlamys farreri*, *Mytilus edulis* et *Cerastoderma edule* et montre une saisonnalité marquée (Bayne et Newell, 1983; Smaal *et al.*, 1997; Bougrier *et al.*, 1995). L'effet de la saison sur les paramètres physiologiques a été étudié par groupe chez *Chlamys farreri*. Il semble que la température soit le paramètre majeur impliqué dans l'effet de la saison. Dans cette étude, les mesures ont été faites par groupe et sur des individus différents (Kuang *et al.*, 1997). Cependant, aucune étude de ce type au niveau individuel sur les bivalves marins n'a été effectuée à ce jour. L'effet des saisons sur les performances de croissance est évident et bien documenté mais l'étude individuelle de la constance dans le temps des performances physiologiques est très importante dans l'étude d'une population destinée à un programme de sélection basé sur des critères physiologiques. Le problème de la sélection génétique basée sur des critères physiologiques est l'identification des individus les plus

intéressants. Ces performances doivent être stables dans le temps, comme les performances de croissance dont la stabilité est mise en évidence aux chapitres 2 et 3, pour être utilisables dans un schéma d'amélioration génétique.

3.2 Méthode expérimentale d'estimation des paramètres physiologiques

Différents dispositifs expérimentaux permettent la mesure de ces paramètres physiologiques. Deux catégories de systèmes existent: le système statique et le système en flux laminaire.

Dans le système statique, l'animal est dans un système stagnant de volume V . La concentration de microalgues en suspension au début de l'expérience est mesurée (C_1). Cette concentration diminue pour atteindre une valeur C_2 au bout d'un temps t . Le débit de filtration est estimé par $CR (l.h^{-1}) = V \cdot (\ln C_1 - \ln C_2) / t$ (Coughlan, 1969). Ce système de mesure est facile à mettre en œuvre mais repose sur l'hypothèse que le débit de filtration ne varie pas en fonction de la concentration de phytoplancton. Pendant le temps t de l'expérience, les biodépôts (fèces et pseudo-fèces) sont prélevés séparément et quantifiés pour estimer RR et ER .

Dans le second dispositif, l'animal est dans une enceinte de mesure traversée par un débit plus ou moins important, laminaire pour éviter toute remise en suspension des biodépôts avant prélèvement et pour que le mélange eau et particules phytoplanctoniques alimente régulièrement l'animal (Beiras *et al.*, 1993; description à figure 2).

La concentration de phytoplancton dans l'enceinte est constante. Deux méthodes d'estimation du taux de filtration existent:

- La méthode dite classique et la méthode des biodépôts (Hawkins *et al.*, 1996; Urrutia *et al.*, 1996). La méthode classique nécessite la mesure de la concentration à l'entrée et à la sortie du bac expérimental (respectivement C_e et C_s) et du débit (d) maintenu le plus constant possible tout au long de l'expérience. Le "Clearance Rate" est alors estimé par $CR (l.h^{-1}) = d \cdot (C_e - C_s) / C_e$.
- La méthode des biodépôts (Iglesias *et al.*, 1996; Hawkins *et al.*, 1996) s'appuie sur une hypothèse fondamentale qui est une absorption nulle du matériel inorganique par l'animal. Ce type d'approche nécessite uniquement la mesure de la concentration à l'entrée du bac expérimental. La partie inorganique joue le rôle d'un traceur et permet d'estimer le taux de filtration par le rapport de la quantité de matière inorganique rejetée dans les biodépôts par unité de temps sur la concentration en matière inorganique disponible dans l'eau de mer, soit $CR (l.h^{-1}) = (IRR + IER) / PIM$, avec IRR et IER désignant respectivement le taux

de réjection (sous forme de pseudo-fèces) et d'égestion (sous forme de fèces) de la matière inorganique et PIM, la concentration en matière inorganique dans l'eau de mer.

A partir de l'estimation du taux de filtration par une des méthodes décrites ci-dessus, tous les paramètres nutritionnels peuvent se déduire (tableau 2).

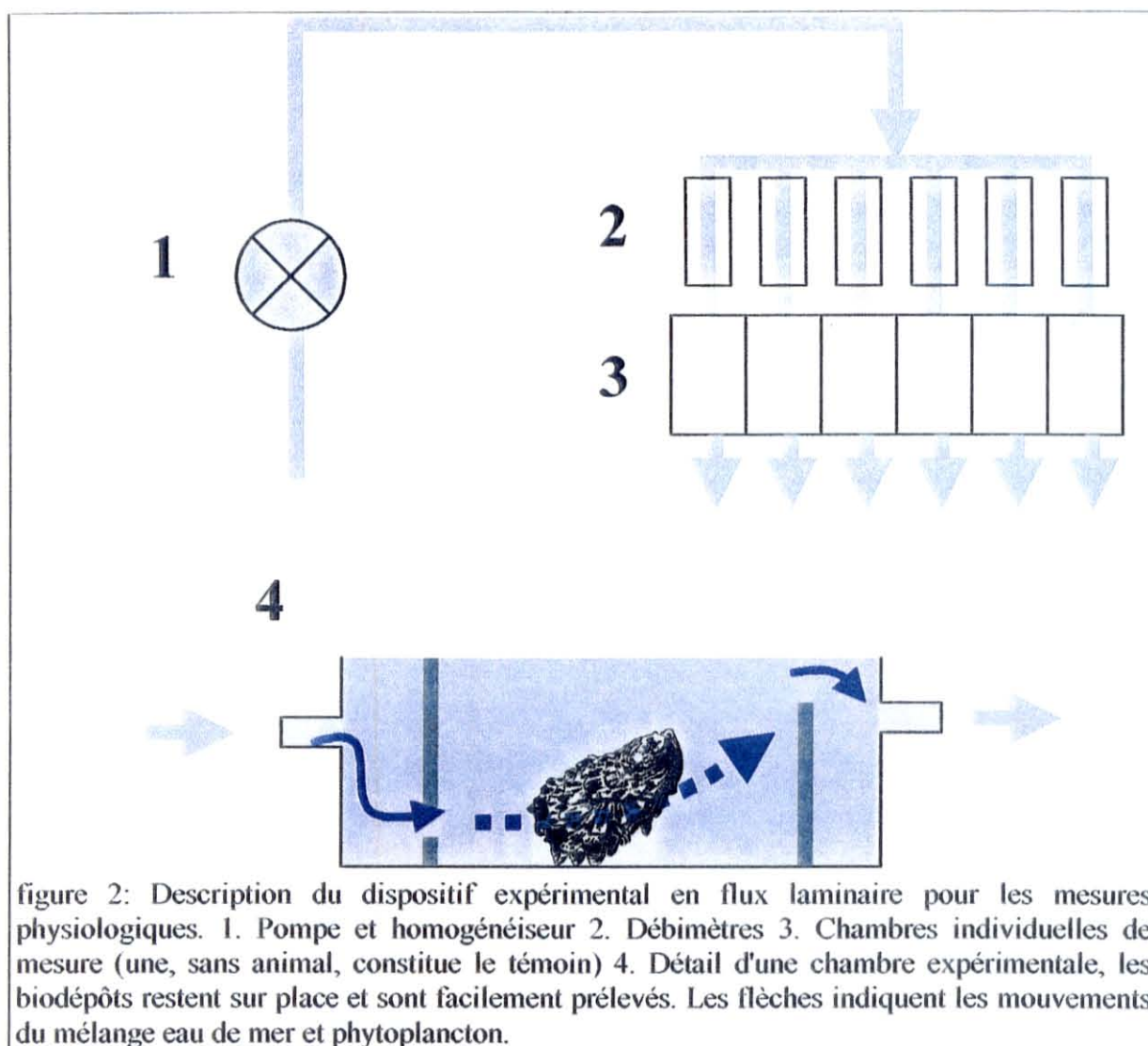


figure 2: Description du dispositif expérimental en flux laminaire pour les mesures physiologiques. 1. Pompe et homogénéisateur 2. Débitmètres 3. Chambres individuelles de mesure (une, sans animal, constitue le témoin) 4. Détail d'une chambre expérimentale, les biodépôts restent sur place et sont facilement prélevés. Les flèches indiquent les mouvements du mélange eau de mer et phytoplancton.

tableau 2: Paramètres estimés selon les deux méthodes. Le terme anglais scope for growth correspond à l'espérance de croissance.

Méthode classique			Méthode biodépôts
Filtration	CR	(Pourcentage de rétention) x Débit	Consommation Inorganique / PIM
Consommation	C	(Entrée - Sortie) x Débit	CR x TPM
Ingestion	IR		C - RR
Absorption	AR		I - ER
Scope for growth SFG		AR - OCR (en terme d'énergie)	

Chapitre 4

**Performances physiologiques d'une population d'huîtres creuses
Crassostrea gigas obtenue en éclosérie, en milieu à très faible charge
phytoplanctonique.**

1. Introduction

La croissance a été étudiée dans des conditions de nourriture *ad libitum* (chapitre 2) et limitantes (chapitre 3, suivi de croissance à Bouin). La forte biomasse du cheptel ostréicole dans le bassin de Marennes-Oléron en fait un site d'élevage où la quantité de nourriture est limitante. Il est intéressant d'étudier les conséquences physiologiques de telles conditions sur les organismes et en particulier sur leur capacité d'acquisition et de dépense de l'énergie. En éclosérie il est facile de mimer des conditions de nourriture limitante. Un premier dispositif a été décrit au chapitre 3 avec l'utilisation d'une biomasse de "compétiteurs" pour diminuer indirectement la quantité de nourriture disponible.

La population "G1 5X5" a montré une très forte dispersion pour la vitesse de croissance (chapitre 2) en condition de nourriture *ad libitum*. Un échantillon de cette population a été placé dans des conditions où la quantité de nourriture est maintenue à un faible niveau, en dessous du seuil de production de pseudo-fèces. Les fonctions physiologiques ont été mesurées individuellement.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

Parmi les descendants des croisements intra population 5X5 (chapitre 1), un échantillon de 75 animaux a été tiré au sort parmi les populations Arcachon (arc, $n = 25$), Bonne Anse (ba, $n = 25$) et Port des Barques (pdb, $n = 25$). Ces individus font partie du lot S défini au chapitre 2 et ont été suivis pour leur croissance depuis l'âge de 3 mois après la fécondation.

2.2. Dispositif expérimental

Un système en circuit fermé couplé à un filtre biologique a été utilisé pour contrôler plus facilement la température et la quantité de nourriture. Le dispositif expérimental est schématisé à la figure 4-1. Le filtre biologique a étéensemencé naturellement 1 mois avant le début de l'expérience pour que l'équilibre entre les formes minérales azotées (nitrite et nitrate) s'établisse. La température de l'eau du bac expérimental a été fixée à 15 °C et la concentration en phytoplancton (*Skeletonema costatum*) a été maintenue par addition de solution concentrée pour atteindre un niveau de TPM de l'ordre de 2 mg.l⁻¹, au dessous du seuil de production des pseudo-fèces. Les animaux ont été préalablement acclimatés pendant 2 semaines aux conditions expérimentales et les mesures ont été effectuées en juin 1997, avant la ponte.

2.3. Méthode des biodépôts

Les paramètres physiologiques ont été déterminés par mesures ponctuelles sur les animaux actifs. Un système à flux laminaire, décrit précédemment par Anonyme (1987) et Beiras *et al.*, (1993), a été utilisé (voir introduction de la partie III). Les paramètres physiologiques ont été calculés par la méthode des biodépôts (Urrutia *et al.*, 1996) sur une période de 6 heures. La terminologie anglo-saxonne sera utilisée dans la suite (cf introduction).

Les échantillons d'eau collectés à la sortie d'un bac expérimental contenant une coquille vide (témoin de sédimentation) ont été filtrés sur filtres GF/C 47 mm (Watman) préalablement incinérés et pesés, rincés à l'eau distillée, séchés à 60 °C dans une étuve pendant 24 heures, pesés et incinérés dans un creuset calorifère (450 °C pendant 4 heures) avant d'être pesés à nouveau. De cette manière on calcule le "Total Particulate Matter" (TPM, mg.l⁻¹), le "Particulate Inorganic Matter" (PIM, mg.l⁻¹). Le "Particulate Organic Matter" (POM, mg.l⁻¹) est estimé par la différence entre TPM et PIM.

Les fèces produits par chaque animal ont été collectés et traités, après remise en suspension, comme décrit ci-dessus pour les échantillons d'eau. L'"Egestion Rate" (ER, mg.h⁻¹), l'"Inorganic Egestion Rate" (IER, mg.h⁻¹) et l'"Organic Egestion Rate" (OER, mg.h⁻¹) ont été déterminés respectivement par la matière organique totale présente dans les fèces.

En supposant que le matériel inorganique n'est pas absorbé à travers le tube digestif (hypothèse majeure de la méthode des biodépôts, Urrutia *et al.*, 1996), IRR + IER est considéré égal à l'"Inorganic Filtration Rate" (IFR, mg.h⁻¹). Le "Clearance Rate" est estimé par CR (l.h⁻¹) = IFR/PIM. Le "Filtration Rate" est calculé par FR (mg.l⁻¹) = CR.TPM, et l'"Organic Filtration Rate" par OFR (mg.h⁻¹) = CR.POM. En absence de production de pseudo-fèces, l'"Ingestion Rate", IR (mg.h⁻¹), est égal à FR et l'"Organic Ingestion Rate" OIR (mg.h⁻¹) est égal à OFR. L'"Absorption Rate" et l'"Organic Absorption Rate" sont calculés respectivement par AR (mg.h⁻¹) = IR - ER et OAR (mg.h⁻¹) = OIR - OER. L'"Absorption efficiency" est défini par le rapport des quantités de matières absorbées et ingérées (Ae = OAR/OIR).

L'"Oxygen Consumption Rate" (OCR, mg O₂.h⁻¹) est mesuré dans une enceinte close de 350 à 1000 ml selon la taille de chaque animal. L'OCR est estimé par le taux de décroissance de la concentration d'oxygène dans l'enceinte de mesure, mesurée par une sonde oxymétrique (Orbisphère).

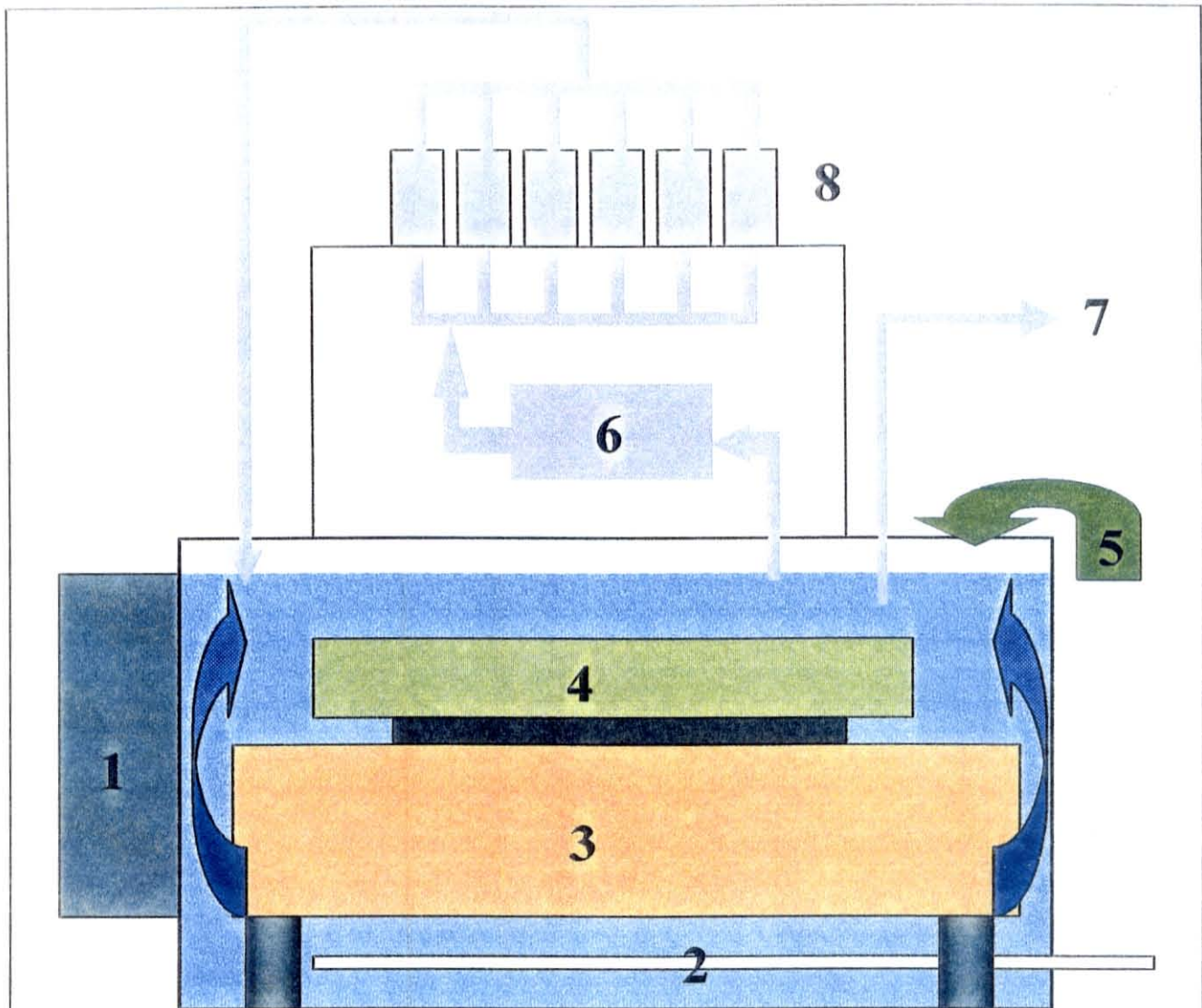


figure 4-1: Dispositif expérimental (coupe) pour le maintien des animaux et l'estimation des paramètres physiologiques chez *Crassostrea gigas*. 1. Système de régulation de la température, 2. Rampe d'aération et de brassage de l'eau, 3. Filtre biologique, 4. Huîtres, 5. Arrivée de phytoplancton (*Skeltonema costatum*), 6. Homogénéisateur, 7. Vers le dispositif de mesure de consommation d'oxygène, 8. Stands de mesure en flux laminaire.

Pour prendre en compte les larges différences entre la taille des animaux, les réponses physiologiques ont été standardisées à celles d'une huître équivalente de 1 g de poids de chair sèche selon Bayne et Newell, (1983). Le paramètre standardisé est défini par $Y_s = (W_s/DW)^b \cdot Y_e$ avec W_s le poids sec de l'huître standard (1g), DW le poids sec de l'animal (g), Y_e le paramètre mesuré et b le coefficient d'allométrie de 0,44 pour les processus nutritionnels et 0,80 pour la consommation d'oxygène, les deux déterminés par Bougrier *et al.* (1995). L'ensemble des individus a été disséqué pour des analyses génétiques et physiologiques ultérieures. Par conséquent, il n'a pas été possible d'accéder directement au poids sec de l'animal. Un échantillon de 30 individus par population a été maintenu dans les mêmes conditions que l'échantillon expérimental. Au début des mesures, ces

individus ont été pesés, disséqués, déshydratés (Lyophilisateur CRIST) puis leur poids sec déterminé. La relation statistique obtenue entre poids total et poids sec a été utilisée pour estimer le poids sec (DW) des individus mesurés à partir de leur poids total (TW).

Enfin, le "scope for growth", ou espérance de croissance, est estimé par $SFG (J.h^{-1}) = A - R$, où A et R sont respectivement l'absorption organique et la consommation d'oxygène exprimées en unité d'énergie: $A (J.h^{-1}) = AOR.20,132$ et $R (J.h^{-1}) = 14,147.OCR$. Les valeurs 20,132 et 14,147 sont les facteurs énergétiques de conversion respectivement pour l'absorption (Valeur énergétique de 1 mg de *skeletonema costatum*, Whyte, 1987) et pour la consommation d'oxygène (Valeur énergétique de 1 mg d'O₂, Bayne *et al.*, 1985). La croissance théorique (mg.j⁻¹) peut enfin être estimée à partir du "scope for growth" en considérant la valeur énergétique du tissu sec d'huître équivalente à 20 J.mg⁻¹ (Héral et Deslous-Paoli, 1983).

L'activité de nutrition des animaux a été suivie toutes les 15 minutes en observant l'état de l'animal (fermé ou ouvert) et la production ou non de biodépôts pendant toute la période de mesure. On définit l'Activité de Filtration (AF) par le pourcentage de temps d'activité. Le RTA (Bougrier *et al.*, 1998) est estimé à 0,86 pour tous les individus. Ces auteurs ont en effet montré qu'une huître issue du milieu naturel consomme de l'oxygène en moyenne 86 % de son temps d'immersion.

Le Scope For Growth (SFG) sans tenir compte de l'activité est calculé par $SFG1 (J.h^{-1}) = A - R$. Le SFG corrigé pour l'activité est calculé par $SFG2 (J.h^{-1}) = A*AF - 0,86*R$.

2.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel SAS (SAS Institute, 1988). Les régressions, analyses de variance et de covariance ont été faites par la procédure SAS GLM. Les comparaisons multiples ont été faites par le test de Student-Newman-Keuls (Einot et Gabriel, 1975).

3. Résultats

3.1. Croissance

Les vitesses moyennes de croissance par population sont de $0,079 \pm 0,009$, $0,125 \pm 0,011$ et $0,102 \pm 0,007$ g.j⁻¹ respectivement pour les populations d'Arcachon, Bonne Anse et Port des Barques. Les courbes de croissance sont bien conservées dans le temps et les pentes de croissance sont variables (figure 4-2).

3.2. Estimation des poids secs

La relation entre poids sec et poids total est significativement dépendante de la population ($P = 0,01$). En conséquence, l'analyse a été faite séparément, et une relation par population a été obtenue (figure 4-3). Le poids sec (DW) s'exprime en fonction du poids total (TW) par $0,031.TW - 0,127$, $0,023.TW - 0,056$ et $0,025.TW - 0,025$ respectivement pour les populations Arcachon, Bonne Anse et Port des Barques.

3.3. Effet de la population

Aucun des paramètres calculés n'est affecté par la population parentale, excepté le poids total ($P = 0,02$; tableau 4-1). La population n'a pas d'effet sur la consommation d'oxygène, mais la tendance est à la limite du seuil de signification ($P = 0,053$). SFG1 et SFG2 sont négatifs pour les 3 populations. SFG2, qui prend en compte l'activité, a des valeurs plus élevées que SFG1, calculé sans prendre en compte l'activité. Par conséquent, dans les conditions de cette expérience, négliger l'activité dans le bilan énergétique revient à le sous estimer. Bien que l'effet de la population ne soit pas significatif sur le SFG, cette dernière est plus faible pour Arcachon qui est la population la moins performante pour la croissance.

3.4. Effet de la taille

La relation entre consommation d'oxygène et poids sec est très significativement linéaire ($P < 0,0001$; $R^2 = 0,53$; figure 4-4). Aucun modèle non linéaire (en particulier du type $a.DW^b$, Bougrier *et al.*, 1995) n'explique mieux la consommation d'oxygène en fonction du poids sec.

L'"absorption rate" suit également une loi linéaire, positive, en fonction du poids sec estimé ($P = 0,03$; figure 4-5A). Cependant, la très forte variabilité individuelle masque la relation: moins de 10 % de celle-ci est expliqué par le modèle linéaire. Il est possible que deux sous populations se distinguant par leur relation entre AR et le poids sec coexistent. Le "clearance rate" ne suit pas de loi significativement linéaire en fonction du poids sec mais l'explication peut être l'existence de deux sous populations avec des relations différentes (figure 4-5B).

La relation entre l'espérance de croissance et le poids sec est significativement linéaire et négative ($P = 0,009$; figure 4-6). Cette relation signifie que les petits individus sont moins affectés par des conditions limitantes de nourriture que les gros individus. La forte variabilité individuelle peut être interprétée en distinguant 2 sous-populations selon la relation entre espérance de croissance et poids sec, la première positive et la seconde négative.

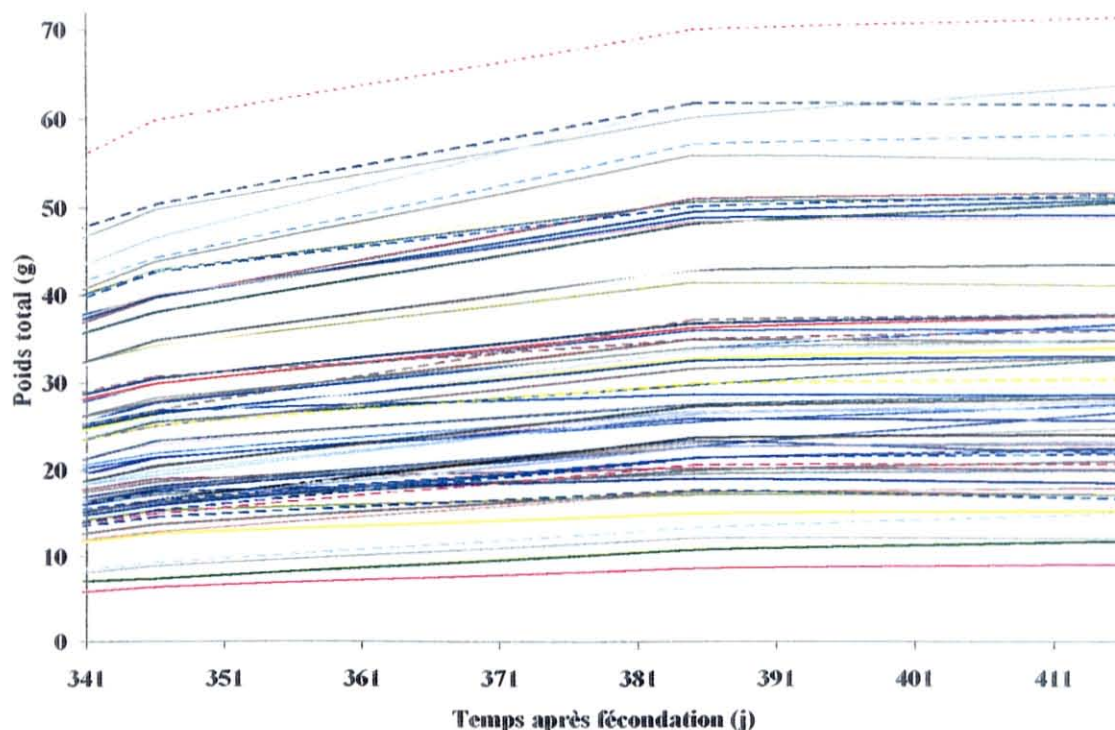


figure 4-2: Courbes de croissance individuelles des 69 individus étudiés montrant la remarquable conservation de la vitesse de croissance. Le dernier point de mesure coïncide avec le début des mesures physiologiques.

La "performance" physiologique peut être quantifiée pour l'huître standard de 1g par le rapport entre l'énergie acquise sur les dépenses d'énergie. Les individus ont ainsi été classés selon le rapport AR/OCR, avec AR et OCR standardisés et exprimés en terme d'énergie. L'absorption standardisée (AR std) et la consommation d'oxygène standardisée (OCR std) sont représentés à la figure 4-7 en fonction du rapport AR/OCR. Ce type de graphique est un moyen de représenter des paramètres standardisés selon la "performance" physiologique des individus. L'absorption varie de manière croissante et à peu près linéaire pour les individus ayant un rapport AR/OCR faible ou moyen. Cependant, pour des valeurs élevées de AR/OCR, cette tendance n'est plus linéaire. De même, la consommation d'oxygène ne montre pas de tendance nette selon le rapport AR/OCR.

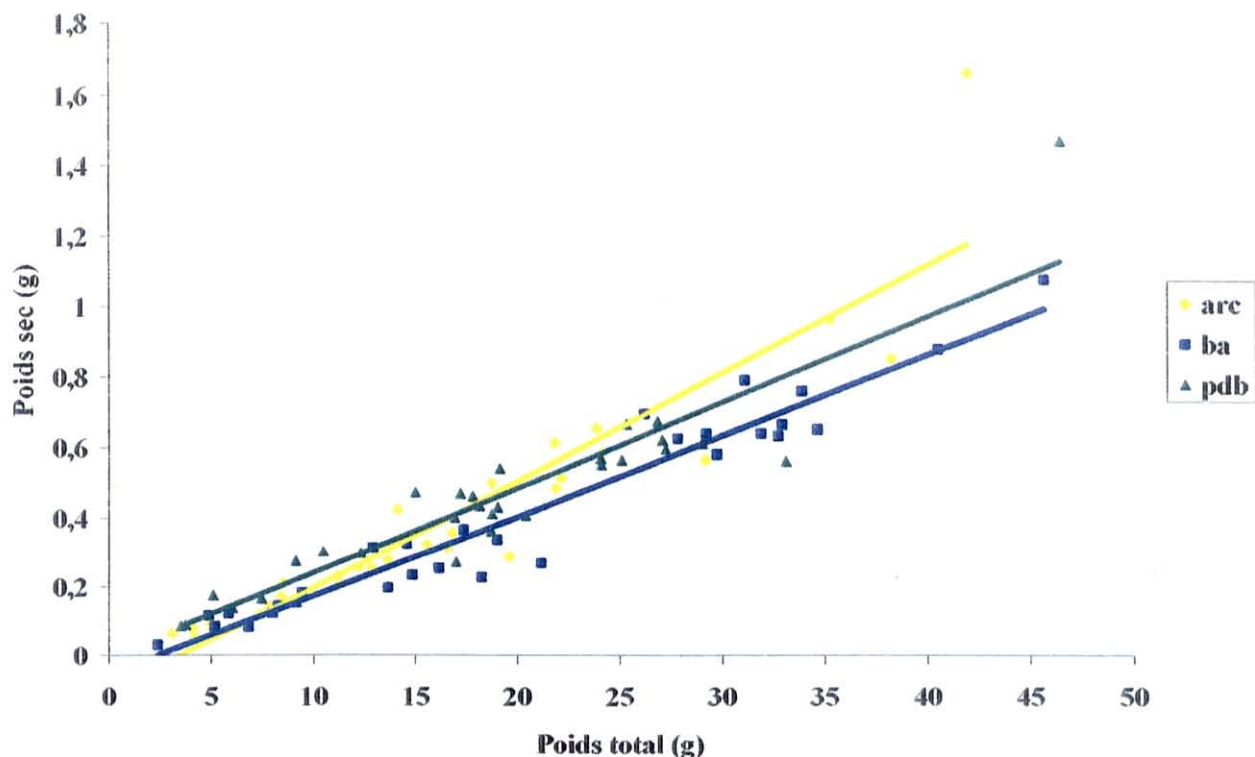


figure 4-3: Relation entre poids total et poids sec pour les 3 populations de *Crassostrea gigas* analysées en physiologie. arc = Arcachon, ba = Bonne Anse et pdb = Port des Barques. Les paramètres de cette relation dépendent de la population ($P = 0,01$).

tableau 4-1: Effet de la population sur les paramètres physiologiques standardisés chez *Crassostrea gigas*. SFG1 est calculé en supposant l'animal actif à 100 % à la fois pour la filtration et pour la consommation d'oxygène. SFG2 est calculé avec RTA = 86 % et AF estimé (voir texte). Les lettres en exposant indiquent les groupes significativement différents entre eux au seuil de 5 %. ARC = Arcachon, BA = Bonne Anse et PDB = Port des Barques. Les données représentent la moyenne \pm SE.

	ARC	BA	PDB	P
TW (g)	25,900 \pm 2,899 ^a	36,784 \pm 3,279 ^b	35,784 \pm 2,646 ^b	0,020
CR (l.h ⁻¹)	1,332 \pm 0,153	1,518 \pm 0,227	1,232 \pm 0,154	0,532
FR (mg.h ⁻¹)	2,103 \pm 0,243	2,493 \pm 0,371	2,162 \pm 0,333	0,647
ER (mg.h ⁻¹)	1,702 \pm 0,203	1,927 \pm 0,302	1,797 \pm 0,269	0,827
IR (mg.h ⁻¹)	2,103 \pm 0,243	2,493 \pm 0,371	2,162 \pm 0,333	0,647
AR (mg.h ⁻¹)	0,401 \pm 0,078	0,566 \pm 0,119	0,364 \pm 0,073	0,270
OCR (mg O ₂ .h ⁻¹)	1,282 \pm 0,105	1,31 \pm 0,094	1,032 \pm 0,047	0,053
SFG1 (J.h ⁻¹)	-10,067 \pm 2,404	-7,128 \pm 2,924	-7,262 \pm 1,610	0,619
SFG2 (J.h ⁻¹)	-7,649 \pm 2,242	-5,123 \pm 2,853	-5,674 \pm 1,600	0,716

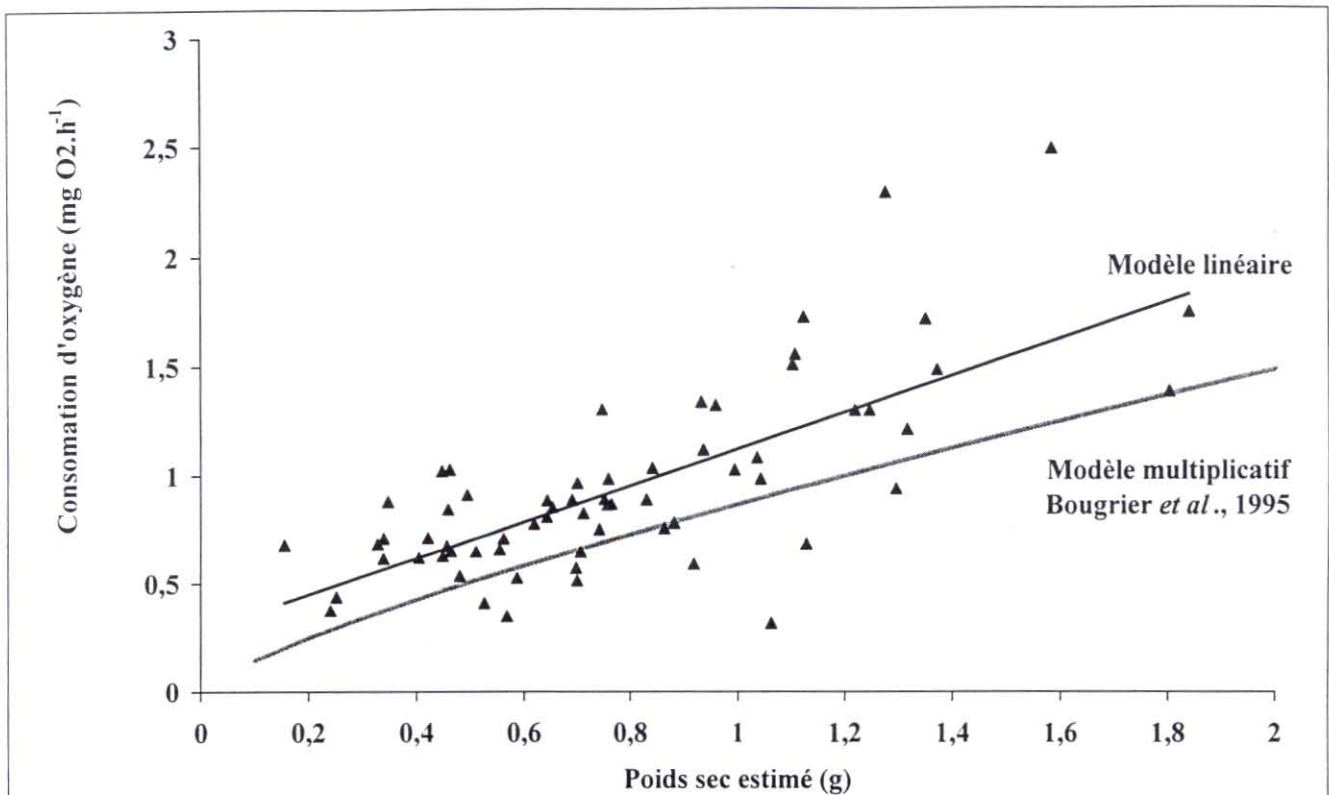
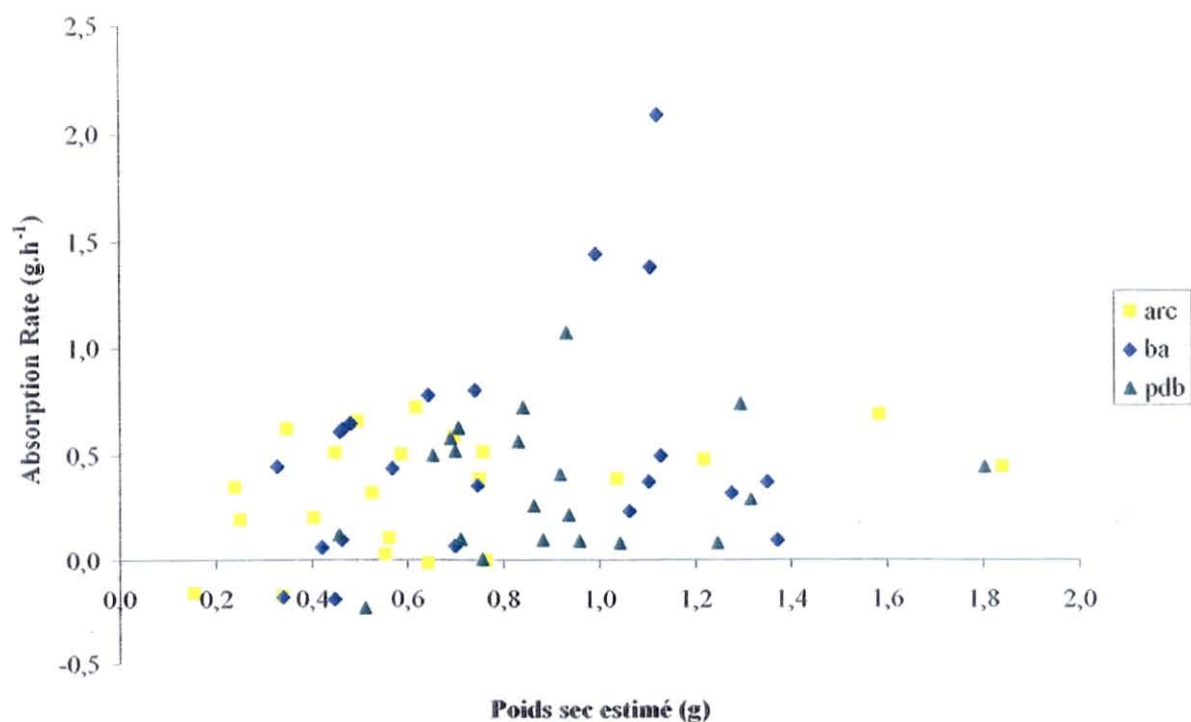


figure 4-4: Taux de consommation d'oxygène en fonction du poids sec estimé chez *Crassostrea gigas*. La relation est significativement linéaire ($P < 0,0001$) et explique 53 % de la variabilité. Le modèle de Bougrier *et al.* (1995) est également représenté pour $T = 15^{\circ}\text{C}$.

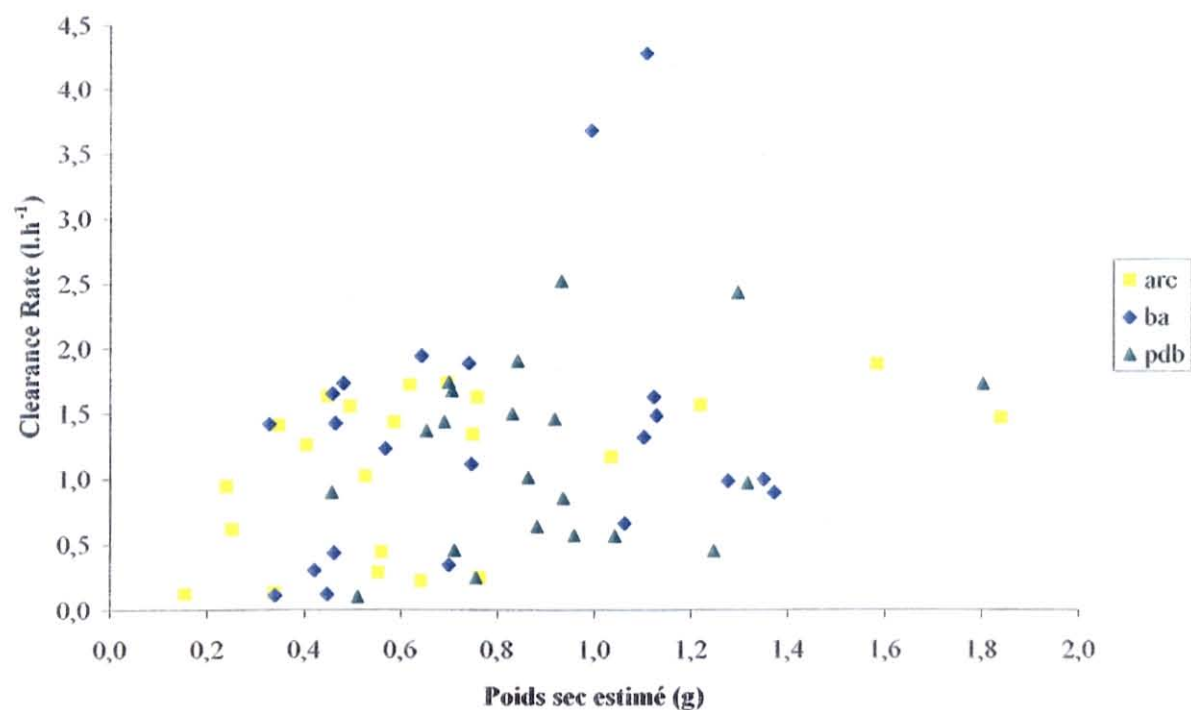
4. Discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre constituent les premières données physiologiques de la littérature au niveau individuel chez *Crassostrea gigas* issue d'écloserie, de même âge et élevée en conditions contrôlées.

La plupart des fonctions physiologiques sont dépendantes de la taille des individus. Les modèles multiplicatifs (exponentiels) se sont avérés les plus aptes pour décrire les variations de consommation d'oxygène et de filtration en fonction de la taille. Cependant, les valeurs des paramètres varient considérablement en fonction du stade de développement des animaux (Gerdes, 1983a, b) et pour le même stade entre les auteurs (Bayne et Newell, 1983). Presque toutes ces études sont basées sur des populations naturelles et donc de classes d'âge différentes, et il est difficile de savoir si la variation observée dépend de la taille, de l'âge ou des deux. Dans les cas extrêmes, Hamburger *et al.* (1983) ont trouvé, chez la moule *Mytilus edulis*, des coefficients allométriques similaires pour la consommation d'oxygène pour les larves pélagiques et les stades juvéniles, mais différents pour les adultes, montrant ainsi l'importance du stade de vie sur l'allométrie des paramètres physiologiques. De plus, les relations allométriques décrites par Hamburger pour un stade donné sont linéaires.



A



B

figure 4-5: Variation de l'absorption rate (A) et du "clearance rate" (B) en fonction de la taille chez *Crassostrea gigas*. ARC = Arcachon, BA = Bonne Anse et PDB = Port des Barques. L'existence de deux sous populations pourrait expliquer la variabilité inter individuelle observée.

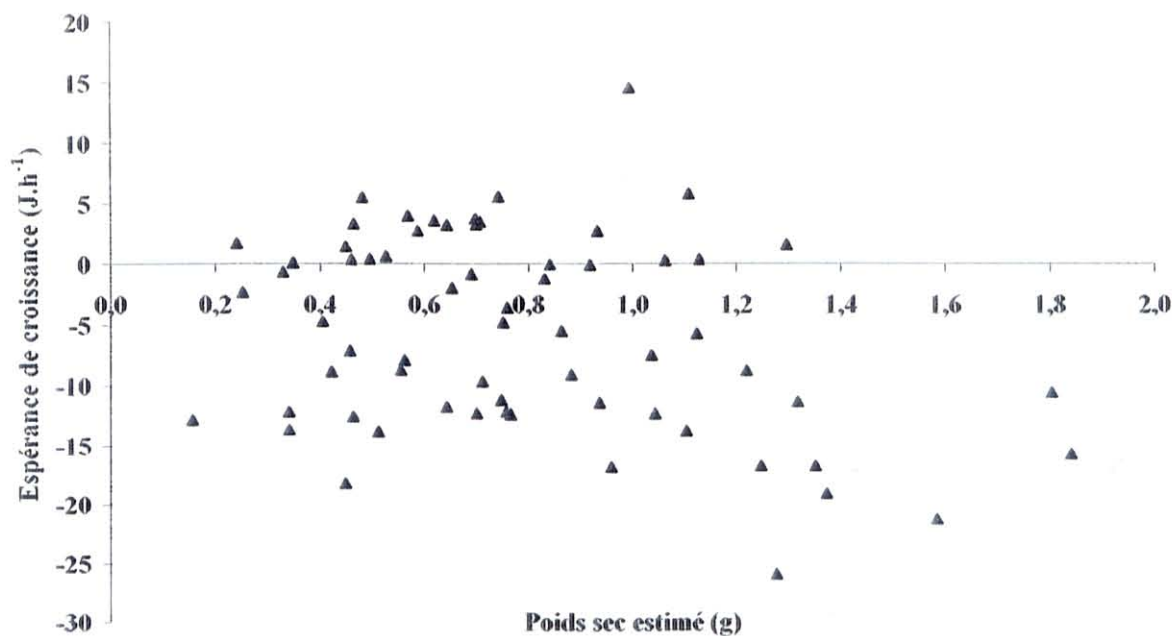


figure 4-6: Espérance de croissance de *Crassostrea gigas* en fonction du poids sec estimé. La relation est significativement linéaire et négative ($P = 0,009$)

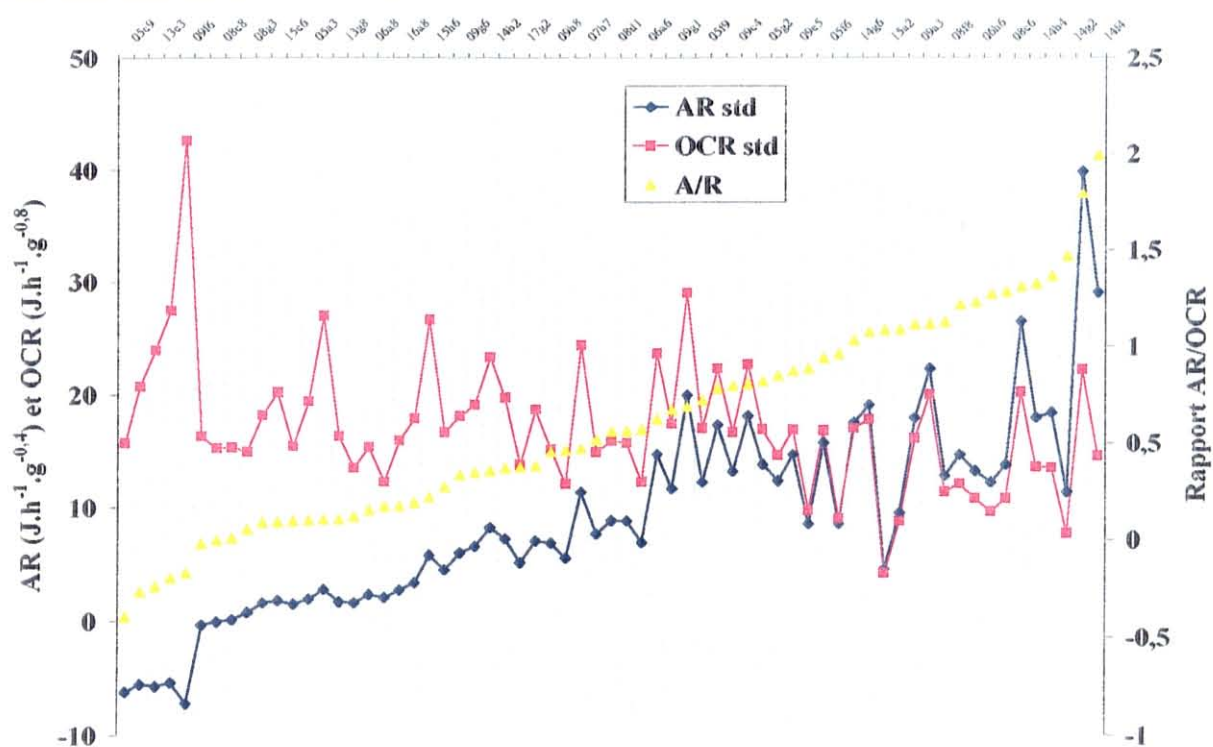


figure 4-7: Absorption et consommation d'oxygène standardisées pour les individus classés selon leur rapport absorption sur consommation d'oxygène.

Dans ce chapitre, la consommation d'oxygène chez *Crassostrea gigas*, mesurée dans des conditions expérimentales particulières, montre clairement une relation linéaire avec le poids sec estimé. Ce résultat est très important car pour la première fois on démontre qu'un individu de petite taille consomme proportionnellement autant d'oxygène qu'un individu de grosse taille. Auparavant, les modèles multiplicatifs décrivant la consommation d'oxygène d'individus issus du milieu naturel impliquaient qu'un petit animal consomme proportionnellement plus d'oxygène qu'un gros animal. Les tentatives d'ajustement à des modèles multiplicatifs classiques sont largement de moins bonne qualité, en particulier ceux déterminés récemment par Bougrier *et al.* (1995). Quelques études basées sur du naissain de populations issues d'écloserie ont montré des relations allométriques atypiques pour la consommation et l'ingestion (Strickland et Dabinett, 1993).

Les conditions de très faibles charges sestoniques sont peut-être la cause de cette relation linéaire atypique. Une acclimatation de 15 jours aurait suffi à modifier la relation habituellement observée dans des conditions de plus forte quantité de nourriture.

La relation entre l'absorption et la taille montre une variabilité considérable entre les individus. Une hypothèse expliquant cette forte dispersion est la présence de deux sous populations ayant des comportements alimentaires différents. Il est impossible de valider statistiquement cette hypothèse avec les données présentées ici mais cette tendance est particulièrement nette sur la relation entre absorption et taille (figure 4-5). Les deux sous populations pourraient se distinguer par une allométrie spécifique: l'une classique, de type multiplicatif, et l'autre de type linéaire comme observée pour la consommation d'oxygène. La population, originellement maintenue dans des conditions trophiques optimales (décrites au chapitre 2), a été acclimatée seulement 15 jours à des conditions trophiques limitantes. Il est possible que la phase d'acclimatation insuffisamment longue ait révélé les deux sous-populations: l'une serait déjà acclimatée aux nouvelles conditions d'élevage (allométrie linéaire) et l'autre non encore acclimatée (allométrie classique, non linéaire), caractéristique des conditions du chapitre 2. Ainsi, l'acclimatation se ferait plus rapidement pour la fonction de consommation d'oxygène (tous les individus montrent une allométrie linéaire) que pour l'absorption (seule, une partie des individus montrent une allométrie linéaire).

L'étude plus détaillée des relations entre taille et espérance de croissance montre cependant que l'absorption a tendance à augmenter avec la taille de l'animal alors que la respiration diminue et cette dernière de manière significative. Par conséquence, les individus performants pour la croissance absorbent globalement plus mais dépensent également moins d'énergie. Ce résultat sera confirmé par la suite au chapitre 5 et va dans le même sens que les études sur les relations entre physiologie et hétérozygotie (Garton *et al.*, 1984; Hawkins, 1995; Toro *et al.*, 1996a) où la meilleure

performance des hétérozygotes s'explique par des ingestions plus élevées ou des dépenses énergétiques plus faibles.




Travailler de façon non destructrice en écophysiologie pose un problème important de standardisation des données. La relation entre poids de chair sèche et poids total a donc été établie sur une population maintenue dans des conditions identiques à celles de la population étudiée. Cette relation est très significativement linéaire comme c'est souvent le cas chez les populations maintenues en laboratoire. Toutefois, le type de croisement affecte significativement les paramètres de cette relation. Ceci peut être expliqué par les différences observées dans les vitesses de croissance entre les populations. En effet il est connu que la vitesse de croissance est un facteur modifiant l'index de condition chez *Crassostrea virginica* et *Argopecten irradians irradians* (Rheault et Rice, 1996).

Le "scope for growth" est négatif pour une grande majorité des individus. Ce résultat indique que les conditions expérimentales (2 mg.l⁻¹ de TPM à 15 °C) ont entraîné une situation de stress physiologique poussant les animaux à puiser dans leur réserves. La période de mesure était trop courte pour détecter une baisse de poids corporel ou des mortalités.

L'espérance de croissance représente la croissance théorique par gramme de poids sec qui est la croissance spécifique théorique. Aux chapitres 2 et 3, l'analyse de la croissance spécifique en fonction de la taille initiale est négative: les petits individus ont un gain de poids relatif plus élevé que les gros individus. Le "scope for growth" en fonction du poids sec estimé montre la même relation négative.

L'estimation visuelle de l'activité de filtration est insuffisante pour corriger de manière acceptable les estimations des paramètres physiologiques. De plus, l'activité de consommation d'oxygène n'a pas été directement mesurée individuellement. La valeur de RTA utilisée dans les calculs (86 %; Bougrier *et al.*, 1997b) a été appliquée à tous les individus, et il est probable qu'une forte variabilité entre les individus existe et influence la valeur de l'espérance de croissance.

Bilan - Synthèse

-  Très forte variabilité inter individuelle des paramètres physiologiques sur une population de même âge et maintenue dans des conditions standards: hypothèse de 2 sous populations
-  Relation allométrique linéaire particulièrement nette pour la consommation d'oxygène.
-  Importance du temps d'activité de filtration et de consommation d'oxygène dans l'estimation des bilans énergétiques

Chapitre 5

Stabilité temporelle des performances physiologiques chez *Crassostrea gigas* au cours d'un cycle annuel: mesures en continu de la filtration et de la consommation d'oxygène

1. Introduction

Au chapitre précédent, il a été conclu que le "scope for growth" individuel comme il est estimé par des mesures discrètes n'est pas un bon estimateur de la croissance individuelle. Il a donc été décidé de développer un dispositif de mesure de la filtration et de la consommation d'oxygène en continu dans le but d'améliorer l'estimation des paramètres physiologiques en tenant compte du degré d'activité des animaux. Le bilan énergétique est en général estimé sur une durée ne dépassant pas quelques heures et l'espérance de croissance est par la suite extrapolée sur une période beaucoup plus longue (le plus souvent 24 heures) en supposant que l'animal est resté actif pendant toute cette période. Xie et Burnell (1995) ont montré chez la palourde *Tapes philippinarum* et *Tapes decussatus* que le niveau des paramètres physiologiques est en général corrélé avec le degré d'activité de l'animal. Cependant, dans cette dernière étude, le degré d'activité est "quantifié" par un score de 0 à 4 basé sur des critères qualitatifs. En fait, la rareté des études physiologiques dans lesquelles le niveau d'activité est pris en compte vient de la grande difficulté d'apprécier le degré d'activité d'un bivalve. En considérant les résultats de Loosanoff et Nomjeko (1946) et d'Higgins (1980), les calculs de bilans énergétiques se font en supposant l'activité aux alentours de 90 % durant l'immersion, d'où une surestimation des paramètres d'acquisition de l'énergie.

Très peu de travaux d'écophysiologie ont été réalisés à partir de mesures individuelles en continu sur des périodes dépassant les 12 heures. Les résultats présentés dans ce chapitre visent à estimer le plus précisément possible le bilan énergétique individuel chez *Crassostrea gigas* à l'aide d'un dispositif de mesure en continu sur 24 heures. La stabilité des composantes du bilan énergétique sera évaluée par l'étude des 30 mêmes individus à 5 reprises. Un indice résumant les 5 mesures de chaque individu sera défini et son utilisation dans un programme d'amélioration génétique sera discuté. La méthode de mesure de la filtration en continu fera l'objet d'un exposé détaillé étant donné son caractère novateur.

2. Matériels et méthodes

2.1 Matériel biologique, calendrier et conditions expérimentales

Un échantillon de 30 animaux de la population de Bonne Anse (Lot S du chapitre 2), a été acclimaté 1 mois avant le démarrage des mesures répétées 5 fois (septembre 1997, octobre 1997, décembre 1997, février 1998 et avril 1998). Ces dates correspondent à des états physiologiques très différents et caractéristiques d'un cycle annuel (automne, hiver et printemps). La température a été maintenue à 10 °C en février, 14 °C en décembre et avril, 18 °C en octobre et 20 °C en septembre.

Le TPM était de 1,95 mg.l⁻¹ en octobre, 3,51 mg.l⁻¹ en février, 3,85 mg.l⁻¹ en décembre, 4,39 mg.l⁻¹ en septembre et 5,80 mg.l⁻¹ en avril.

Le dispositif expérimental est constitué d'un système en circuit fermé alimenté en continu en *Skeletonema costatum* (voir chapitre 4, figure 4-1). Le système utilisé au chapitre 4 a été complété pour la mesure en continu de la filtration. La quantité de nourriture est fixée au delà du seuil de production de pseudo-fèces (conditions *ad libitum* optimales). La température est maintenue constante au cours d'une même série de mesures grâce à un système refroidissant (Bioblock) et des résistances chauffantes (Rena). Entre les mesures, la température a été modifiée à raison de 1 °C par jour pour éviter tout choc thermique. L'analyse des performances physiologiques a été effectuée en continu sur une période de 24 heures à la fois pour la filtration et pour la consommation d'oxygène. Cependant, les systèmes expérimentaux de mesure de la consommation d'oxygène et de la filtration nécessitent des débits incompatibles entre eux, aboutissant à l'impossibilité de mesurer les paramètres de filtration (débits de 150 à 300 ml.mn⁻¹) et de consommation d'oxygène (débits de 15 à 30 ml.mn⁻¹) simultanément sur le même individu. Par conséquent, pour chaque animal, la mesure de la consommation d'oxygène est faite 24 heures avant ou après la mesure de filtration.

La croissance est suivie individuellement sur toute la période d'étude et un stock d'animaux de même origine que le stock expérimental est maintenu strictement dans les mêmes conditions pour établir la relation entre poids total (TW) et poids de chair sèche (DW). Ainsi, à l'issue de chaque série de mesure, 10 animaux sont pesés après égouttage puis disséqués. La chair est lyophilisée (Bioblock, Crist) puis pesée à 0,1 mg près (Sartorius). Le poids sec de chaque individu est estimé à nouveau à chacune des 5 dates de mesure.

2.2 Mesures de consommation d'oxygène en continu sur une période de 24 heures

2.2.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est présenté à la figure 5-1 (Bougrier *et al.*, 1997b). L'animal est maintenu dans une enceinte expérimentale de volume ajusté à sa taille (de 500 à 1200 ml) traversée par un débit d'eau de mer constant (pompe péristaltique, Ismatec, réglée sur 15 à 30 ml.mn⁻¹ dépendant de la taille de l'animal). L'eau transite préalablement dans une colonne de dégazage (Simax) permettant d'éliminer tous les gaz non dissous. La quantité d'oxygène est mesurée en continu à l'aide de sondes oxymétriques (Orbisphère Laboratories) sur enregistreur papier (LKB, Linseis). L'eau dans l'enceinte est constamment homogénéisée par un mélangeur couplé à la sonde à oxygène.

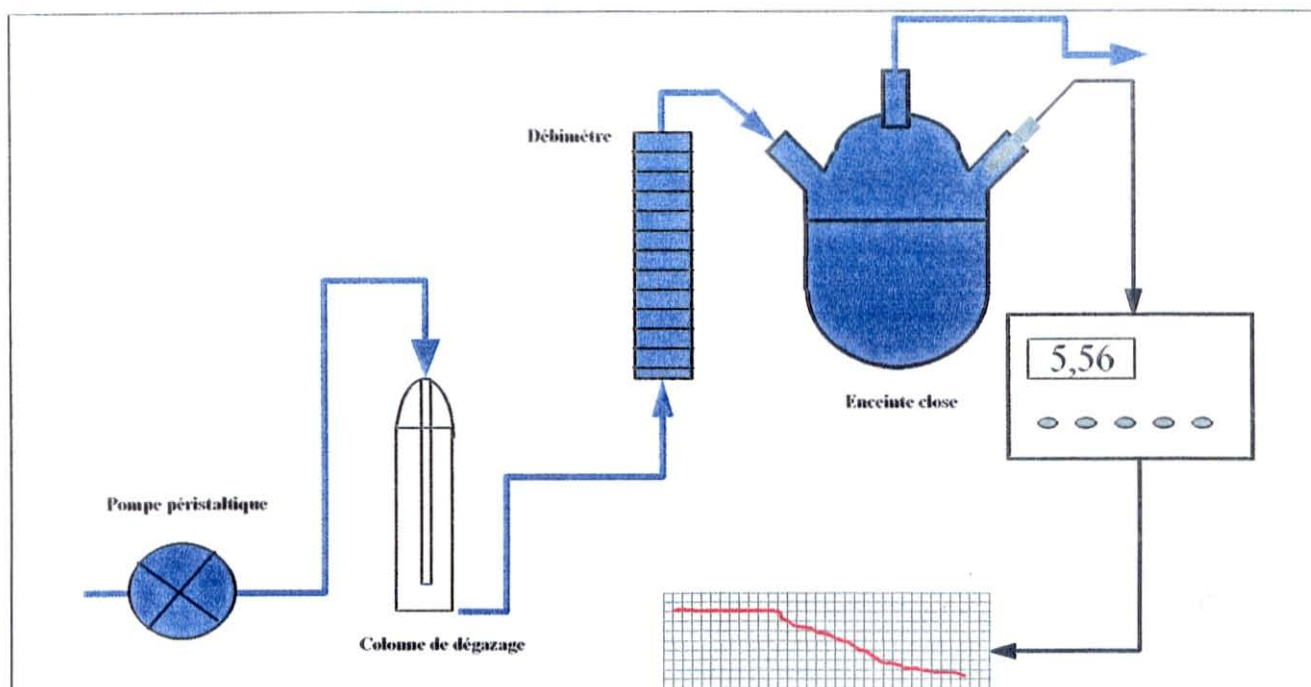


figure 5-1: Dispositif expérimental pour la mesure de consommation d'oxygène en continu sur 24 heures chez *Crassostrea gigas* en laboratoire (Bougrier *et al.*, 1997).

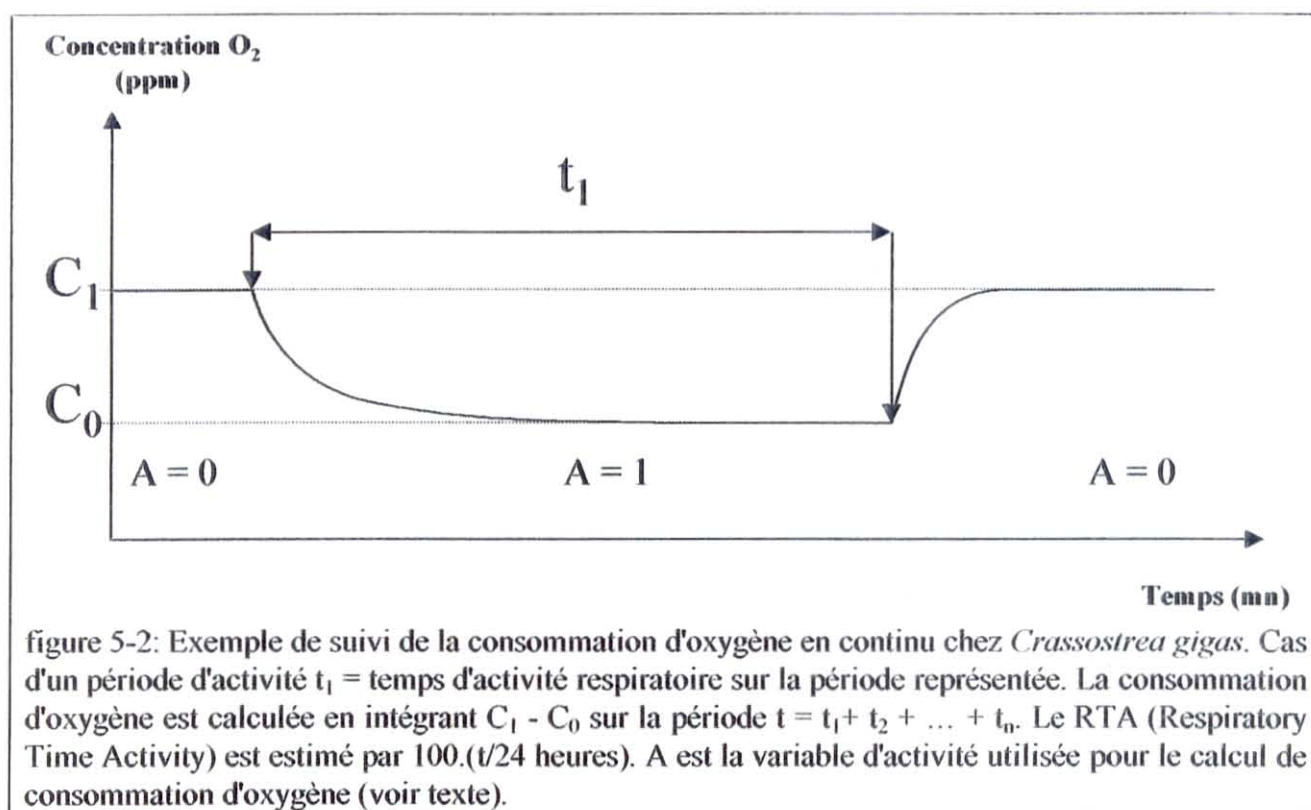


figure 5-2: Exemple de suivi de la consommation d'oxygène en continu chez *Crassostrea gigas*. Cas d'un période d'activité t_1 = temps d'activité respiratoire sur la période représentée. La consommation d'oxygène est calculée en intégrant $C_1 - C_0$ sur la période $t = t_1 + t_2 + \dots + t_n$. Le RTA (Respiratory Time Activity) est estimé par $100.(t/24 \text{ heures})$. A est la variable d'activité utilisée pour le calcul de consommation d'oxygène (voir texte).

2.2.2 Activité respiratoire

Le temps d'activité respiratoire (Respiratory Time Activity ou RTA, défini par Bougrier *et al.*, 1997) est estimé sur une période de 24 heures par le rapport entre le temps total d'activité de l'animal et le temps total de la mesure, le tout multiplié par 100. L'activité respiratoire sur 24 heures

peut comporter plusieurs périodes d'activité. L'exemple d'une période d'activité (figure 5-2) montre l'interprétation en terme d'activité/inactivité des animaux ainsi qu'en terme d'intensité de consommation d'oxygène. Le temps total d'activité de l'animal est la somme des temps respiratoires de chaque période d'activité. Ainsi, sur 24 heures, $RTA = 100 \cdot \frac{t_1 + t_2 + \dots + t_n}{1440}$ avec $t_1, t_2 \dots t_n$ exprimés en minutes. Ainsi, un animal actif en permanence sur la période de 24 heures aura un RTA de 100 % alors qu'un animal totalement inactif aura un RTA de 0 %.

2.2.3 Consommation d'oxygène

L'intensité de la consommation d'oxygène est calculée par intégration sur la période d'activité, graphiquement (figure 5-2): on considère que la concentration en oxygène est constante sur un pas de temps assez petit (6 minutes) ce qui permet d'estimer la consommation d'oxygène élémentaire sur 6 minutes:

$$C_i \text{ (mg O}_2\text{)} = (C_1 - C_0)_i \cdot K \cdot t \cdot d_i$$

avec C_i concentration d'oxygène mesurée au milieu du pas de temps i , C_0 concentration d'oxygène de la ligne de base (concentration d'oxygène basale, sans consommation par l'animal), K facteur correcteur de température, salinité et de pression, t durée du pas de temps (6 minutes) et d_i débit sur le pas de temps i .

La consommation totale d'oxygène sur 24 heures (240 pas de temps) est obtenue par somme des produits des consommations élémentaires C_i par A_i ($A_i = 1$ si l'animal est actif sur le pas de temps i , $A_i = 0$ s'il est inactif)

$$C(\text{mg O}_2 / 24 \text{ h}) = \sum_{i=1}^{240} A_i \cdot C_i$$

Un animal ayant un RTA de 0 % aura également une consommation d'oxygène nulle.

2.3 Mesures de filtration en continu sur une période de 24 heures

2.3.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental décrit au chapitre 4 pour la mesure ponctuelle des paramètres de filtration a été modifié afin de suivre la rétention des cellules phytoplanctoniques par l'animal en continu sur un cycle de 24 heures. Le dispositif expérimental est constitué de 5 compartiments expérimentaux contenant chacun une huître et un compartiment contenant une coquille vide (témoin de sédimentation, figure 5-3). Chacun de ces compartiments est traversé par un flux d'eau de débit maintenu constant. Un automate de filtration, constitué d'une pompe et d'électrovannes à plusieurs

voies, a été mis au point par H. Chartois (CREMA). Le rôle de cet appareil est de prélever automatiquement de l'eau à la sortie des compartiments et de la diriger vers le fluorimètre ou de l'évacuer dans le bac principal. Le fonctionnement est basé sur le cycle suivant:

1. Prélèvement à la sortie du compartiment témoin
2. La pompe achemine l'eau vers le fluorimètre pendant 1 minute
3. Prélèvement à la sortie du compartiment 1
4. La pompe achemine l'eau vers le fluorimètre pendant 1 minute

Après prélèvement à la sortie du compartiment 5, l'automate reprend le cycle à l'étape 1. Ainsi, l'eau de sortie d'un compartiment transite dans le fluorimètre pendant 1 minute toutes les 6 minutes. La quantité de cellules phytoplanctoniques est estimée par mesure de la fluorescence de l'eau de l'échantillon à raison d'une mesure par seconde. L'acquisition est faite sur PC par l'utilisation d'une carte d'acquisition (conversion données analogiques en données numériques) et d'une interface. L'automatisation, en limitant les manipulations, permet de faire un grand nombre de prélèvements d'eau en sortie des bacs expérimentaux, et garantit des conditions identiques de traitement pour tous les échantillons avec un risque de contamination diminué.

Les biodépôts (fèces et pseudo-fèces) sont collectés pendant le cycle de 24 heures à 4 ou 5 reprises, selon la quantité, pour éviter l'encrassement des compartiments de mesure et leur remise en suspension. Leur quantité a été estimée par remise en suspension dans un volume d'eau, filtration et pesée de manière similaire, aux échantillons d'eau. Les débits d'eau transitant dans les bacs expérimentaux sont mesurés et notés régulièrement à l'aide de débitmètres (Gilmont, figure 5-3)

2.3.2 Extraction et pré-traitement des fichiers de données

Les fichiers de données brutes contiennent une liste de valeurs exprimées en unités de fluorimétrie et l'heure de la mesure. A chaque fois que l'automate passe d'un compartiment à un autre, le fluorimètre met 10 à 15 secondes pour se stabiliser. Par conséquent, seules les 30 dernières mesures sont utilisées. Un algorithme permet d'estimer une valeur moyenne à partir de ces 30 mesures et élimine les valeurs aberrantes correspondant le plus souvent au passage de particules solides (biodépôts ou autre) ou bien à des problèmes électriques. La réorganisation des données correspondant à un animal et au témoin permet de visualiser la filtration en fonction du temps pour chaque animal (figure 5-4).

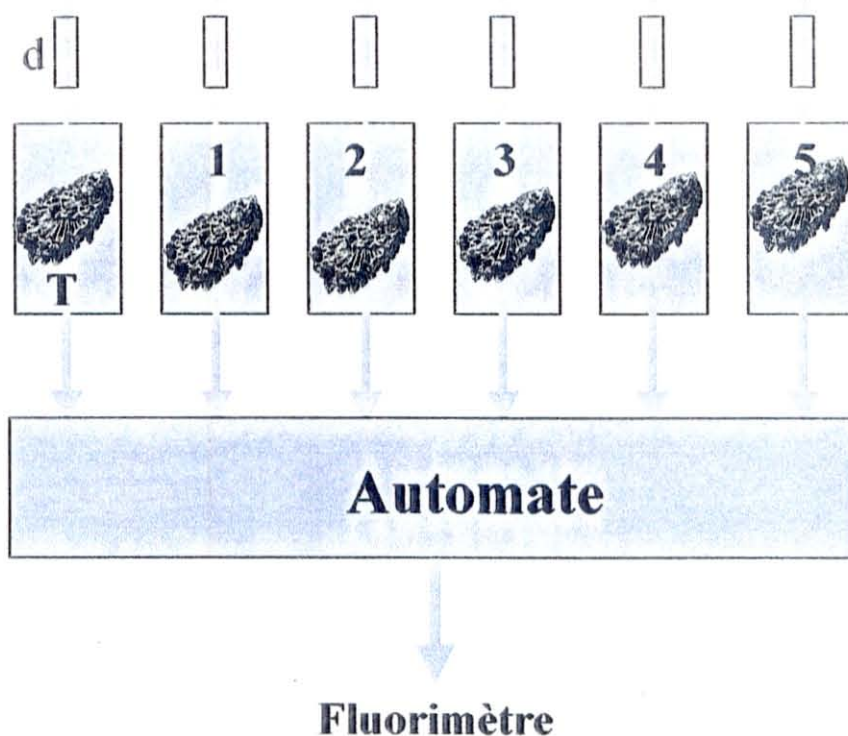


figure 5-3: Dispositif expérimental pour l'acquisition de données de filtration en continu chez *Crassostrea gigas*. L'automate possède des électrovannes permettant de basculer la mesure de fluorescence automatiquement toutes les minutes entre les compartiments (témoin T, coquille vide, et 1 à 5, individus mesurés). d: débitmètre.

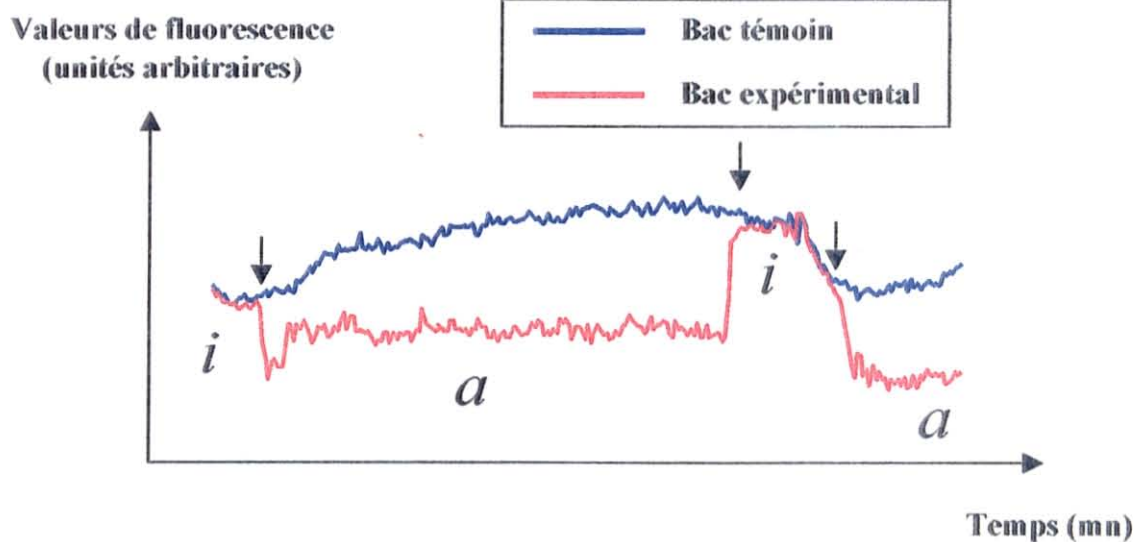


figure 5-4: Représentation graphique de la filtration en fonction du temps chez *Crassostrea gigas*. Les flèches indiquent les changement d'état d'activité de filtration (a = animal actif, i = animal inactif) avec le seuil de 5 % (voir texte).

2.3.3 Relation entre valeurs de fluorimétrie et TPM mesuré

Environ toutes les 3 heures, de l'eau est prélevée à la sortie du bac témoin puis traitée comme décrit au chapitre 4 pour calculer TPM (Total Particulate Matter, mg.l^{-1}) et PIM (Particulate

Inorganic Matter, mg.l^{-1}) puis POM (Particulate Organic Matter, mg.l^{-1}), estimé par la différence TPM - PIM. La relation entre le POM et la valeur de fluorimétrie correspondant à l'échantillon prélevé, permet de convertir les données de fluorimétrie en concentration de matière particulaire (mg.l^{-1}). Cette relation (régression linéaire simple, SAS PROC GLM) est établie de nouveau à intervalles réguliers pour prendre en compte l'encrassement progressif du fluorimètre et les modifications éventuelles de la qualité du phytoplancton.

2.3.4 Activité de filtration (FTA, Bougrier *et al.*, en préparation)

Pour chaque animal, une mesure de quantité de matière particulaire est effectuée toutes les 6 minutes. Le taux de rétention particulaire (R_i) est calculé toute les 6 minutes:

$$R_i = \frac{(F_{t_i} - F_{s_i})}{F_{t_i}}$$

avec F_{t_i} = Valeur de fluorescence mesurée en sortie du compartiment témoin, F_{s_i} = Valeur de fluorescence mesurée en sortie du compartiment contenant l'animal, i = indice de temps variant de 1 à 240 et découpant la période de 24 heures en 240 tranches de 6 minutes.

Ce taux de rétention est utilisé pour déterminer si l'animal est actif ou inactif pour la filtration: on choisit une valeur de taux de rétention seuil égale à 5 %, au delà duquel l'animal est considéré comme actif. Au dessous de 5 %, l'animal est considéré comme inactif pour la filtration, le système de mesure n'étant pas assez sensible pour détecter de trop faibles activités. On définit A_i , état d'activité de l'animal: $A_i = 1$ si l'animal est actif sur le pas de temps i ($R_i \geq 0,05$) et $A_i = 0$ s'il est inactif ($R_i < 0,05$). Le FTA s'écrit donc:

$$\text{FTA} = \frac{100}{1440} \cdot \sum_{i=1}^{240} 6 \cdot A_i$$

Un animal tout le temps actif sur 24 heures aura un FTA de 100 % alors qu'un animal totalement inactif aura un FTA de 0%.

2.3.5 Mesure de la consommation

Les données de fluométrie sont converties en mg.l^{-1} par les relations obtenues au paragraphe 2.3.2. Le débit a été relevé régulièrement au cours de la période de mesure et permet de calculer la quantité de POM consommée sur 6 minutes:

$$C_i (\text{mg}) = (F_{t_i} - F_{s_i}) \cdot d_i \cdot A_i$$

C_i est la quantité élémentaire en mg consommée par l'animal sur la tranche i de 6 minutes. F_{t_i} et F_{s_i} sont respectivement les concentrations en particules organiques (mg.l^{-1}) à la sortie du compartiment témoin et à la sortie du compartiment contenant l'animal, pour la tranche i . d_i est le

volume transitant dans le compartiment pendant la tranche i . A_i , défini au chapitre 2.3.4, informe sur l'état d'activité de l'animal sur la tranche i .

La consommation totale sur 24 heures (OFR; mg.j^{-1}) est obtenue en sommant les consommations élémentaires calculées sur les tranches de 6 minutes:

$$\text{OFR (mg)} = \sum_{i=1}^{240} C_i$$

OFR est la consommation totale de phytoplancton en mg sur la période de 24 heures.

2.3.6 Biodépôts

Les fèces et pseudo-fécès produits par chaque animal ont été collectés et traités comme décrit au chapitre V, ce qui permet de calculer l'"Organic Rejection Rate" (ORR, mg) et l'"Organic Egestion Rate" (OER, mg). L'"Organic Ingestion Rate" est calculé par $\text{OIR (mg)} = \text{OFR} - \text{OIR}$, et l'"Organic Absorption Rate" par $\text{OAR (mg)} = \text{OIR} - \text{OER}$. Les modalités de standardisation sont également décrites au chapitre V.

2.3.7 Analyse statistique

La relation entre poids total et poids de chair sèche est analysée par régression linéaire simple (SAS PROC GLM, SAS Institute, 1988). L'effet de la date de mesure sur les différentes composantes du bilan énergétique est testé par analyse de variance. Les comparaisons multiples sont effectuées par le test de Student-Newman-Keuls (Einot et Gabriel, 1975). Les individus sont classés selon leur scope for growth ou leur taux d'absorption ou leur consommation d'oxygène, puis les tests sont faits sur les rangs plutôt que sur les données brutes par le test de Friedman (SAS PROC RANK; Sokal et Rohlf, 1995, p 441; Conover, 1980; Hollander et Wolf, 1973; Owen, 1962). Le coefficient de corrélation de rang de Kendall est utilisé pour étudier les corrélations entre 2 expériences.

3. Résultats

3.1 Croissance

Le poids total moyen en septembre était de $67,1 \pm 4,3$ g et en avril de $86,5 \pm 5,9$ g. Entre septembre et avril, la croissance était linéaire ($P < 0,001$ pour tous les individus; R^2 moyen = 0,99; figure 5-5) avec une vitesse de croissance moyenne de $86,7 \pm 8,0$ mg.j^{-1} . Le rang des individus est significativement conservé dans le temps entre septembre et avril ($P < 0,001$).

Le coefficient de variation du poids total est resté homogène au cours des 5 périodes de mesure puisqu'il a évolué de 34,7 % en septembre à 35,4 % en avril. Les vitesses de croissance ont un coefficient de variation beaucoup plus important (55,3 %).

3.2 Relations allométriques

Les relations entre poids total et poids sec sont très significativement linéaires (F de 17,2 à 77,4; $p < 0,01$ pour les 5 séries) avec des coefficients de détermination allant de 0,61 à 0,91. Cependant, comme le montre la figure 5-6, la période de mesure affecte significativement la relation entre le poids total et le poids de chair sèche ($F = 36,9$; $p < 0,0001$).

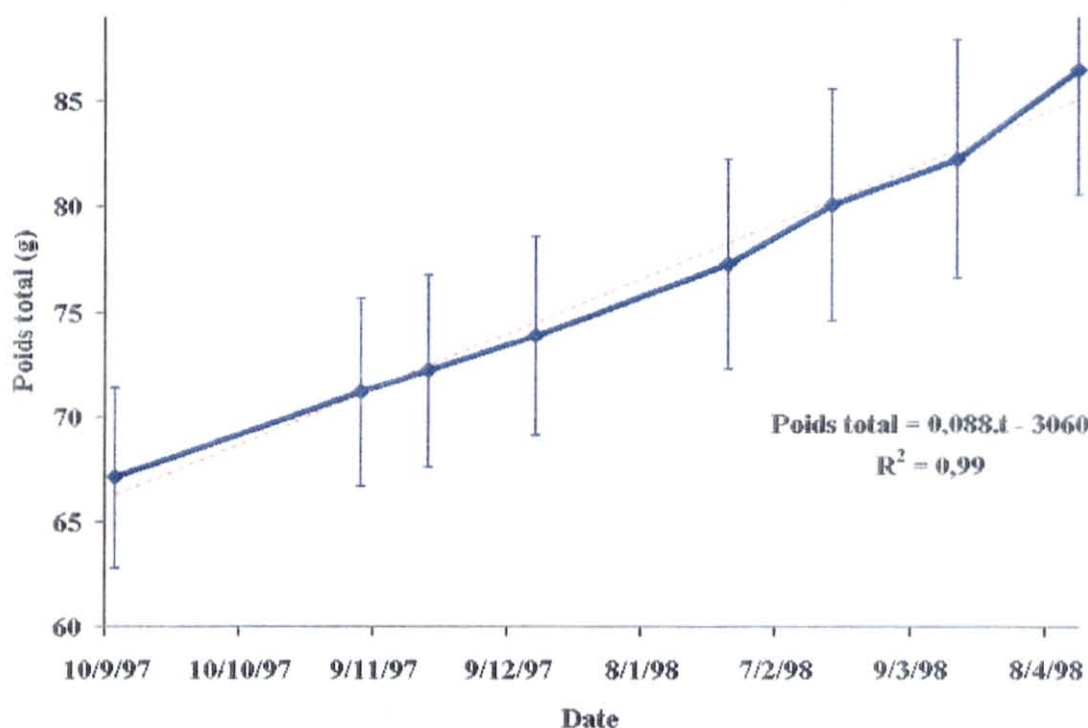


figure 5-5: Courbe de croissance chez *Crassostrea gigas*: moyenne des 30 individus mesurés pour leurs paramètres physiologiques. Les données représentent la moyenne \pm SE.

3.3 Effet de la date de mesure

3.3.1 Activités FTA et RTA

L'évolution du RTA et du FTA moyen au cours des 5 expériences est représentée à la figure 5-7. Le RTA moyen était de 64,1 %, 62,2 %, 71,5 %, 77,8 % et 78,7 % respectivement en septembre 97, octobre 97, décembre 97, février 98 et avril 98. La date de mesure affecte significativement le RTA ($P < 0,0001$; tableau 5-1). Le FTA moyen était de 49,7 %, 65,4 %, 73,5 %, 65,1 % et 70,3 %

respectivement en septembre 97, octobre 97, décembre 97, février 98 et avril 98. La date de mesure affecte significativement le FTA ($P < 0008$; tableau 5-1).

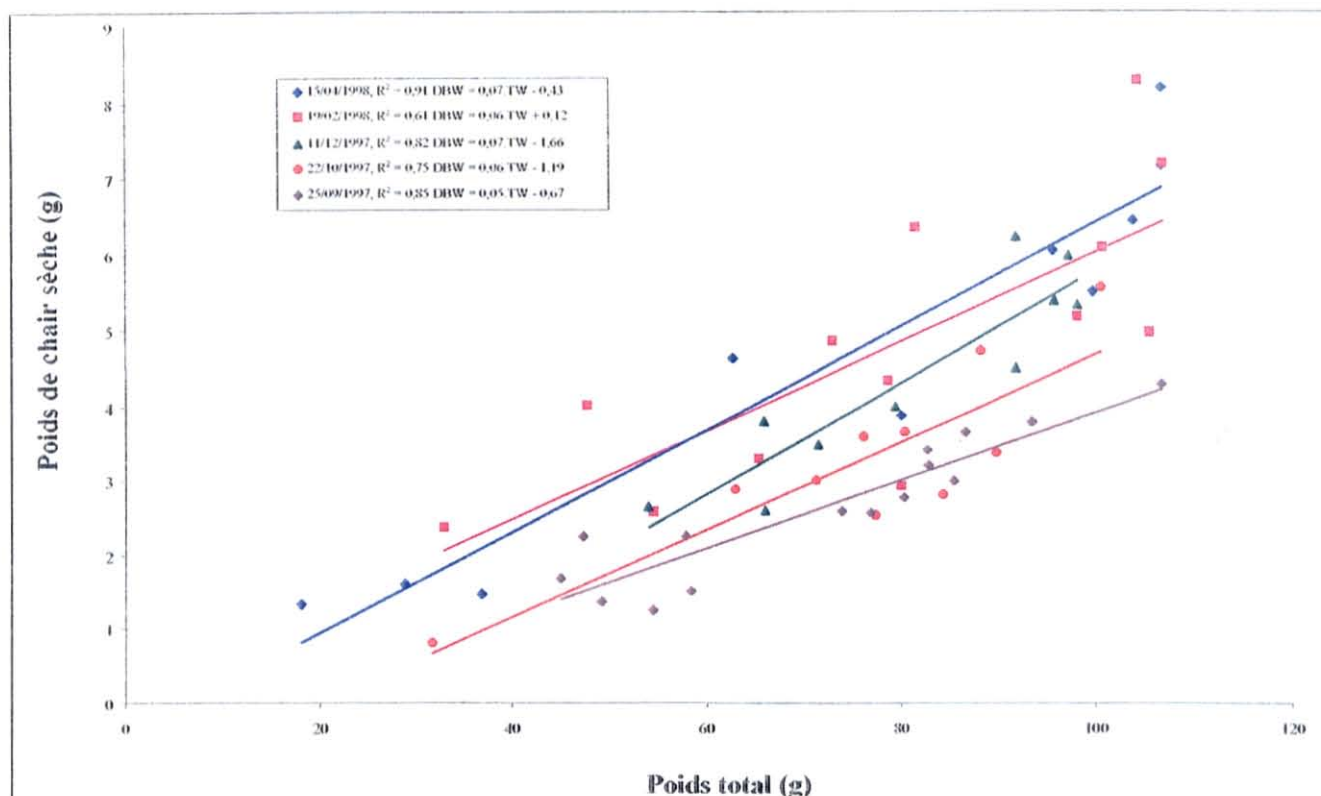


figure 5-6: Relation entre poids de chair sèche et poids total chez *Crassostrea gigas* à 5 périodes de mesure.

Aucune corrélation entre FTA et RTA n'est significative pour aucune des dates de mesure (figure 5-8). Cependant, la variation individuelle est beaucoup plus faible pour le RTA (coefficient de variation de 34 %) que pour le FTA (coefficient de variation de 46,5 %).

3.3.2 Bilan énergétique

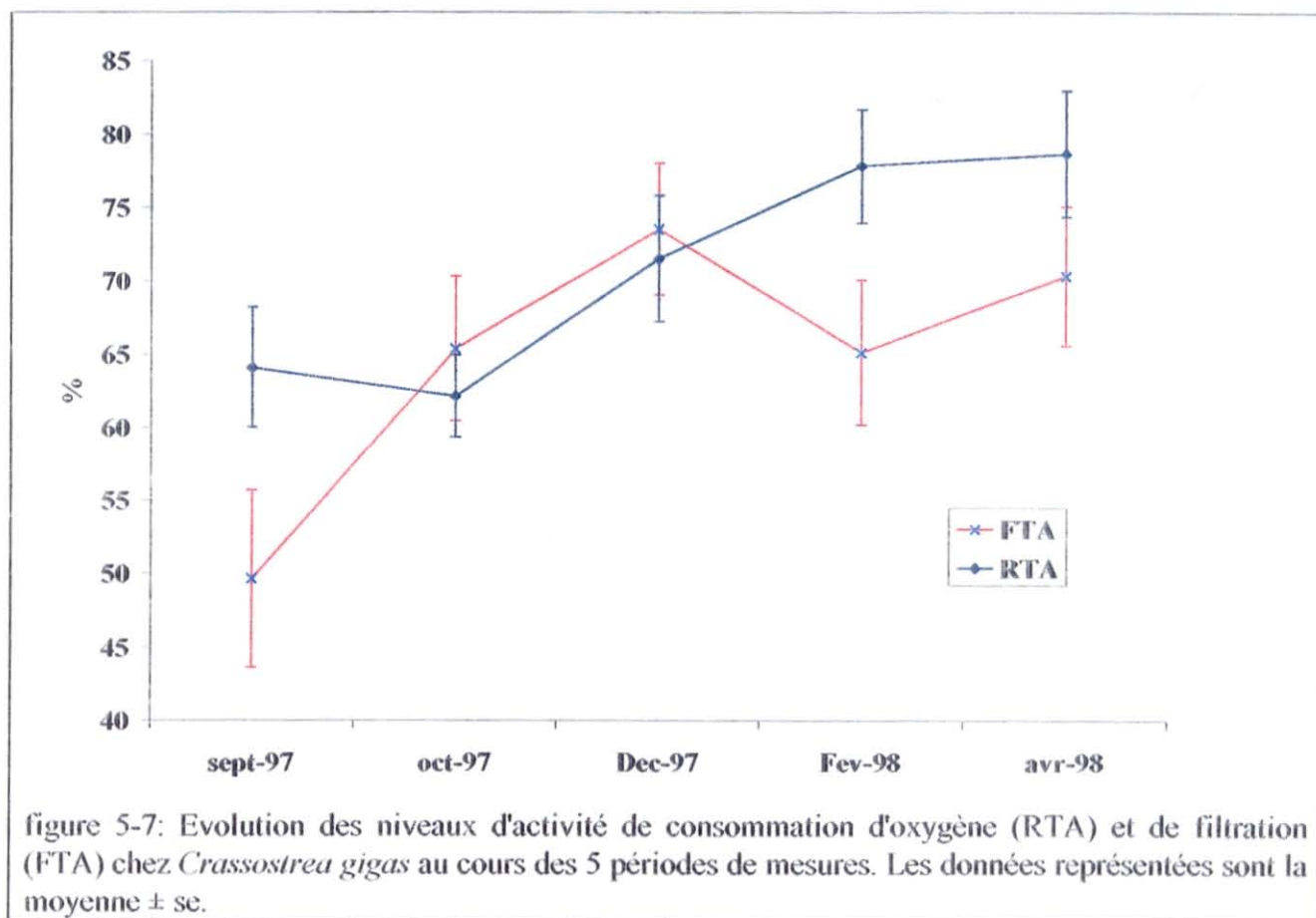
La quantité consommée en 24 heures a beaucoup varié au cours des 5 mesures: 90,2 mg en septembre, 32,6 mg en octobre, 70,6 mg en décembre, 44,4 mg en février et 41,1 mg en avril.

Les paramètres physiologiques standardisés à 1 g sont représentés en fonction du temps (figure 5-9 et figure 5-10). En octobre, la quantité de TPM était en dessous du seuil de pseudo-fèces, pratiquement aucun pseudo-fèces n'a été récolté. La quantité de fèces produite en 24 heures a varié au cours des 5 mesures de 5,9 mg en avril à 11,3 mg en septembre. Le pourcentage de la quantité absorbée par rapport à la quantité consommée est assez homogène sur les 5 séries de mesures: de 66 % en octobre à 76 % en septembre. De même l'"absorption efficiency" allait de 0,61 en octobre à 0,80 en décembre.

L'absorption, la consommation d'oxygène et le scope for growth sont représentés à la figure 5-10, après conversion en terme d'énergie (J). Le scope for growth est positif pour les 5 dates de mesures et varie de 167 J en octobre à 1050 J en septembre.

3.4 Stabilité temporelle

L'analyse non paramétrique montre que le rang des individus est conservé au cours des 5 séries d'expérience (test de Friedman, tableau 5-2) et pour les principaux paramètres physiologiques.



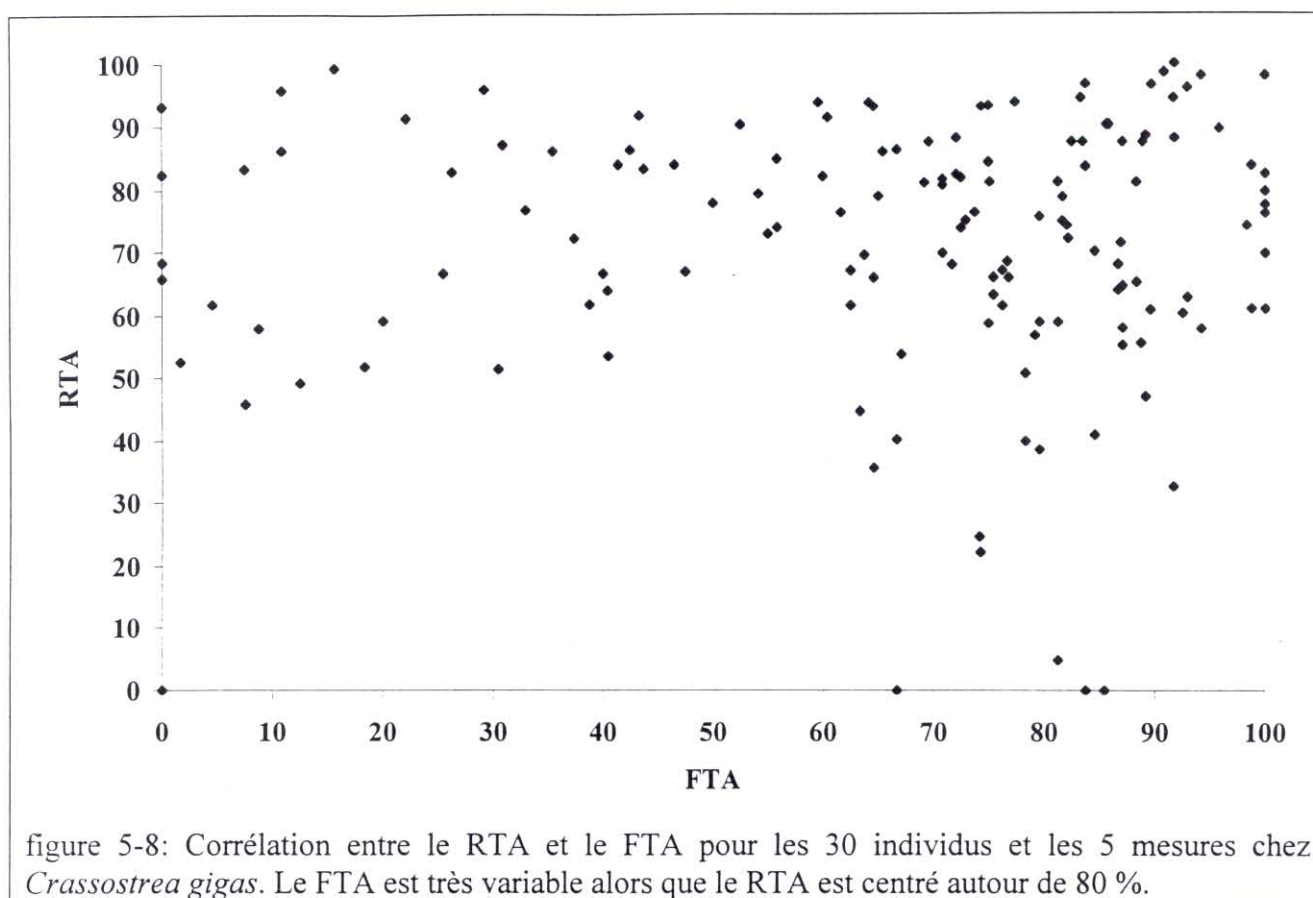


figure 5-8: Corrélation entre le RTA et le FTA pour les 30 individus et les 5 mesures chez *Crassostrea gigas*. Le FTA est très variable alors que le RTA est centré autour de 80 %.

Le critère $\text{Max}(\text{rangs}) - \text{Min}(\text{rangs})$ calculé pour chacun des 30 individus peut être utilisé pour quantifier leur stabilité. La distribution de ce critère (figure 5-11) montre deux types de comportements discriminés par une valeur de l'ordre de 20. Les rangs obtenus par le classement des 30 individus selon leur espérance de croissance sont représentés aux figure 5-12A et figure 5-12B en fonction de la date de la mesure. La stabilité de chaque animal peut être ainsi visualisée. Deux types de comportement peuvent être mis en évidence: les individus stables et les individus instables. Les individus stables sont assez nombreux pour donner la signification au test de Friedman.

3.5 Classement des individus

Différentes tentatives ont été faites pour synthétiser au mieux les performances des 30 individus en tenant compte des 5 séries de mesures. Un taux d'absorption moyen (OAR_m) sur les 5 mesures a été calculé ainsi qu'une consommation d'oxygène moyenne (OCR_m). Lorsque l'animal n'a pas filtré (FTA = 0), une valeur de consommation nulle est intégrée dans cette moyenne; il en est de même pour la consommation d'oxygène (si RTA = 0, OCR = 0). Le rapport entre ces deux paramètres synthétiques s'est avéré être un critère de discrimination efficace, variant de 0,21 pour l'individu le moins performant (09B6) à 13,6 pour l'individu le plus performant (13C7). Il est à noter que l'individu le moins performant a eu un FTA nul en octobre, février et avril.

4. Discussion

Les 5 séries d'expériences ont été faites dans les mêmes conditions. Seule la température et la quantité de nourriture ont varié entre les mesures. L'analyse montre un effet de la date de mesure sur tous les paramètres physiologiques excepté sur la consommation d'oxygène. Ce résultat est concordant avec la littérature portant sur des populations naturelles et démontrant que la température est le paramètre expliquant le plus l'effet de la saison (Kuang *et al.*, 1997; Smaal *et al.*, 1997).

Les études de physiologie, jusqu'en 1996, se basaient sur des mesures dites discrètes. La filtration était mesurée sur des courtes périodes de 1 à 3 heures, 6 heures au maximum. Ces mesures étaient ensuite extrapolées sans tenir compte de l'activité, sur des durées plus grandes, en général 24 heures. Au chapitre 4, l'Activité de Filtration (FA) a été définie pour prendre en compte l'activité de l'animal. Cependant, il ne s'agissait pas d'une réelle quantification de l'activité puisque sa mesure reposait sur une simple observation du comportement des animaux. En revanche, l'activité respiratoire est quantifiée avec précision depuis la définition du RTA par Bougrier *et al.*, (1997b).

tableau 5-1: Résultats d'analyse de variance testant l'effet de la date de mesure sur les paramètres physiologiques et le poids sec DW. Tous les paramètres sont standardisés exceptés FTA et RTA, traités après transformation angulaire. Les résultats des tests multiples (Student-Newman-Keuls) sont également donnés: deux groupes de lettre différente sont significativement différents à 5 %.

	DW		C		PF		I		F		A		OCR		SFG		FTA		RTA	
P	0,0001		0,0001		0,0001		0,0001		0,0115		0,0001		0,2337		0,0001		0,0076		0,0001	
avr	A	sep	A	avr	A	sep	A	sep	A	sep	A	-	sep	A	dec	A	fev	A		
fev	B	dec	B	sep	A	dec	B	oct	AB	dec	B	-	dec	B	fev	AB	avr	AB		
dec	C	avr	B	dec	B	fev	B	dec	AB	fev	B	-	avr	B	oct	AB	dec	BC		
oct	C	fev	B	fev	BC	oct	B	avr	AB	oct	B	-	oct	B	sep	B	sep	C		
sep	C	oct	B	oct	C	avr	B	fev	B	avr	B	-	fev	B	avr	B	oct	C		

Dans ce chapitre, un nouveau système de mesure de la filtration en continu est décrit et utilisé chez *Crassostrea gigas*. Pour la première fois, l'activité à la fois respiratoire et de filtration est quantifiée de manière assez précise pour être intégrée dans le calcul du bilan énergétique chez un bivalve marin. La définition d'un nouveau paramètre, le FTA (Bougrier *et al.*, en préparation), quantifiant l'activité de filtration, constitue une avancée dans la bioénergétique des mollusques.

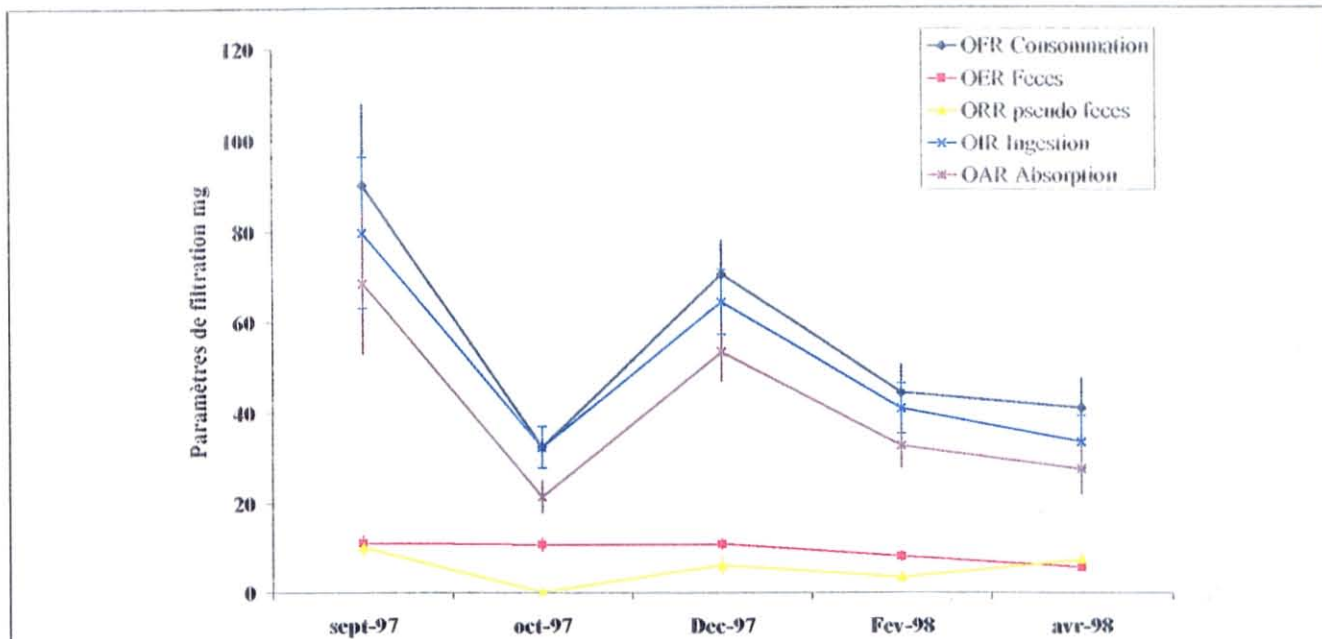


figure 5-9: Evolution de la quantité de nourriture consommée, ingérée et absorbée ainsi que de la quantité de fèces et pseudo-fèces produite en 24 heures (en mg de POM) pour les 5 séries de mesures chez *Crassostrea gigas*. Les données représentent la moyenne \pm se.

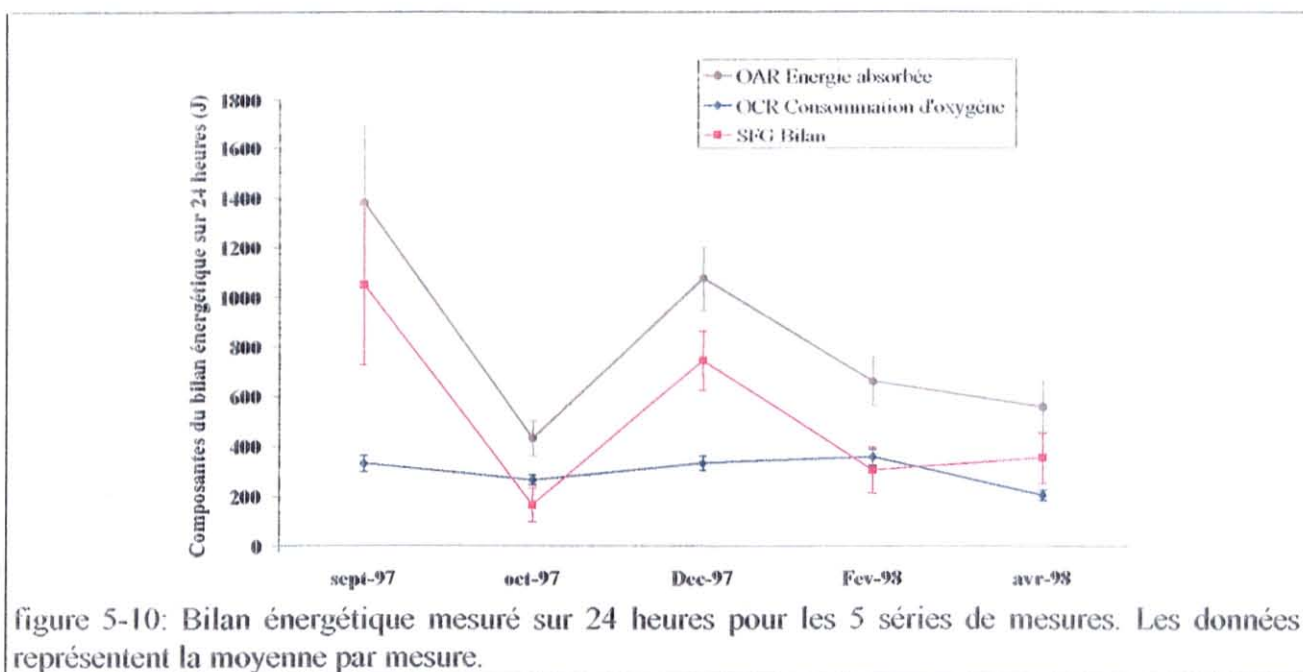


figure 5-10: Bilan énergétique mesuré sur 24 heures pour les 5 séries de mesures. Les données représentent la moyenne par mesure.

Les outils jusqu'ici disponibles pour mesurer l'activité des bivalves sont souvent indirects (Defossez *et al.*, 1997). Des dispositifs ont été conçus pour mesurer l'écartement des valves; l'activité valvaire est le paramètre généralement utilisé pour décrire le comportement des bivalves (Eapen, 1997). L'activité ainsi mesurée constitue une donnée très importante pour étudier précisément l'état de stress d'un individu confronté à la présence d'algues toxiques (Matsuyama *et al.*, 1997), la toxicité de l'eau de mer dans certaines zones polluées (Mouabad et Pihan, 1993) ou carencées en oxygène (Wang et Widdows, 1993). Cependant, si cette mesure est pertinente pour

évaluer l'état de stress de l'animal, elle n'indique pas si l'animal consomme de l'oxygène, filtre les particules du milieu ou les deux. En effet, la filtration peut être régulée simplement par l'ouverture plus ou moins importante des valves, mais également par l'activité des cils branchiaux qui conditionne le volume d'eau transitant dans la cavité palléale de l'animal (Dral, 1968). En effet, selon Bayne et Newell (1983), des arrêts temporaires du pompage sont courants chez les bivalves, ce qui diminue la vitesse de consommation de phytoplancton mais est indécélable par l'activité valvaire. Un système de mesure en continu avait déjà été employé pour suivre la consommation chez *Mytilus edulis* par Winter (1973). Cette technique n'a jamais été réutilisée par la suite, peut-être à cause de sa lourdeur technique d'autant plus gênante que la grande majorité des études physiologiques tend à se faire *in situ*.

L'analyse individuelle montre une stabilité significative des paramètres physiologiques chez *Crassostrea gigas* sur un cycle annuel en condition de laboratoire. Cependant, le test utilisé de type non-paramétrique a été réalisé sur les rangs plutôt que sur les valeurs brutes. Graphiquement il est difficile de visualiser un tel résultat mais l'analyse fine met en évidence deux types de sensibilité au cours d'un cycle annuel (figure 5-12 A et B). Une telle instabilité est soit due à la méthode de mesure et d'estimation elle-même qui n'est pas répétable, soit à l'activité des individus qui est chaotique et donc imprévisible, ou dépendant de facteurs impossibles à contrôler (pression atmosphérique par exemple). Les paramètres physiologiques sont extrêmement dépendants des conditions environnementales. La température et la quantité de nourriture ont fluctué d'une série de mesures à l'autre et également au sein d'une série de mesures pour la quantité de nourriture.

Un dispositif d'autorégulation de l'apport de nourriture comme celui décrit par Winter (1973) ou par Riisgård et Møhlenberg (1979) permettrait des conditions plus rigoureuses pour la comparaison d'individus.

Le problème majeur pour estimer l'activité de filtration et de consommation d'oxygène est la méconnaissance d'une éventuelle périodicité. Sur 24 heures, aucune périodicité n'a pu être mise en évidence (Bougrier *et al.*, 1997) pour le RTA mais la période de 24 heures peut ne pas être suffisante pour estimer le taux d'activité globale d'un animal de manière fiable et répétable. En effet, l'activité est très probablement affectée par des paramètres que l'on ne peut pas contrôler dans la pratique. Il est très probable, bien que non démontré, que le comportement des huîtres dépend des conditions climatiques autres que la température de l'eau ou la salinité. Des expériences similaires sont faites sur l'huître plate (*Ostrea edulis*) chez laquelle l'influence des facteurs externes sur le stress de l'animal est extrême: les vibrations, les variations d'intensité lumineuse se traduisent en général par une perturbation de l'activité (fermeture des valves). La pression atmosphérique pourrait

jouer un rôle très important sur l'état de stress des animaux qui se répercute sur l'activité de ceux-ci. En effet, l'activité semble être très sensible aux conditions climatiques en particulier celles de type orageuses pendant lesquelles les variations de pression sont considérables.

tableau 5-2: Résultat du test de Friedman montrant que tous les paramètres sont stables dans le temps. OFR = consommation, OAR = absorption, OCR = consommation d'oxygène, DW = poids sec estimé, SFG = scope for growth, la lettre s indique que le paramètre est standardisé.

Variable	OFR	OAR	OCR	OFRs	OARs	OCRs	FTA	RTA	DW	SFG	SFGs
P	0,0003	0,0006	0,0138	0,0144	0,0113	0,0103	0,0211	0,0210	$5,10^{-16}$	0,0014	0,0014

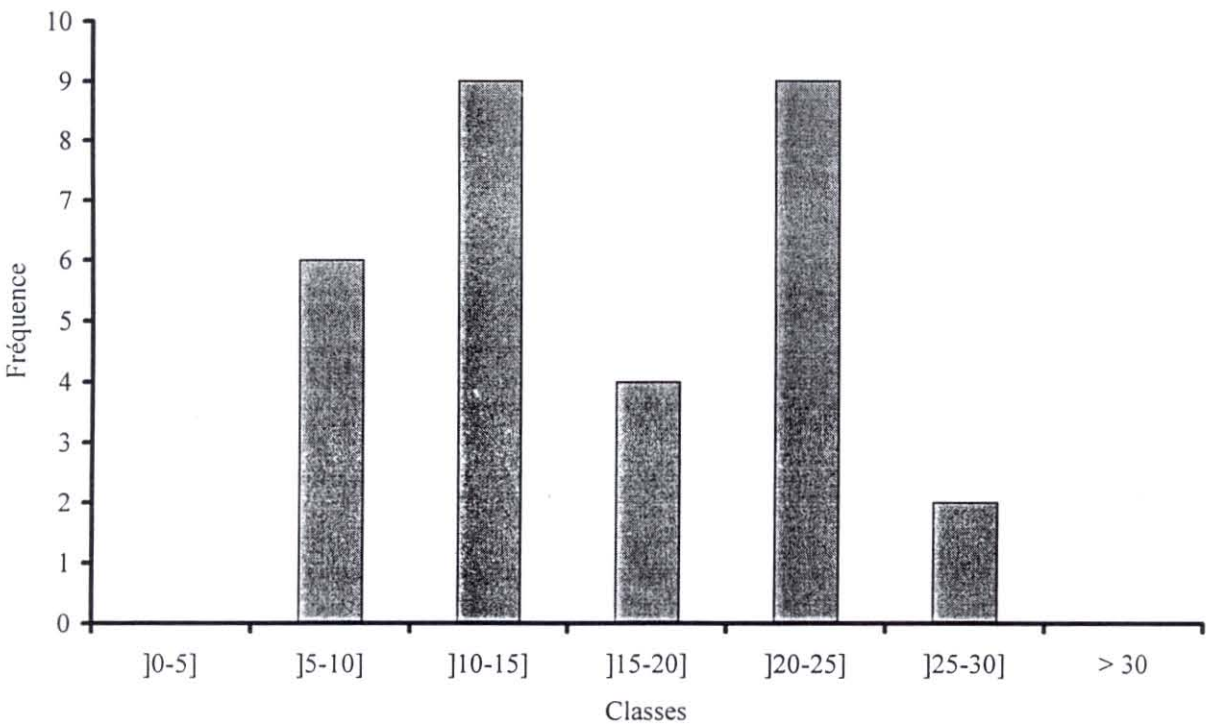
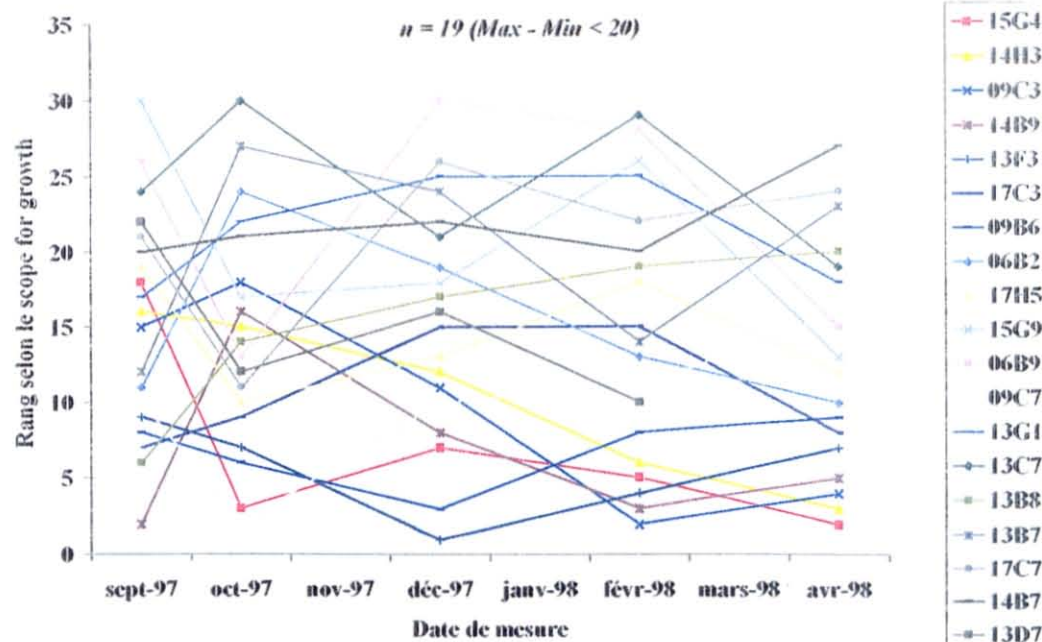
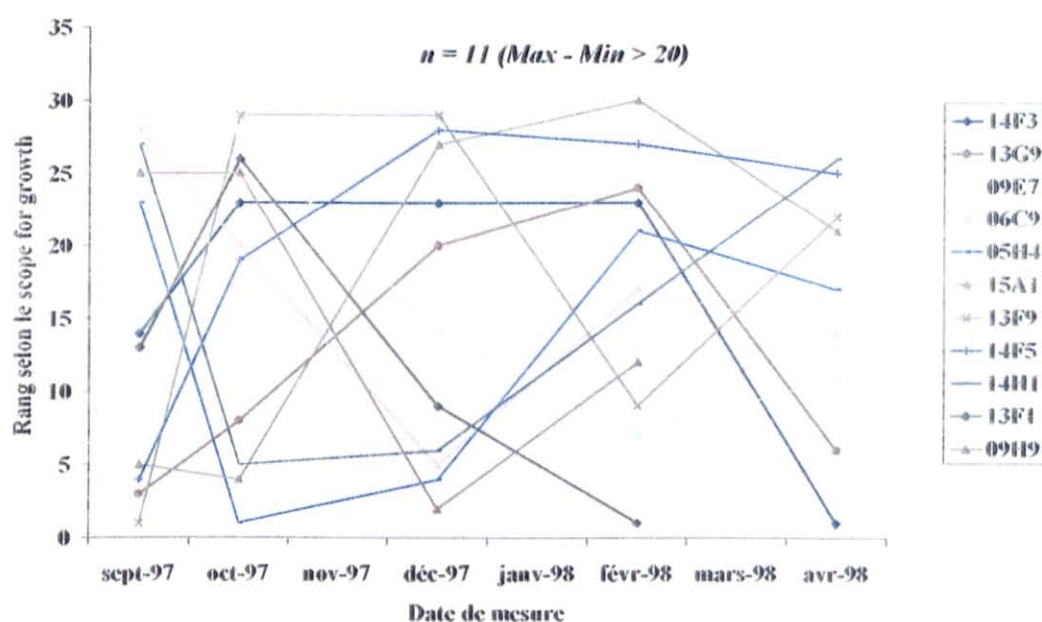


figure 5-11: Distribution du critère Max(rangs) -Min(rangs). Les rangs sont déterminés en fonction de l'espérance de croissance. La distribution est bimodale et deux pics peuvent être séparés par la valeur 20.

L'incompatibilité des systèmes de mesure de consommation d'oxygène (faibles débits) et de filtration (débits élevés) ne permet pas pour l'instant la mesure en continu de ces deux paramètres simultanément sur les mêmes individus, rendant ainsi difficile l'étude corrélée de ces deux paramètres. De plus, étant donné la grande sensibilité de l'activité des bivalves vis à vis de facteurs externes pouvant varier d'un jour à l'autre, l'estimation de l'espérance de croissance peut s'en trouver biaisée.

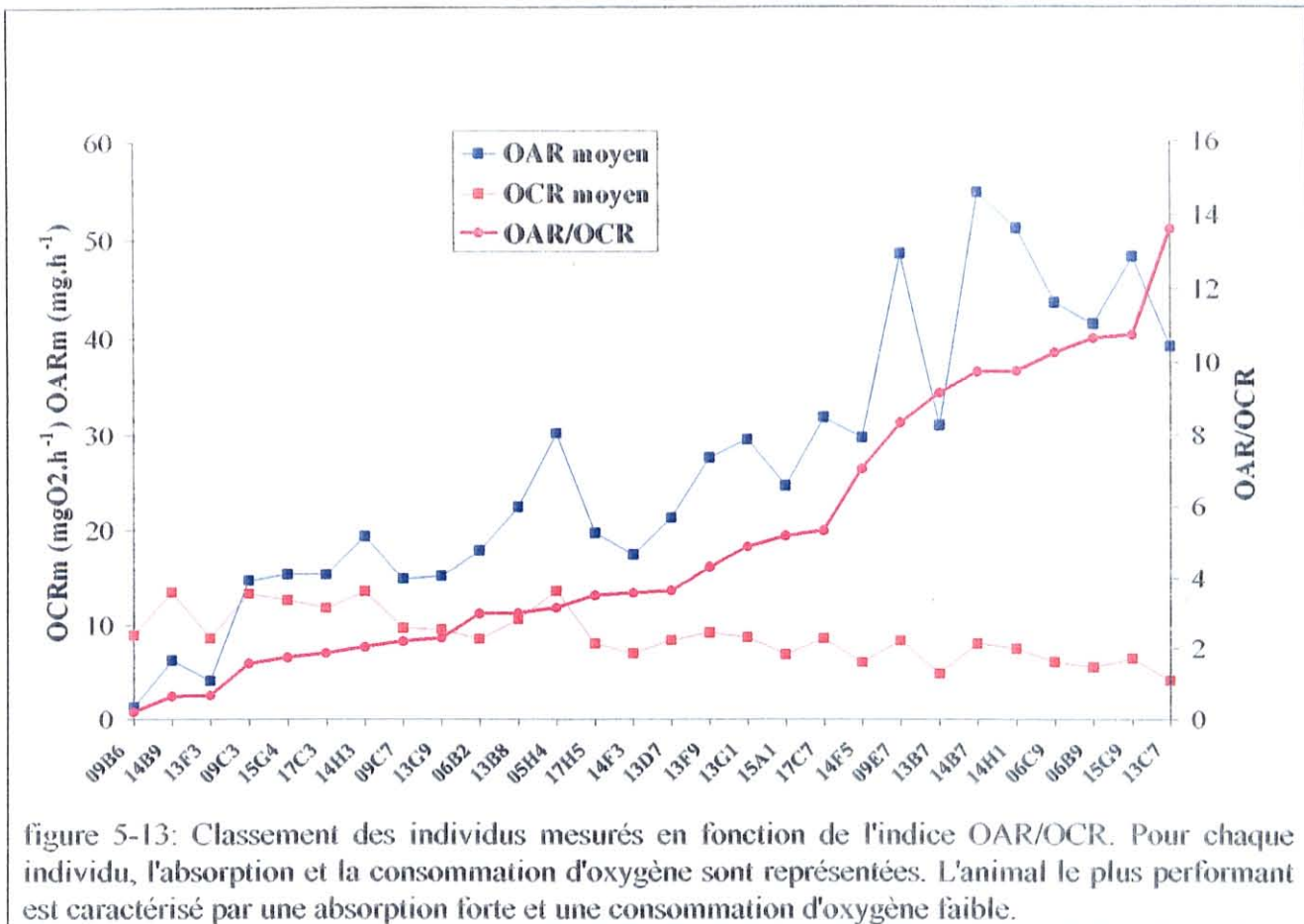


A



B

figure 5-12: Représentation de la stabilité individuelle. Exemple de l'espérance de croissance. Chaque courbe représente un individu. La détermination du rang a été faite selon la procédure SAS PROC RANK, avec prise en compte des *ex aequo*. Représentation des individus stables ($n = 19$; A) et instables ($n = 11$; B) pour le Scope for growth.



Des systèmes de mesures ouverts permettant la mesure de la filtration et de la consommation d'oxygène ont été utilisés préalablement chez les poissons (Blazka *et al.*, 1960) et devraient pouvoir être transposés à l'étude des bivalves marins. La sensibilité des systèmes de mesures de concentration d'oxygène et de fluorescence est très différente. Par conséquent, les débits nécessaires à l'estimation avec une précision correcte de OFR et OCR sont incompatibles. Un dispositif en système clos permettant la mesure simultanée de la filtration et de la consommation d'oxygène a été récemment décrit par Eriksen et Iverson (1997), et pourrait être une solution. La mesure de l'intensité de la consommation d'oxygène est beaucoup plus fiable avec le système présenté dans ce chapitre par rapport à celui utilisé dans le chapitre 4. En effet, il a été démontré que les bivalves étaient capables d'augmenter leur efficacité de consommation d'oxygène à faible concentration (Taylor et Brand, 1975).

La stabilité n'étant pas très nette entre les 5 séries de mesures, il est très délicat de calculer un indice synthétique fiable pour le choix de géniteurs. Cependant, un indice synthétique a été construit se basant sur la moyenne des 5 mesures et intégrant l'activité. On constate que ce classement privilégie les individus stables: les individus instables auront un indice moyen alors que les individus stables auront soit un indice très fort pour les "stables performants" ou très faible pour

les "stables peu performants". Le choix des géniteurs pour l'établissement des familles G2 a pris en compte cette caractéristique: les individus ayant des valeurs extrêmes d'indice ont d'abord été choisis.

Les individus performants se caractérisent par une absorption forte et une consommation d'oxygène faible, montrant la pertinence de cet indice de sélection. De cette manière, les individus performants ont une double caractéristique physiologique: une acquisition d'énergie élevée et des dépenses métaboliques faibles.

En conclusion, cet indice synthétise les 5 mesures en tenant compte du niveau d'activité de filtration et de consommation d'oxygène ainsi que du niveau de stabilité. Le but est de produire des familles de plein-frères (G2) à partir de géniteurs ayant des performances physiologiques les plus contrastées possible.

Il est également possible que parmi les 30 individus, bien qu'ils appartiennent tous à la même population, il existe des sous-populations différenciées selon leur tolérance à des variations de facteurs environnementaux et en particulier la température. La figure 5-12 met en évidence deux types d'individus, des individus stables et des individus instables. La stabilité significative révélée par le test de Friedman serait due au nombre de ces individus stables. Cette différence de comportement des individus face à des fluctuations du milieu peut être liée à une sensibilité au stress différente entre des individus de même âge et issus du même type de croisement. Certaines espèces adoptent les mêmes comportements vis à vis de la température. Les espèces sténothermes ne tolèrent que de faibles variations de température alors que les espèces eurythermes ont des fonctions physiologiques qui varient très peu malgré des fortes fluctuations de température du milieu. Par analogie avec ces espèces où la génétique explique ces différences de comportement (Whiteley *et al.*, 1997; Loughna et Goldspink, 1985), l'analyse génétique pourrait apporter des éléments de réponse.

Bilan - Synthèse

- ☞ Nouvelle méthode d'estimation des bilans énergétiques intégrant l'activité de filtration quantifiée par le FTA et l'activité de consommation d'oxygène quantifiée par le RTA (Bougrier *et al.*, 1997b)
- ☞ Stabilité des caractères physiologiques significatifs mais comportement différent des individus face à des fluctuations de température
- ☞ Effet de la date de mesure sur les paramètres moyens

QUATRIEME PARTIE

**Génétique: détermination de parenté à
l'aide d'un marqueur microsatellite**

Introduction

L'étude de la variabilité génétique des êtres vivants est nécessaire pour appréhender les mécanismes de sélection pouvant exister aux différentes étapes du cycle de vie. Les bivalves marins ont un cycle très particulier (voir introduction générale) avec des phases de dispersion (gamètes et surtout phase larvaire) planctonique opposée à une phase benthique. Dans la partie II, nous avons vu que la croissance était fortement dépendante des conditions environnementales et dans la partie III nous avons montré la très forte sensibilité aux conditions extérieures des paramètres physiologiques impliqués dans la croissance. Nous avons orienté l'étude génétique de la croissance d'une manière particulière par rapport à ce qui est généralement publié. Dans cette dernière partie, nous verrons en effet que la contribution d'un individu à la génération suivante aux stades précoces peut apporter des informations précieuses sur les mécanismes de reproduction. Les chapitres 1 et 2 ont mis l'accent sur la croissance précoce comme déterminant de la croissance ultérieure. L'influence de ces mécanismes précoces sur la croissance peut ainsi être évaluée. Le but de cette introduction est de faire une brève revue des connaissances actuelles sur la génétique des bivalves et en particulier deux caractéristiques propres à ceux-ci: les déficits en hétérozygotes et la relation entre hétérozygotie et croissance (RHC). On présentera également les microsatellites, marqueurs génétiques idéaux pour l'étude de la contribution parentale d'un animal à sa génération suivante.

1. *Déficits en hétérozygotes*

Le déficit en hétérozygotes aux locus enzymatiques est un phénomène souvent observé dans les populations de bivalves marins (Skibinski *et al.*, 1983; Zouros et Foltz, 1984b; Fairbrother et Beaumont, 1993). Ces résultats sont assez surprenants lorsque l'on considère le cycle de vie et la biologie des bivalves marins (voir introduction) remplissant les hypothèses de l'équilibre de Hardy-Weinberg: effectifs importants, grand nombre de gamètes et zygotes, phase de dispersion (gamétique et larvaire). Ceci est d'autant plus étonnant que le déficit en hétérozygotes apparaît très tôt dans le cycle de vie de l'animal et très certainement avant fixation des larves. Il peut être causé soit par des taux de mortalité différentielle au stade larvaire désavantageant les hétérozygotes; soit par un mécanisme non sélectif, tel que la subdivision de la population parentale dans laquelle des périodes de pontes dépendantes du génotype peuvent être engendrées par des vitesses de croissance différentes (Zouros et Foltz, 1984b). Il est également concevable que ce déficit soit dû à l'impossibilité de détecter le

polymorphisme causé par l'existence d'allèles nuls ou d'accidents chromosomiques (aneuploïdie).

2. *Relation entre hétérozygotie et croissance (RHC)*

Une corrélation entre l'hétérozygotie aux locus enzymatiques et la croissance a été observée chez de nombreux bivalves marins (Britten, 1996). L'intérêt économique de certaines espèces et l'intérêt scientifique fondamental ont suscité un approfondissement des recherches sur les fondements de cette relation.

Les études des locus enzymatiques dans des populations naturelles de bivalves marins ont révélé une corrélation positive entre degré d'hétérozygotie et vitesse de croissance, tant chez les juvéniles que chez les adultes (Zouros *et al.*, 1980; Koehn et Gaffney, 1984; Zouros et Pogson, 1994), notamment chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Fujio, 1982; Hedgecock *et al.*, 1995), chez l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Singh et Zouros, 1978; Zouros *et al.*, 1980; 1983), chez *Ostrea edulis* (Jaziri et Blanc, 1990), chez les moules *Mytilus edulis* (Koehn et Gaffney, 1984; Gentili et Beaumont, 1988), *Mulinia lateralis* (Gaffney, 1994), *Placopecten magellanicus*, (Foltz et Zouros, 1984; Pogson et Zouros, 1994), *Ruditapes decussatus* (Borsa *et al.*, 1992).

De plus, la variabilité du taux de croissance est souvent plus faible chez les hétérozygotes (Zouros *et al.*, 1980; Koehn et Gaffney, 1984; Jaziri et Blanc, 1990). D'autre part, il existe une relation entre la taille et la survie: en particulier, les individus les plus petits, avec une coquille plus fragile, sont les premières victimes de la prédation (Levington et Fundiller, 1975). La taille peut également aider au succès reproducteur, les plus grands individus produisant plus de gamètes. Chez *Spisula ovalis*, une corrélation positive entre degré d'hétérozygotie et vitesse de croissance existe, mais ne s'étend pas à une relation entre hétérozygotie et survie (David *et al.*, 1995; David et Jarne, 1997).

Cependant, dans les populations obtenues en laboratoire, aucune RHC significative n'existe chez *Mytilus edulis* (Beaumont *et al.*, 1983; Beaumont, 1991; Pecon Slattey *et al.*, 1991; Zouros *et al.*, 1996) alors qu'elle a été mise en évidence chez *Ostrea chilensis* (Gaffney et Scott, 1984; Toro *et al.*, 1996a).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour justifier cette corrélation. Elles se regroupent sous deux courants principaux: l'un considère les allozymes comme des marqueurs sélectivement neutres, l'autre leur attribue un rôle direct dans la valeur sélective de l'individu (allèles soumis à sélection).

2.1 *Dominance multi-locus*

Cette hypothèse accorde un rôle direct aux allozymes dans la relation entre hétérozygotie et valeur adaptative ou fitness (Zouros et Pogson, 1994). Plus l'hétérozygotie globale d'un individu augmente, plus les locus ont de chance de posséder des allèles dominants, donc plus l'efficacité métabolique s'accroît. Certains locus participeraient alors plus fortement à la relation que d'autres, selon leur fonction métabolique, comme chez *Placopecten magellanicus*, où un lien significatif entre degré d'hétérozygotie et taille de la coquille est essentiellement observé sur quelques locus (Zouros et Pogson, 1994), chez la palourde *Ruditapes decussatus* (Borsa *et al.*, 1992) ou chez *Crassostrea gigas* où certains allèles se fixent plus facilement dans la population que d'autres (Hedgecock *et al.*, 1995). Les enzymes intervenant dans le catabolisme protéique ou dans la glycolyse ont un poids plus important dans la relation globale. Ces observations supportent l'hypothèse d'une plus grande efficacité métabolique des hétérozygotes.

2.2 *Superdominance directe*

Les allozymes jouent là encore un rôle direct, mais l'action combinée des deux allozymes d'un hétérozygote est plus efficace que celle de chacun des homozygotes correspondants, ou que leur moyenne. La superdominance ne survient pas uniformément aux différents locus. Un seul locus est suffisant pour assurer la supériorité d'un hétérozygote. Chez *Crassostrea gigas*, les trois hétérozygotes les plus communs au locus de la phosphoglucomutase-2 ont un taux d'activité enzymatique significativement plus élevé que les homozygotes (Pogson, 1991). Parallèlement, ces hétérozygotes sont en moyenne plus gros que les homozygotes (Fujio, 1982).

2.3 *Superdominance associative*

Sous cette hypothèse, les allozymes sont des locus neutres en déséquilibre d'association avec d'autres gènes ayant un effet sur la croissance (Ohta, 1971; Zouros *et al.*, 1980): un allèle donné à un locus donné est supposé être en déséquilibre d'association avec un gène délétère. Cette association peut résulter de la consanguinité (Bierne *et al.*, 1998), surtout si elle concerne un gène délétère peu fréquent mais avec un effet important; d'une dérive génétique ou d'un écart à la panmixie dans la population, si elle concerne un gène fréquent mais avec peu d'effet délétère (Zouros, 1993). Contrairement aux cas où la dominance est

directe, tous les locus d'un individu sont supposés avoir la même contribution dans la relation entre l'hétérozygotie et la valeur sélective, puisque la dérive génétique, la consanguinité ou la structuration des populations sont censées affecter tous les locus enzymatiques de la même manière. Cette hypothèse a été le sujet d'un débat intense entre partisans (Zouros, 1990) et détracteurs (Koehn, 1990). L'absence de locus enzymatiques particulièrement impliqués dans la corrélation entre hétérozygotie et croissance semble valider cette hypothèse chez des juvéniles de *Mytilus edulis* (Koehn et Gaffney, 1984; Beaumont, 1991).

Le paradoxe de l'allèle rare (Mcgoldrick et Hedgecock, 1997) pourrait être un argument contre la superdominance associative: sur la descendance d'hermaphrodites auto-fertilisés de *Crassostrea gigas*, les auteurs observent un biais sélectif contre l'allèle de moindre fréquence. Or cet allèle n'a pas de raison d'être plus fortement lié à un gène muté que d'autres, ou s'il l'est, il ne devrait pas persister dans la population (sauf s'il est contre-sélectionné pour une raison inconnue). Ce résultat n'est pas décrit par ailleurs. En fait, dans les croisements consanguins, un biais d'association entre un allèle rare et un gène délétère peut être induit, du fait d'un fort déséquilibre gamétique.

2.4 Epistasie

Des interactions positives ou négatives entre des allèles à différents locus peuvent expliquer la supériorité des hétérozygotes: un allèle augmentant la valeur sélective d'un individu pourra être exprimé chez un hétérozygote alors qu'il restera réprimé par un locus homozygote. Dans le cas d'une épistasie régulatrice, certains promoteurs permettraient une production élevée des enzymes avec lesquelles ils sont liés, entraînant une augmentation de la valeur sélective si une grande quantité de ces enzymes favorise l'efficacité métabolique (Mcgoldrick et Hedgecock, 1997).

2.5 Dépression de consanguinité

La dépression de consanguinité est une diminution de valeur sélective des individus consanguins par rapport aux individus non consanguins. Elle est généralement admise et découle du fait que les croisements entre apparentés augmentent la probabilité d'être homozygote pour un allèle délétère récessif chez les descendants. L'apparition de cette dépression dans une population sous-entend l'existence d'un fardeau génétique suffisant pour l'engendrer (Ohta, 1976). L'existence d'un tel fardeau a été mise en évidence dans certaines

études, par étude de croisements consanguins réalisés en laboratoire (Beattie *et al.*, 1987; Bierne *et al.*, 1998).

Un moyen de valider l'hypothèse de la superdominance associative est d'étudier la relation entre hétérozygotie et valeur adaptative à partir de marqueurs d'ADN nucléaire, supposés neutres. On doit aussi trouver une corrélation positive, puisque ces marqueurs ont la même probabilité d'être en déséquilibre de liaison avec les gènes associés à la valeur adaptative que les marqueurs enzymatiques. Cette corrélation n'est pas retrouvée chez des Coquilles St-Jacques *Placopecten magellanicus* juvéniles (Zouros et Pogson, 1994a; 1994b), mais les auteurs admettent que d'autres études doivent être réalisées pour valider ce résultat, d'autant que le taux de mutation des VNRT (variation du nombre de répétitions en tandem), qui sont les marqueurs utilisés dans cette étude, est beaucoup plus élevé que celui des gènes codant pour les allozymes: jusqu'à 5.10^{-2} mutations par site nucléotidique et par génération, contre 5.10^{-6} pour les marqueurs allozymiques. En revanche, l'utilisation d'ADN nucléaire simple copie comme marqueur chez *Crassostrea virginica* (Foltz et Hu, 1996), ainsi que de microsatellites chez *Ostrea edulis*, semble confirmer cette hypothèse (Bierne *et al.*, 1998; Launey, 1998). D'autre part, les gènes liés à la valeur sélective paraissent suffisamment répandus pour que n'importe quel microsatellite pris au hasard dans le génome soit en déséquilibre d'association avec l'un d'eux.

Chez certains bivalves marins, il est possible de produire des individus triploïdes viables et stériles, en supprimant l'éjection de l'un des deux globules polaires pendant la méiose (Gérard *et al.*, 1994; Desrosiers *et al.*, 1993). Pour tenter de mieux comprendre les relations entre hétérozygotie et valeur sélective, des comparaisons entre animaux diploïdes et triploïdes ont été effectuées. Les individus triploïdes ayant plus de chance d'être hétérozygotes à leurs locus que les individus diploïdes, les premiers devraient avoir une valeur sélective plus grande. Chez *Mytilus edulis*, aucune différence claire n'est observée au niveau du métabolisme entre diploïdes et triploïdes. Chez les juvéniles élevés en laboratoire, les triploïdes ont effectivement un degré plus grand d'hétérozygotie, mais ne sont pas plus gros que les hétérozygotes diploïdes. La relation entre l'hétérozygotie et la croissance existe, mais n'est pas plus prononcée chez les triploïdes (Beaumont *et al.*, 1995). A partir de ces observations, l'hypothèse de la superdominance associative semble la plus appropriée chez cette espèce. Au stade adulte, les animaux triploïdes, notamment chez les huîtres, peuvent être plus gros, mais le recyclage de l'énergie normalement allouée à la reproduction chez les diploïdes en est certainement la principale cause (Hawkins *et al.*, 1994).

2.6 Relation hétérozygotie et paramètres physiologiques

La supériorité des hétérozygotes serait due à une plus grande efficacité de leur activité métabolique, à une consommation d'oxygène et un turn-over des protéines plus faibles, entraînant une limitation des coûts énergétiques. Ainsi, chez *Mytilus edulis*, les hétérozygotes ont une meilleure résistance au jeun et leur demande énergétique pour la maintenance est plus faible, bien que les taux d'absorption de nourriture dans un milieu non limitatif soient sensiblement les mêmes chez hétérozygotes et homozygotes (Jorgensen, 1992). L'énergie ainsi économisée sur le coût de maintenance permet de réinvestir dans la croissance (*Mytilus galloprovincialis*, stades juvéniles et adultes: Bayne et Hawkins, 1997). Une relation entre l'hétérozygotie multi-locus et les paramètres physiologiques impliqués dans la croissance a également été trouvée chez *Mulinia lateralis* (Garton *et al.*, 1984). Ce déficit est en général très prononcé aux stades précoces (larvaires et juvénile) puis s'estompe avec l'âge des individus.

3. Les marqueurs microsatellites, outils pour la recherche de parenté

3.1 Définition

Le génome des eucaryotes contient des séquences d'ADN répétées mises en évidence il y a près de 30 ans (Britten et Kohne, 1968). Les profils issus des purifications sur gradient de chlorure de césium, ont donné le nom d'ADN "satellite". Une autre catégorie d'ADN répété nommée VNTR (Variable Number of Tandem Repeat, Nakamura *et al.*, 1987) ont été rebaptisées mini et microsatellites par analogie avec l'ADN satellite. Les minisatellites sont des séquences de 100 pb à 7 kpb de longueur composées des répétitions de quelques dizaines de bases localisées le plus souvent dans les régions télomériques ou centromériques (Jeffreys *et al.*, 1985). Les microsatellites se distinguent des minisatellites par la taille du motif de 2 à 5 paires de bases, par leur longueur maximale de l'ordre de 200 pb (Rassman *et al.*, 1991) et par leur répartition aléatoire le long du génome (Hearne *et al.*, 1992) excepté dans les régions télomériques et centromériques où ils sont moins fréquents (Wong *et al.*, 1990; Winterø *et al.*, 1992). Historiquement, les marqueurs microsatellites ont été découverts dans l'espèce humaine où ils montrent une grande abondance et une dispersion dans tout le génome (Hamada et Kakunaga, 1982; Hamada *et al.*, 1982; Weber et May, 1989; Weber, 1990; Hearne *et al.*, 1992; Barendse *et al.*, 1994; Perez-Lezaun *et al.*, 1997). Par la suite, les marqueurs microsatellites ont été identifiés chez un grand nombre d'organismes eucaryotes ou procaryotes, animaux ou végétaux (pour revue, voir tableau p 40-41 dans Launey, 1998;).

Chez les bivalves, des marqueurs microsatellites ont été identifiés chez le gastéropode d'eau douce *Bulinus truncatus* (Jarne *et al.*, 1993), *Anadaria trapezia* (Nassif et Mackinlay, 1996), l'huître plate *Ostrea edulis* (Naciri *et al.*, 1995). Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 9 locus microsatellites ont été identifiés et mis au point (3 dans Magoulas *et al.*, in press) et 30 sont en cours de mise au point (McGoldrick et Hedgecock, 1996; McGoldrick, 1997).

3.2 Polymorphisme

Les locus microsatellites montrent un polymorphisme important dans le nombre de motifs de base (Litt et Luty, 1989; Weber et May, 1989; Fries, 1993; Goodfellow, 1993). Les régions situées de part et d'autre de la zone répétée (régions flanquantes) sont en général bien conservées et permettent de définir des amorces spécifiques pour un locus. Le fragment amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne, Saiki *et al.*, 1988) à l'aide de ces amorces est de taille proportionnelle au nombre de répétitions. Ainsi, les fragments, en général de petite taille (100 à 500 pb), sont facilement séparés sur gel de polyacrylamide assez résolutif pour déterminer le nombre de répétitions présentes dans la zone répétée.

Les séquences microsatellites ont une fonction biologique qui reste encore méconnue. Elles semblent être impliquées dans la structure de la chromatine (Schlötterer et Tautz, 1992) et elles pourraient jouer un rôle dans la régulation génique ou dans les mécanismes de recombinaison (Stallings *et al.*, 1991; King, 1994). Certaines séquences répétées pourraient également jouer un rôle dans la réplication de l'ADN (Pritchard *et al.*, 1983; Cantatore *et al.*, 1987; Farrard *et al.*, 1994). Chez l'homme, des séquences de type microsatellite ont été associées à des maladies génétiques (syndrome du X fragile: Fu *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991; dystrophie musculaire de Duchêne: Brook *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1992; ataxie cérébro-spinale: Zoghbi *et al.*, 1993) et à certains cancers (Rhyu *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 1996).

Les locus microsatellites se caractérisent par un taux de mutation particulièrement élevé dont la conséquence directe est l'apparition de nouveaux allèles. Plusieurs mécanismes de mutation ont été proposés pour expliquer de tels taux de mutation: crossing-over inégaux (Brook *et al.*, 1992), glissement de la polymérase pendant la réplication sans réparation (Levinson et Gutman, 1987; Schlötterer et Tautz, 1992; Strand *et al.*, 1994). Le taux de mutation est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-2} par génération (Dallas, 1992; Weissenbach *et al.*, 1992).

3.3 Applications

Leur caractère apparemment universel, leur fort niveau de polymorphisme ainsi que leur répartition large au sein du génome font des microsatellites des marqueurs très utilisés chez les bovins (Beckman et Soller, 1990 ; Fries, 1993), les ovins (Crawford *et al.*, 1991; 1994), les chevaux (Marklund *et al.*, 1994) et l'être humain (Weber, 1990). Chez les espèces aquacoles, ces marqueurs sont également largement utilisés chez le bar (Garcia de Leon *et al.*, 1995), le saumon (Slettan *et al.*, 1993) et l'huître plate (Naciri *et al.*, 1995 ; Bierne *et al.*, 1997).

Outre les nombreuses applications en structuration des populations et en cartographie génétique, nous insisterons plus longuement sur les applications en recherche de parenté. Le premier avantage des marqueurs microsatellites est leur localisation nucléaire. Ce sont des marqueurs codominants qui permettent l'accès direct au génotype, les rendant très efficaces pour la recherche de parenté. Leur polymorphisme considérable en fait l'outil idéal pour les études intra population. Enfin, l'association avec la technique de PCR permet d'une part des études non destructrices sur des individus adultes et d'autre part des analyses aux stades précoces (stades larvaires). Les microsatellites, du fait de leur fort polymorphisme, sont souvent utilisés pour l'assignation de parenté. Outre les cas d'exclusion sans ambiguïté, un petit nombre de locus microsatellites est souvent suffisant pour la détermination des parents (chien: Fredholm et Winterø, 1996; koala: Houlden *et al.*, 1996; rat: Otsen *et al.*, 1995). Le typage par les marqueurs microsatellites est plus fiable que la méthode traditionnelle par les groupes sanguins qui entraîne souvent des erreurs et retarde les programmes d'amélioration génétique des animaux domestiques (Ron *et al.*, 1996).

La valeur sélective d'un être vivant peut être estimée par le nombre de ses descendants viables, c'est-à-dire sa contribution à la génération suivante. Accéder à cette donnée implique la recherche de parenté, technique déjà utilisée chez les végétaux (Burczyk *et al.*, 1996), les mammifères (Fredholm et Winterø, 1996; Heyen *et al.*, 1997), les oiseaux (Burke, 1989), les poissons (Morán *et al.*, 1996; Jones et Avise, 1997; Batargias *et al.*, 1997; Garcia de Leon *et al.*, 1998). Les marqueurs génétiques sont les outils idéaux pour mesurer cette contribution et sont couramment utilisés chez l'homme pour des recherches de paternité ou en médecine légale (Callen *et al.*, 1993; Alford *et al.*, 1994). Les marqueurs microsatellites sont suffisamment polymorphes chez *Crassostrea gigas* pour permettre des assignations de parenté: plus de 50 allèles différents existent sur chacun des 4 marqueurs disponibles au laboratoire (Huvet, 1997). Dans les cas où une distinction formelle entre plusieurs géniteurs

n'est pas possible, une approche probabiliste peut être développée (Alford *et al.*, 1994; Fredholm et Winterø, 1996; Heyen *et al.*, 1997). Cependant, la présence d'allèles nuls peut compliquer les études de filiation (voir Boudry *et al.*, 1998; Pemberton *et al.*, 1995; Chakraborty *et al.*, 1992).

L'utilisation de marqueurs génétiques très polymorphes, comme les microsatellites, est particulièrement intéressante lors de l'étude d'espèces à très grande fécondité, telles que les espèces aquacoles (Hospital *et al.*, 1992) où il est courant de produire un grand nombre d'individus à partir d'un nombre restreint de géniteurs. La variabilité génétique qui est présente au sein de ces élevages dépend alors du nombre de géniteurs utilisés et du taux de polymorphisme propre à l'espèce, mais peut aussi être réduite du fait de contributions déséquilibrées entre les parents, conduisant à un effectif efficace réduit des populations, avec comme conséquence possible une dépression de consanguinité à la génération suivante (Kincaid, 1976; Bierne *et al.*, 1998). En élevage comme dans le milieu naturel, l'effectif efficace (N_e) d'une population est presque toujours plus petit que le nombre d'individus observés. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette différence: générations chevauchantes, accouplements préférentiels, sex-ratio déséquilibré, sélection sur les géniteurs et sur leurs descendants (Avisé, 1994; Hedgecock, 1994). L'étude de l'évolution dans le temps au sein d'une même génération des contributions parentales peut permettre d'apporter des éléments de réponse.

Chez les mollusques, aucune étude de ce type n'a été publiée jusqu'à présent. Pourtant, chez de nombreux bivalves marins, dont les huîtres, un déficit en hétérozygotes a été mis en évidence par l'utilisation de marqueurs enzymatiques et génomiques (voir l'introduction de la partie IV). Ce phénomène peut s'expliquer si les tailles effectives des populations sont plus petites que celles observées, c'est-à-dire si seuls certains géniteurs potentiels contribuent à la formation de la génération suivante. La panmixie n'est plus conservée et l'équilibre d'Hardy-Weinberg est inapplicable pour calculer le taux d'hétérozygotie attendu. Le déficit en hétérozygotes s'accompagne souvent d'une corrélation positive entre le degré d'hétérozygotie d'un individu et sa valeur sélective, en milieu naturel comme en élevage (Fujio, 1982; Zouros et Pogson, 1994; Hedgecock *et al.*, 1995; Launey, 1998). Le fardeau génétique présent chez ces animaux (Beattie *et al.*, 1987; Bierne *et al.*, 1998), d'autant plus lourd que la taille effective de la population est petite, est probablement à l'origine de cette corrélation hétérozygotie-valeur sélective, un homozygote présentant plus de chance de porter deux allèles délétères récessifs à un même locus (Zouros, 1993).

La composition génétique d'une génération peut également varier d'un stade de la vie à un autre, sous l'effet de la sélection. Le suivi d'une même population dans le temps est alors indispensable pour comprendre les différents mécanismes mis en jeu dans la constitution d'une population à un moment donné.

Dans les programmes d'amélioration génétique, les familles sont souvent élevées dans des structures séparées avec des conditions environnementales différentes biaisant les comparaisons entre les familles. La possibilité d'identifier les familles de manière non destructive (biopsies) grâce aux marqueurs microsatellites permet de maintenir les familles mélangées dans le même environnement (Harris *et al.*, 1991; Herbinger *et al.*, 1995; Garcia de Leon *et al.*, 1998; Magoulas, 1998; Ferguson *et al.*, 1995; Kellog *et al.*, 1995; Colbourne *et al.*, 1996; Herbinger *et al.*, 1996).

Chapitre 6

**Analyses de parenté sur les larves et le naissain de *Crassostrea gigas* à
l'aide de marqueurs microsatellites**

**effet de la compétition gamétique et zygotique sur les contributions
parentales**

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous avons analysé les contributions parentales, à différents stades larvaire et naissain, dans la descendance de croisements contrôlés à partir de géniteurs *Crassostrea gigas*, de génotypes connus pour un marqueur microsatellite. L'effet éventuel de la compétition gamétique sur la contribution des parents à la génération suivante (sélection ou croisements préférentiels) a été évalué par la comparaison de deux types de croisements: avec compétition gamétique (fécondations en masse) et sans compétition gamétique (fécondations séparées). L'analyse de différents stades larvaires et post larvaires permet également d'étudier l'évolution dans le temps des contributions relatives des parents et de détecter d'éventuelles mortalités différentielles entre les familles, mises en évidence au stade adulte au chapitre 2. Parallèlement, des tentatives d'analyses des groupes de tamisage isolés au chapitre 1, ont permis de développer des méthodes d'analyse de parenté (programmes Visual Basic) mais des problèmes de conservation d'ADN ont limité l'analyse (effectifs trop faibles).

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Croisements

Cent huîtres provenant du milieu naturel (côte atlantique française) ont été marquées individuellement, biopsées (fragment de branchie) puis maturées pendant une période de six semaines selon la même procédure que celle décrite au chapitre 1. L'ADN a été extrait par la méthode Phénol-Chloroforme. Le génotype de chaque géniteur a été déterminé au locus microsatellite dinucléotidique L10. Parmi ces 100 individus, 5 mâles et 5 femelles ont été choisis de manière à pouvoir effectuer les reconnaissances de parenté sur la descendance à partir de ce seul locus et le plus facilement possible: chacun des parents est hétérozygote, et aucun des parents ne possède le même allèle. Ainsi, l'identification d'un allèle chez l'un des descendants permet à coup sûr de désigner le parent correspondant en s'affranchissant de l'ambiguïté due aux allèles nuls (Koorey *et al.*, 1993; Callen *et al.*, 1993). Les 5 mâles et les 5 femelles ont été croisés de deux manières différentes par la procédure décrite en détail au chapitre 1:

- 25 croisements séparés: fécondations séparées de chaque couple dans un bêcher, soit 25 bêchers au total. L'ensemble est mélangé trois heures après la fécondation et constitue le lot noté S.
- un croisement mélangé: fécondation des 5 femelles par les 5 mâles dans un seul bêcher. Le

lot résultant est noté M.

Dans les 2 cas, le nombre de gamètes est égal pour les 5 mâles et pour les 5 femelles, avec un ratio sperme-ovocyte de 150:1. Les modalités de l'élevage larvaire et de la fixation sont décrites au chapitre 1. Les deux types de croisement ont généré deux populations larvaires divisées chacune en 3 réplicats (notés 1, 2 et 3 pour le lot M et 4, 5 et 6 pour le lot S). Des larves ont été prélevées dans chaque réplicat à chaque tamisage, toutes les 48 heures, dès j1, soit 24h après la fécondation. Des larves âgées de 6 jours (lots S et M) et de 18 jours (lot S) sont individualisées, mesurées (Projecteur de profil, Nikon) avec une précision de 1 μm puis analysées pour leur parenté. Des post larves âgées de trois mois issues du lot S (j90), sont également individualisées, pesées avec une précision de 0,01 g puis leur parenté déterminée.

2.1.2. Groupes de tamisage (chapitre 1)

Lors de la production des groupes de tamisage étudiés au chapitre I, des prélèvements de larves et de naissain ont été effectués respectivement lors de la mise en fixation à 17, 20, 23 et 26 jours après la fécondation respectivement pour les groupes de tamisage 1, 2, 3 et 4 puis 43 jours après la fécondation. Le naissain a été prélevé dans les lots mis en fixation sur brisure. Tous ces prélèvements ont été stockés à température ambiante dans de l'alcool à 95 %. Avant chaque série d'extraction, les individus ont été mesurés au μm près (Nikon profile projector) puis broyés.

2.2. Protocoles d'extraction d'ADN

2.2.1. Extraction d'ADN génomique de naissain par la méthode Phénol-Chloroforme (Estoup *et al.*, 1996; Moore, 1993) Annexe 9

Cette méthode s'applique aux tissus conservés dans l'éthanol absolu. Un fragment de 2 mm^3 environ de tissu (branchie ou manteau) est prélevé et soumis à l'action de la protéinase K 0,12 mg.ml^{-1} dans un tampon d'extraction (EDTA 0,5 M pH 8,0, SDS 0,5 %, Tris.Cl 10 mM pH 8,0) pendant une nuit à 56 ° C. Les protéines sont ensuite exclues du mélange réactionnel par action de phénol saturé à l'eau pH 8,0 et de SEVAQ (alcool isoamylique et chloroforme en proportion 24:1). L'ADN est ensuite précipité dans l'éthanol absolu à - 20 °C pendant 1 heure. Après centrifugation, le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70 % - 20 ° C; l'alcool est ensuite évaporé (Gyro Vap) et le culot d'ADN est enfin redissout dans de l'eau. La quantité d'ADN et son degré de pureté sont appréciés sur gel d'agarose 1 %.

2.2.2. Extraction d'ADN génomique de larves: méthode au Chelex (Walsh *et al.*, 1991; Bierne *et al.*, 1998, Schizas *et al.*, 1997) Annexe 9

Cette méthode est particulièrement bien adaptée à l'extraction d'ADN à partir de fragments de très petite taille destinés à une amplification (PCR). Plutôt qu'une méthode de purification, il s'agit d'une méthode d'inactivation de tous les facteurs susceptibles de dégrader les acides nucléiques. C'est la seule méthode utilisable pour les extractions d'ADN à partir de larves de taille maximale de 300 µm. Un fragment de tissu, une larve entière ou une post-larve préalablement broyées sont incubés dans une solution de résine Chelex 5 %, protéinase K 0,12 mg.ml⁻¹ et TE 1X pendant une nuit à 56 °C. Le mélange est ensuite homogénéisé par agitation énergique (Vortex), chauffé à 100 °C pendant 15 minutes pour dénaturer irréversiblement les protéines puis centrifugé. Le surnageant est récupéré, stocké à - 20 °C et utilisé tel quel pour les PCR.

2.3. Amplification par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) Annexe 9

Les amorces utilisées ont été définies par l'équipe du Pr. Zouros à l'IBMC (Institute of Marine Biology of Crete) d'une part et par l'équipe de F. Bonhomme du Laboratoire Génome et Populations (Montpellier, France). Trois locus microsatellites ont été isolés et séquencés. Trois couples d'amorces (nommées CG44, CG49 et CG108) ont été choisis dans les régions flanquantes des séquences répétées (Magoulas *et al.* , in press). Les conditions de PCR (température d'appariement, concentration en MgCl₂) ont été optimisées par l'équipe du Pr. Zouros de l'Institute of Marine Biology en Crète. La taille des produits de PCR, les températures d'appariement et les concentrations en MgCl₂ sont indiquées au tableau 6-1 pour les 2 locus utilisés.

Une seule amorce est marquée par transfert enzymatique d'un groupe phosphate (Kinase, tampon kinase 10 X, ³³P- γ dATP, amorce) pendant 30 minutes à 37 °C. Les protéines du mélange réactionnel sont ensuite irréversiblement dégradées par la chaleur (10 minutes à 70 °C). L'amorce marquée est ensuite ajoutée au mélange réactionnel de PCR. Les réactions de PCR se font dans des plaques à 96 micropuits (Costar). La réaction de polymérisation en chaîne est faite dans un thermocycleur (Perkin-Elmer) avec les étapes suivantes: 5 minutes à 94 °C pour une dénaturation initiale, 30 cycles (1 minute à 84 °C pour la dénaturation, 1 minute à 53 ou 55 °C selon les locus pour l'appariement et 1 minute 15 secondes à 72 °C pour l'élongation) puis une étape de 5 minutes à 72 °C pour l'élongation finale. Le protocole a été optimisé pour chaque type d'échantillon (ADN d'adulte ou de naissain extrait au Phénol Chloroforme, ADN de larve extrait au Chélex) et de locus (Annexe 9).

2.4. Migration sur gel et autoradiographie (annexe 9)

Après addition de 8 µl de tampon de migration (25ml de formamide, 0,025g de xylène cyanol, 0,025g de bleu de bromophénol et 1 ml d'EDTA 0,5M) par échantillon et une dénaturation de 5 mn à 95 °C, les produits de PCR sont ensuite mis à migrer sur gel dénaturant de polyacrylamide à 6 % dans un tampon de charge à 50 W (TBE: 0,13 M Tris, 2,5 mM EDTA, 4,5 mM Acide borique). La durée de migration est optimisée pour chaque locus: 5 heures pour le locus CG44 et 2,5 heures pour le locus L10. Le gel est ensuite séché à 80 °C sous vide (sécheur Savant) pendant environ 2 heures puis mis en contact avec un film (Kodak, BioMax) dans une cassette pour autoradiographie pendant une durée (6 à 48 h) dépendant du niveau moyen de radioactivité présent sur le gel (détecteur).

2.5. Analyse des données

Un programme en Visual Basic a été développé sous Microsoft Excel (voir annexe 7) dans le but de déterminer, à partir du génotype en un locus particulier pour chaque individu, l'ensemble des parents possibles. Tous les individus ont tout d'abord été typés sur le locus CG44. Le programme donne par la suite la liste des individus pour lesquels aucun parent n'a été trouvé (génotypes aberrants), plus de deux parents possibles ont été trouvés (ambiguïté) et 2 parents trouvés. Les individus montrant une ambiguïté doivent être typés sur un autre locus.

Le test G (Sokal et Rohlf, 1995) est utilisé pour calculer les différences de contributions parentales: pour un même type de croisement, à un même stade de développement, entre les 5 mâles, entre les 5 femelles, entre les 25 familles et entre les deux types de croisements (M et S), entre deux stades de développement (j6, j18 et j90), ou entre deux lots d'un même type de croisement.

Pour chaque point d'échantillonnage, pour évaluer l'hétérogénéité due aux interactions entre mâle et femelle, c'est à dire l'hétérogénéité qui résulterait de croisements préférentiels, une valeur globale G_g est calculée: c'est la somme des valeurs de G mesurant les différences de contributions parentales:

- des 5 mâles pour une même femelle, effectuée pour les 5 femelles
- des 5 femelles pour un même mâle, effectuée pour les 5 mâles,

soit 10 valeurs G_i à 4 degrés de liberté chacune. On obtient alors un G résiduel: $G_r = \sum G_i - G_f = G_g - G_f$, à $4 \cdot 10 - 24 = 16$ degrés de liberté où G_f mesure l'hétérogénéité entre les 25 familles (24 degrés de liberté). G_r correspond à l'interaction entre mâle et femelle.

L'hétérogénéité des tailles et des poids a été testée par ANOVA (SAS PROC GLM). Les

ségrégations au locus L10 ont été analysées par test χ^2 avec, comme effectifs théoriques, les effectifs attendus sous l'hypothèse d'une ségrégation de type 1:1.

3. Résultats

3.1. Groupes de tamisage

Le locus CG44 possède 28 allèles chez les 40 parents. Les fréquences alléliques sont indiquées au tableau 6-2.

Dans ce croisement (voir chapitre 1), 400 familles sont possibles. Des problèmes de conservation des individus n'ont pas permis d'exploiter et de poursuivre l'analyse des groupes de tamisage. Cependant, un programme d'aide à la recherche de parenté a été développé (Annexe 6). La première étape de ce programme est la construction d'un fichier de données contenant tous les génotypes possibles générés par les 40 parents. La seconde étape est la recherche de la liste de mâles et femelles, parents possibles pour un descendant donné.

Les 40 parents et les descendants du croisement 20X20 ont été analysés. Il existe 400 familles possibles. Sur 197 individus analysés, 153 ont été assignés à 2 familles ou plus et 44 directement à une famille.

3.2. Croisement S et M

A j6, 272 et 249 individus ont été analysés respectivement pour le croisement séparé (S) et pour le croisement mélangé (M). A j18, 399 individus ont été analysés pour le croisement S. Après la fixation, à j90, 244 individus ont été analysés pour les croisements S. L'analyse de parenté a été effectuée aisément dans la mesure où les 10 parents choisis portaient presque tous des allèles différents au locus L10, et étaient hétérozygotes pour ce locus (génotypes des parents au tableau 6-3). Seuls les parents M1 et F1 partagent un allèle commun (25), ce qui est sans conséquence étant donné que ces 2 individus sont les seuls à partager un allèle. Dans la descendance, les 20 allèles ont ségrégué et aucun allèle nouveau, qui n'aurait pas été présent chez les parents, n'est apparu, confirmant le fait qu'aucune mutation ne s'est produite dans les échantillons étudiés et qu'aucune contamination zootechnique n'a eu lieu.

tableau 6-1: Amorces des locus utilisés. Tm = température d'appariement optimisée (Magoulas *et al.*, 1995)

Locus	Tm (°C)	Motif	amorce (S: sens A: Antisens)	taille du fragment cloné
CG44	53	(CA) _n	S: gaa gaa tgt cat aga ttg atg g A: cat gcc tgt tta cca gta ttc	391
L10	55	(AG) _n	S: cat gtt ttc cct tga ctg atc c A: ggt caa ttc aaa gtc aat ttc cc	330

tableau 6-2: Allèles chez les 40 parents au locus CG44 et fréquences alléliques. Bien que le motif de base soit dinucléotidique, de nombreux décalages d'une paire de bases sont présents (allèles notés X,5).

Allèle	Fréquence	Allèle	Fréquence
1	0,0375	16,5	0,05
7	0,0375	17	0,0625
8	0,025	17,5	0,05
8,5	0,0125	18	0,0125
9,5	0,0375	18,5	0,05
10	0,0625	19	0,0125
10,5	0,025	19,5	0,05
12	0,05	20	0,0375
12,5	0,0125	20,5	0,0125
13	0,025	21	0,0125
14	0,025	21,5	0,0125
14,5	0,0875	23	0,05
15	0,05	23,5	0,025
16	0,05	24	0,025

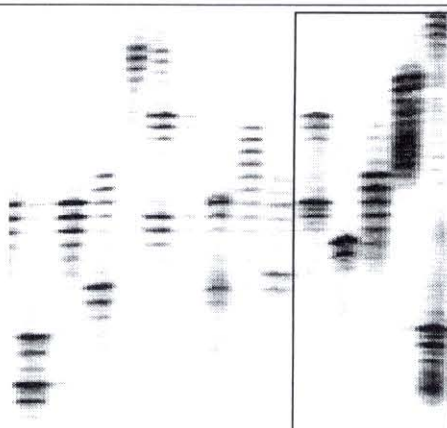


figure 6-1: Autoradiographie d'un gel d'électrophorèse sur polyacrylamide après amplification radioactive au locus L10. Les 9 échantillons de gauche sont des larves à j18 et les 5 échantillons de droite correspondent aux 5 mâles (encadré). On observe la correspondance entre l'une des bandes de chaque larve et celle de l'un des mâles, représentant l'allèle paternel. Deux bandes successives ont une différence de taille de deux nucléotides (motif AG).

3.2.1. Ségrégation au locus L10

L'analyse de la ségrégation gamétique au locus L10, tous lots confondus, montre une distorsion de ségrégation significative pour tous les parents excepté pour le mâle M1 (tableau 6-3). L'analyse de la ségrégation zygotique par famille est représentée en Annexe 9.

Pour chacun des parents, les effectifs par allèle ne varient pas entre j6 et j18 pour le croisement S. Ces deux stades ont donc été regroupés dans la suite (notés j6-j18 S). Entre j6-j18 S et j90 S, les effectifs par allèle ne varient pas significativement sauf pour la femelle F4 ($P = 0,0194$): la ségrégation est 64:22 à j6-j18 S et 80:6 à j90 S, l'écart entre les 2 allèles se creuse au cours du temps. Les effectifs par allèle ne changent pas significativement à j6 entre les deux types croisements S et M.

Le même type de résultat est donné tableau 6-4 pour chacun des croisements et stades de développement. La ségrégation gamétique du mâle M1 est significativement déséquilibré uniquement pour le stade j6 ($P = 0,04$).

3.2.2. Contributions parentales

Pour chaque point d'échantillonnage, aucune différence significative de contributions parentales n'existe entre les 3 réplicats d'élevage, ce qui autorise le regroupement (tableau 6-5). La comparaison des tableaux observés avec les tableaux théoriques où chacun des 5 mâles et 5 femelles aurait contribué de manière égale, montre qu'il existe un déséquilibre de contribution parentale significatif (tableau 6-6). Seul le croisement mélangé à j6 présente une différence significative de contribution entre les 25 familles ($P = 0,006$). Aucune hétérogénéité due à l'interaction entre mâle et femelle n'est significative quelle que soit la date d'échantillonnage (tableau 6-7). Cependant, à j18, la famille 21, correspondant au croisement mâle 1 par femelle 5, est nettement plus représentée que les autres. En fait, les disparités visualisées sur les graphes sont essentiellement dues aux différences de contributions des mâles d'une part, des femelles d'autre part, et à leurs effets cumulés.

3.2.3. Compétition gamétique

Les deux types de croisement ont été analysés à j6, stade larvaire le plus proche de la fécondation et assez avancé pour permettre une amplification par PCR. Les contributions des mâles sont significativement différentes entre les deux croisements ($G=11,26$; $P = 0,024$; figure 6-2), mais pas les contributions des femelles ($G=3,23$; $P = 0,520$; figure 6-3).

tableau 6-3: Génotypes des parents et ségrégation gamétique au locus L10 pour chacun des 10 parents chez *Crassostrea gigas*. P est la probabilité associée au χ^2 effectif observé contre effectif attendu (ségrégation 1:1).

Ségrégation gamétique				Ségrégation gamétique			
Parents	Allèle	Nb	P	Parents	Allèle	Nb	P
M1	18	159	0,128	F1	25	122	0,002
	25	133			31	78	
M2	14	35	< 0,0001	F2	12	95	0,012
	28	138			30	133	
M3	19	62	< 0,0001	F3	11	125	< 0,0001
	23	150			17	73	
M4	-2	121	0,027	F4	21	162	< 0,0001
	15	158			24	32	
M5	9	88	0,019	F5	26	132	< 0,0001
	34	122			37	214	

tableau 6-4: Génotypes des parents et ségrégation gamétique au locus L10 pour chacun des 10 parents chez *Crassostrea gigas* et pour le croisement séparé (S) aux dates j6 et j18 regroupées, j90 et pour le croisement mélangé (M) à j6. P est la probabilité associée au χ^2 effectif observé contre effectif attendu (ségrégation 1:1). j6-j18 S vs j 90 S est la comparaison entre j6-j18 S et j90 S. j6 S vs j6 M est la comparaison entre les croisements S et M à j6: NS = Non significatif au seuil de 5 %.

Ségrégation gamétique									
Parent	Allèle	j6 - j18 S		j90 S		j6 M		j6 - j18 S vs j 90 S	j6 S vs j6 M
		Nb	p	Nb	p	Nb	p		
M1	18	105	0,835	31	0,090	23	0,063	NS	NS
	25	102		19		12			
M2	14	18	6,E-11	10	0,239	7	< 0,0001	NS	NS
	28	84		16		38			
M3	19	36	0,005	15	< 0,0001	11	0,004	NS	NS
	23	64		57		29			
M4	-2	73	0,934	8	0,001	40	0,084	NS	NS
	15	72		29		57			
M5	9	41	0,002	32	0,515	15	0,398	NS	NS
	34	75		27		20			
F1	25	80	0,006	21	0,077	21	0,631	NS	NS
	31	49		11		18			
F2	12	64	0,072	11	0,827	20	0,024	NS	NS
	30	86		10		37			
F3	11	60	0,020	44	0,003	21	0,411	NS	NS
	17	37		20		16			
F4	21	64	6,E-06	80	< 0,0001	18	0,003	0,0194	NS
	24	22		6		4			
F5	26	81	0,001	15	0,086	36	0,011	NS	NS
	37	127		26		61			

tableau 6-5: Comparaison des contributions parentales marginales entre les réplicats d'élevage (de 1 à 3 pour le croisement séparé et de 4 à 6 pour le croisement mélangé).

Date	Croisement	Comparaison	Mâles		Femelles	
			G	p	G	p
j6	mélangé	1-2	2,27	0,686	0,85	0,931
		1-3	4,03	0,402	1,11	0,893
		2-3	5,53	0,237	4,54	0,337
j18	séparé	4-5	2,03	0,730	1,34	0,854
		4-6	7,86	0,097	3,99	0,407
		5-6	7,49	0,112	9,41	0,052
j18	mélangé	1-2	1,47	0,832	1,10	0,895
		1-3	3,04	0,551	1,02	0,907
		2-3	2,09	0,720	0,76	0,943

tableau 6-6: Contributions parentales: Tableaux de contingence par famille, et fréquences marginales des croisements mélangés (M) à j6 (B) et séparés (S) à j6 (A), j18 (C) et j90 (D). Les effectifs sont indiqués par famille et les fréquences marginales (par mâle et par femelle). Les tableaux de droite donnent la statistique G et la probabilité associée entre des effectifs observés contre les effectifs attendus (contributions équilibrées, 1/25 pour chacune des 25 familles).

A	j6 S	F1	F2	F3	F4	F5	%				
	M1	18	10	8	9	25	0,26				
	M2	9	13	11	8	19	0,22				
	M3	8	8	3	10	14	0,16				
	M4	11	17	4	5	21	0,21				
	M5	10	13	7	6	5	0,15				
	%	0,21	0,22	0,12	0,14	0,31	1				
								Mâles		Femelles	
								G	p	G	p
								2,81	0,589	7,57	0,109
B	j6 M	F1	F2	F3	F4	F5	%				
	M1	4	1	3	0	26	0,14				
	M2	7	8	5	5	21	0,18				
	M3	4	14	2	9	11	0,16				
	M4	19	21	20	4	31	0,38				
	M5	5	9	6	6	8	0,14				
	%	0,16	0,21	0,14	0,1	0,39	1				
								Mâles		Femelles	
								G	p	G	p
								10,24	0,037	13,95	0,007
C	j18 S	F1	F2	F3	F4	F5	%				
	M1	25	20	17	19	56	0,34				
	M2	4	12	4	5	16	0,1				
	M3	8	11	10	8	17	0,14				
	M4	20	22	17	6	22	0,22				
	M5	19	17	12	17	15	0,2				
	%	0,19	0,2	0,15	0,1	0,32	1				
								Mâles		Femelles	
								G	p	G	p
								16,81	0,002	8,807	0,066
D	j90 S	F1	F2	F3	F4	F5	%				
	M1	8	2	17	17	5	0,2				
	M2	2	3	5	12	4	0,11				
	M3	11	4	16	20	21	0,29				
	M4	1	7	11	14	4	0,15				
	M5	10	5	15	24	6	0,25				
	%	0,13	0,09	0,26	0,4	0,16	1				
								Mâles		Femelles	
								G	p	G	p
								7,401	0,116	14,709	0,005

tableau 6-7: Hétérogénéité entre familles et hétérogénéité due aux interactions entre mâles et femelles (mâle x femelle) pour chaque point d'échantillonnage.

Date	Croisement	Familles		Interaction mxf	
		G_i	p	G_i	p
j6	M	44,86	0,01	16,10	0,45
j6	S	16,44	0,87	16,10	0,45
j18	S	32,52	0,12	8,43	0,94
j90	S	31,85	0,13	6,80	0,98

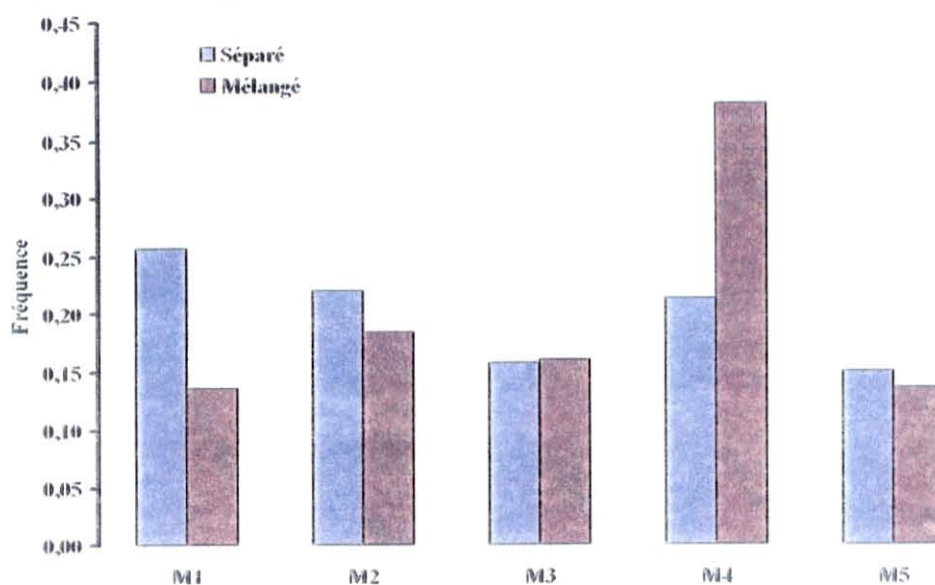


figure 6-2: Contributions (en fréquences) des mâles (M1 à M5) à j6 dans les deux types de croisements, séparé et mélangé.

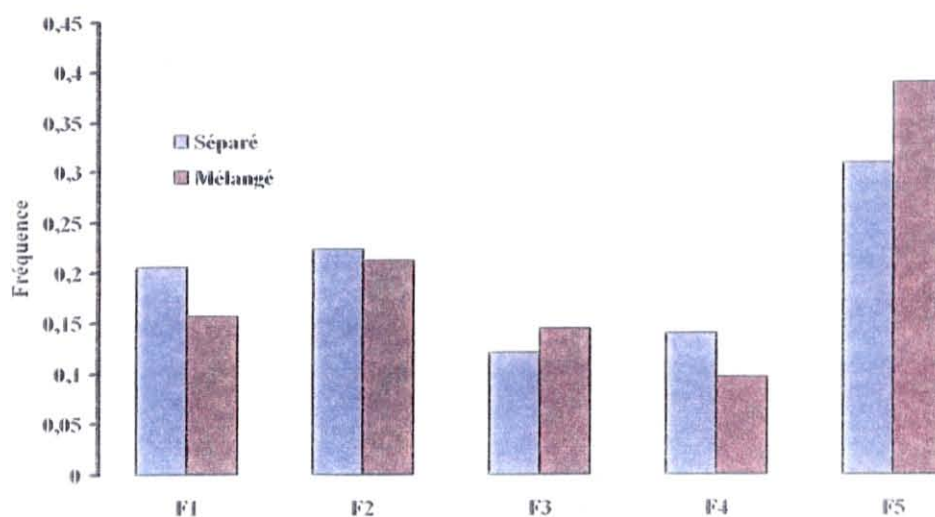


figure 6-3: Contributions (en fréquences) des femelles (F1 à F5) à j6 dans les deux types de croisements, séparé et mélangé.

tableau 6-8: Contributions des femelles à j6 sur les croisements S et M.

j6 S+M	F1	F2	F3	F4	F5
M	39	53	36	24	97
S	56	61	33	38	84
S + M	95	114	69	62	181
% M	0,16	0,21	0,14	0,10	0,39
% S	0,21	0,22	0,12	0,14	0,31
%	0,18	0,22	0,13	0,12	0,35

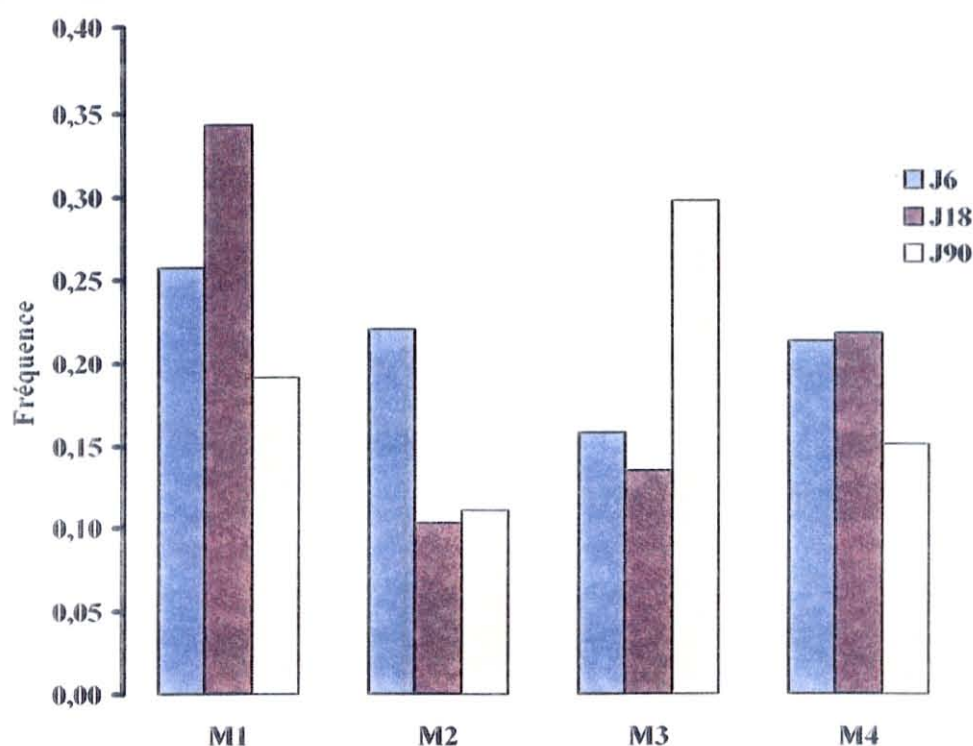


figure 6-4: Contributions (en fréquences) des mâles (M1 à M5) pour les croisements séparés à j6, j18 et j90.

Les croisements M et S ont été regroupés et l'hétérogénéité des contributions des femelles analysée à nouveau à j6: l'hétérogénéité entre femelles est encore très significative ($G = 19,7$; $P = 0,0006$; tableau 6-8).

3.2.4. Evolution dans le temps de la structure génétique de la population

Les changements dans le temps des contributions parentales, c'est-à-dire des fréquences de chaque famille dans la population, sont illustrés aux figure 6-4 et figure 6-5, représentant les contributions parentales marginales dans les croisements S aux stades j6, j18 (avant métamorphose) et j90 (juvéniles de 3 mois). Les descendants du croisements mélangé aux stades j18 et j90 sont en cours d'analyse. Entre les stades j6 et j18, il existe une différence significative de contributions des

mâles ($G = 11,94$; $P = 0,018$), mais pas des femelles ($G = 0,90$; $P = 0,925$). Entre les stades j18 et j90, ces contributions sont significativement différentes pour les mâles ($G = 14,03$; $P = 0,007$) et pour les femelles ($G = 29,06$; $P = 7,596.10^{-6}$).

3.2.5. Comparaison entre compétition spermatique et survie des descendants des mâles

La comparaison du tableau des contributions parentales du croisement M, à j6 (tableau 6-6A), avec le tableau des contributions parentales des croisements S à j18 (tableau 6-6C) permet de tester la corrélation entre l'efficacité du mâle en situation de compétition spermatique et la survie larvaire des descendants, de ce même mâle. Ces deux tableaux sont significativement différents ($G = 33,69$; $P = 8,626.10^{-7}$), montrant qu'il n'y a pas de corrélation entre contribution et survie chez les mâles.

3.2.6. Croissance

Aucun des croisements, à aucun des stades analysés, ne présente de différence significative de taille (ou de poids) entre les 25 familles (figure 6-6, tableau 6-9), ni entre les descendants des 5 mâles (figure 6-7A, tableau 6-10) ou des 5 femelles (figure 6-7B, tableau 6-11). Cependant, des différences significatives de taille sont observées entre les réplicats des croisements mélangés (1, 2 et 3) et séparés (4, 5 et 6) à j6 (tableau 6-12, tableau 6-13 et tableau 6-14), et entre les différents lots à j6 et j18 (tableau 6-15); de même, une différence significative de poids existe entre les lots à j90 (tableau 6-15).

4. Discussion

4.1. Des contributions parentales déséquilibrées

L'étude de deux types de croisement en présence et absence de compétition gamétique chez *Crassostrea gigas*, a révélé des déséquilibres très importants dans les participations des mâles et des femelles. Néanmoins, aucune incompatibilité complète entre les gamètes n'a pu être observée, toutes les familles ont participé à la formation de la génération suivante, même en situation de compétition gamétique. Les contributions sont significativement déséquilibrées uniquement pour le croisement en situation de compétition gamétique. Dans tous les cas, l'hétérogénéité à l'intérieur des croisements est due aux différences de contributions entre les 5 femelles d'une part et entre les 5 mâles d'autre part; les interactions entre les mâles et femelles, qui résulteraient de fécondations préférentielles, ne sont pas source d'hétérogénéité. Les effectifs dans chacune des familles étant souvent faibles, l'hétérogénéité due à l'interaction entre mâles et femelles est difficile à estimer

précisément. Des différences dans l'état de maturation des femelles d'une part et des différences dans la qualité du sperme (motilité en particulier) des mâles d'autre part, peuvent expliquer de tels déséquilibres dans les contributions des mâles et des femelles 6 jours après fécondation. Au chapitre 1, des effets appelés "individu mâle" et "individu femelle" significatifs avaient été observés sur les taux d'éclosions calculés 3 heures après fécondation. Ces deux types de résultats sont concordants et montrent que ces déséquilibres seraient en partie dus à des processus très précoces. De tels résultats sont en accord avec l'étude de Li et Hedgecock (1998) sur des populations naturelles de la même espèce et montrant que le succès de reproduction est un caractère fortement variable.

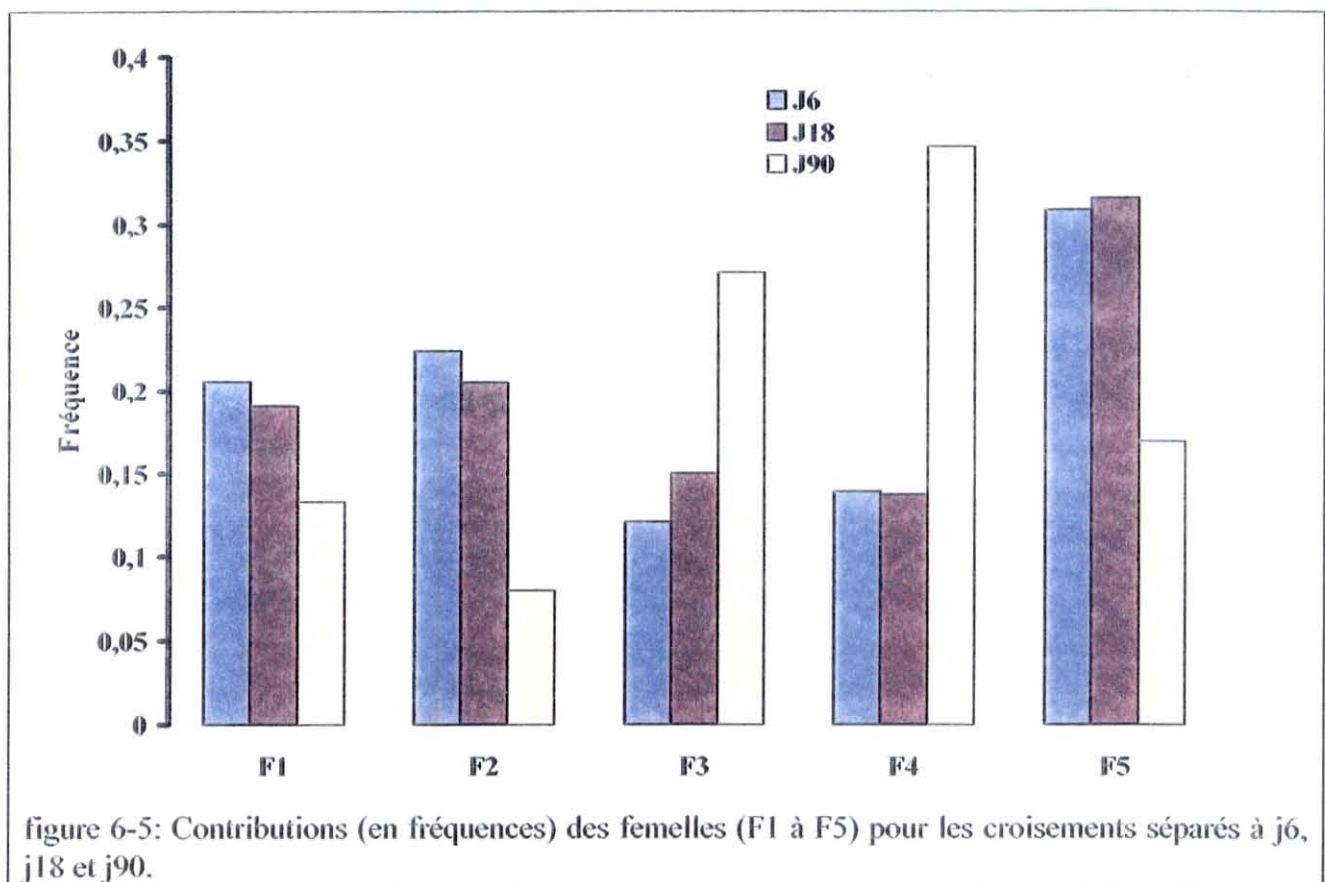


tableau 6-9: Test d'hétérogénéité de longueur (à j6 et j18) ou de poids (à j90) entre les familles à chaque stade.

	Source de variation	ddl	Somme des Carrés	Carré moyens	F	P
j6 M	Modèle	23	759	33,01	0,44	0,99
	Erreur	225	17063	75,83		
	Totale	248	17822			
j6 S	Modèle	24	1305	54,37	0,82	0,704
	Erreur	247	16291	65,96		
	Totale	271	17596			
j18 S	Modèle	24	39874	1661,42	0,92	0,581
	Erreur	374	678517	1814,22		
	Totale	398	718391			
j90 S	Modèle	24	2,39	0,1	0,84	0,677
	Erreur	219	25,87	0,12		
	Totale	243	28,27			

tableau 6-10: Effet du mâle (M1 à M5) sur la longueur ou le poids total des descendants aux stades larvaires j6 et j18 et naissain j90.

	Source de variation	ddl	Somme des Carrés	Carré moyens	F	P
j6 M	Modèle	4	80	20,1	0,28	0,893
	Erreur	244	17742	72,71		
	Totale	248	17822			
j6 S	Modèle	4	75	18,85	0,29	0,886
	Erreur	267	17521	65,62		
	Totale	271	17596			
j18 S	Modèle	4	5038	1259,61	0,7	0,595
	Erreur	394	713353	1810,54		
	Totale	398	718391			
j90 S	Modèle	4	0,47	0,12	1,02	0,397
	Erreur	239	27,79	0,12		
	Totale	243	28,27			

tableau 6-11: Effet de la femelle (F1 à F5) sur la longueur ou le poids total des descendants aux stades larvaires j6 et j18 et naissain j90.

	Source de variation	ddl	Somme des Carrés	Carré moyens	F	P
j6 M	Modèle	4	46	11,38	0,16	0,96
	Erreur	244	17777	75,86		
	Totale	248	17822			
j6 S	Modèle	4	41	10,25	0,16	0,96
	Erreur	267	17555	65,75		
	Totale	271	17596			
j18 S	Modèle	4	11087	2771,82	1,54	0,189
	Erreur	394	707305	1795,19		
	Totale	398	718391			
j90 S	Modèle	4	0,47	0,12	1,02	0,397
	Erreur	239	27,79	0,12		
	Totale	243	28,27			

tableau 6-11: Effet de la femelle (F1 à F5) sur la longueur ou le poids total des descendants aux stades larvaires j6 et j18 et naissain j90.

	Source de variation	ddl	Somme des Carrés	Carré moyens	F	P
j6 M	Modèle	4	46	11,38	0,16	0,96
	Erreur	244	17777	75,86		
	Totale	248	17822			
j6 S	Modèle	4	41	10,25	0,16	0,96
	Erreur	267	17555	65,75		
	Totale	271	17596			
j18 S	Modèle	4	11087	2771,82	1,54	0,189
	Erreur	394	707305	1795,19		
	Totale	398	718391			
j90 S	Modèle	4	0,47	0,12	1,02	0,397
	Erreur	239	27,79	0,12		
	Totale	243	28,27			

tableau 6-12: Tailles (en μm) et poids (en g) moyens des individus à chaque point d'échantillonnage.

	Mélangé	Séparé
j6 (μm)	106,5 \pm 0,49	100,65 \pm 0,54
j18 (μm)		268,69 \pm 2,13
j90 (g)		0,77 \pm 0,29

tableau 6-13: Tailles moyennes \pm se des individus dans chacun des lots à j6 et j18.

	Lots					
	1	2	3	4	5	6
j6 (μm)	106,61 \pm 0,81	102,24 \pm 1,24	108,04 \pm 0,82	100,13 \pm 0,65	98,78 \pm 1,69	102,19 \pm 0,81
j18 (μm)				274,82 \pm 3,67	261,15 \pm 3,64	267,21 \pm 3,60
j90 (g)				0,82 \pm 0,04	0,70 \pm 0,03	0,78 \pm 0,04

tableau 6-14: Résultats de l'analyse de variance testant l'effet du type de croisement (S ou M) sur la taille des descendants à j6.

Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F	P
Modèle	1	4469	4468,56	67,53	0,0001
Erreur	515	34079	66,17		
Totale	520	39887			

tableau 6-15: Test d'hétérogénéité de longueur (à j6 et j18) ou de poids (à j90) entre les lots à chaque stade.

Stade	Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F	P
j6	Modèle	5	5808	1161,56	17,55	0,0001
	Erreur	515	34079	66,17		
	Totale	520	39887			
j18	Modèle	2	11908	5953,9	3,34	0,037
	Erreur	396	706484	1784,05		
	Totale	398	718391			
j90	Modèle	2	0,72	0,36	3,16	0,044
	Erreur	241	27,54	0,11		
	Totale	243	28,27			

4.2. Compétition spermatique

Cette expérience démontre la présence de compétition spermatique chez *Crassostrea gigas* dans les conditions d'un croisement contrôlé en éclosérie, mise en évidence au stade larvaire, 6 jours après fécondation. Cependant, il n'y a pas de compétition ovocytaire. Ce résultat est explicable aisément lorsque l'on considère les ovocytes immobiles et les spermatozoïdes dont la bonne motilité conditionne une fécondation correcte. Dans les croisements séparés, avec 150 spermatozoïdes par ovocyte, il est très probable que la fécondation réussisse avec une bonne efficacité. En condition de compétition gamétique, les spermatozoïdes les plus motiles "saturent" les ovocytes présents et les mécanismes de blocage de la polyspermie empêchent les spermatozoïdes les moins performants de contribuer à la génération suivante. En fait, il n'existe pas de preuves du blocage de la polyspermie chez les mollusques au sens strict (Raven, 1966); parfois, plusieurs spermatozoïdes peuvent entrer dans l'ovocyte, mais un seul se développe en pronucleus (Crabb, 1927; De Laramberg, 1939; Bretschneider, 1948; Horstmann, 1955) avec disparition des noyaux mâles surnuméraires. Ce résultat montre donc l'existence d'une compétition gamétique et plus précisément d'une compétition spermatique, et peut expliquer l'effet "individu mâle" mis en évidence sur le taux de développement au Chapitre 1.

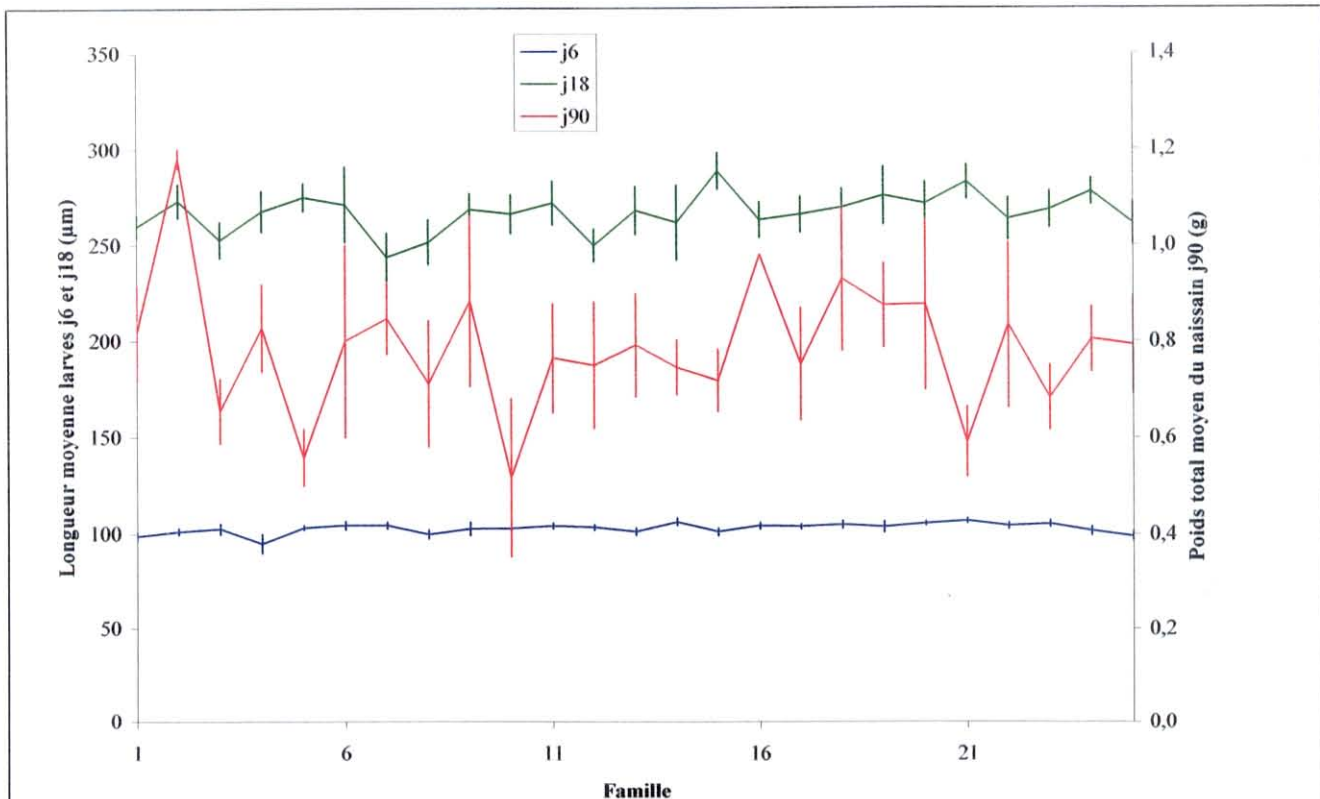


figure 6-6: Longueur et poids total moyen des descendants par famille. La famille n'affecte pas significativement la taille des descendants.

4.3. Evolution durant la phase larvaire

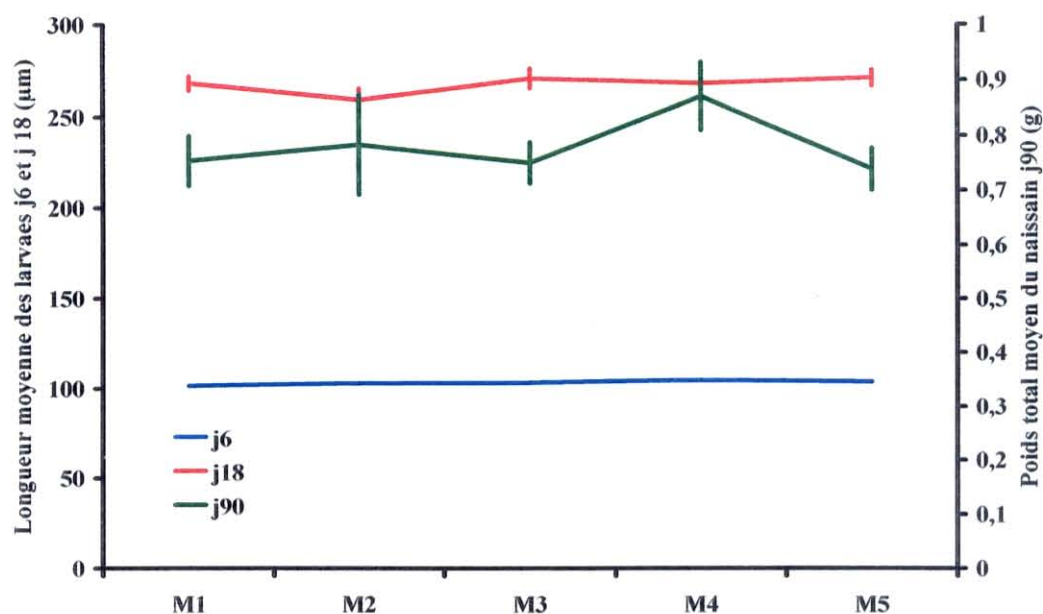
Au cours de la phase larvaire, les contributions parentales des mâles changent entre j6 et j18 et deviennent significativement différentes. Ce résultat ne peut s'expliquer que par une mortalité différentielle précoce des larves. Cependant, les mâles ayant été favorisés par la compétition spermatique ne sont pas ceux dont les larves ont la meilleure survie: en particulier, le mâle M4, possédant de nombreux descendants à j6, voit la survie de ceux-ci pendant la phase larvaire inférieure à celle des descendants du mâle M1, dont la contribution à j6 était pourtant assez faible.

Les contributions des femelles sont déséquilibrées, mais ne varient pas durant la phase larvaire entre j6 et j18. Ainsi l'effet maternel de départ, matérialisé par des déséquilibres forts entre les femelles à j6, n'est pas perturbé par des mortalités différentielles entre j6 et j18 dans les conditions de notre expérience.

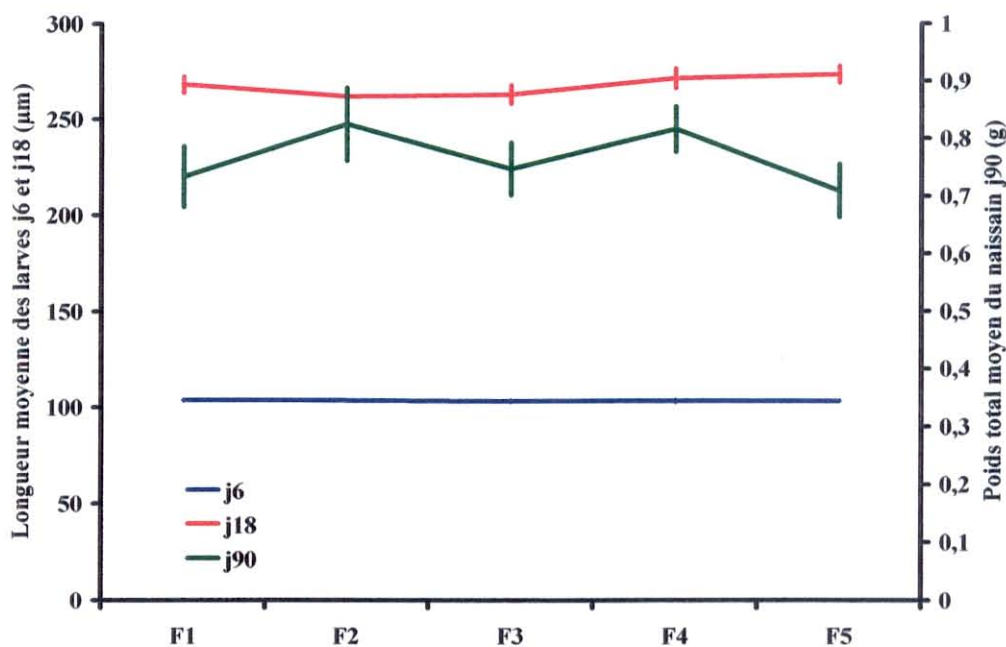
4.4. Evolution après métamorphose

Si la survie des larves varie selon leur père, cette variation est encore accentuée chez les juvéniles de 3 mois (j90). Les mâles qui contribuent le plus à ce stade ne sont pas les mêmes qu'en fin de phase larvaire. Le mâle M3, en particulier, voit le nombre de ses descendants survivants devenir supérieur à ceux des autres, alors qu'ils étaient relativement peu nombreux en phase

larvaire; dans le même temps, le nombre de descendants survivants du mâle M1 diminue fortement. Un phénomène similaire se produit chez les femelles: la contribution des femelles F3 et F4 augmente nettement (jusqu'à doubler pour la femelle F4), tandis que celle de la femelle F5 chute. Pour expliquer ces changements, deux hypothèses non exclusives peuvent être proposées:



A



B

figure 6-7: Longueur et poids total moyen des descendants par mâle (A) et par femelle (B). Aucun parent affecte significativement la taille des descendants.

- entre les deux prélèvements j18 et j90, la métamorphose des larves a eu lieu. Celle-ci correspond à une étape critique du développement (voir chapitre 1) mettant en jeu d'importantes modifications physiologiques. Les individus après métamorphose, par l'expression de gènes différents de ceux impliqués dans la vie larvaire, peuvent répondre différemment à une pression de sélection, par des taux de survie différents.
- d'importants taux de mortalité (jusqu'à 90% environ), dont la cause n'est pas déterminée, ont été observés sur le naissain. Il est possible que la réponse des juvéniles ait une base génétique et entraîne des différences entre les contributions, indépendamment des événements larvaires.

4.5. Croissance

Jusqu'à 3 mois, la croissance dans les différentes familles est la même, comme en attestent les différences de poids ou de longueur non significatives observées. Ce résultat montre que la survie à j90 est indépendante de la croissance. Il semble qu'à des stades un peu plus tardifs, (chapitre 2), la croissance et la mortalité soient liées.

Les différences de tailles et de poids observées entre les lots, particulièrement significatives à j6, sont probablement dues à des différences de densité dans les bacs d'élevage larvaire: le lot 3, qui présente la taille moyenne la plus élevée à j6, est aussi celui dont la densité est la plus faible (87 000 et 150 000 larves par bac respectivement pour le lot 3 et les autres lots). Les densités peuvent varier rapidement d'un jour à l'autre, en raison des mortalités importantes qui peuvent survenir au stade larvaire. Ces différences s'estompent avec le temps, ce qui peut s'expliquer par une vitesse de croissance plus élevée des larves de petite taille, rattrapant les larves les plus grosses (compensation pour la croissance larvaire). Un tel mécanisme de compensation pour la croissance existe chez les larves et a été mis en évidence et étudié à maintes reprises chez différentes espèces (Loosanoff *et al.*, 1951; Scheltema, 1962; Bayne, 1965; Walne, 1965; Helm et Millican, 1977; Perron, 1980; Pechenik, 1980). Cette observation peut également s'expliquer par l'existence de taux de mortalité différentiels associés à une interaction entre croissance et mortalité. Ce dernier point est également mis en évidence au stade adulte (chapitre 2).

A j6, on observe également une différence de taille très significative entre les croisements mélangés et séparés. Cette différence repose sans doute en partie sur les différences existant entre les réplicats, mais cela ne suffit pas à expliquer le haut niveau de significativité ($P < 0,0001$). Les larves provenant du croisement mélangé sont les plus grandes à ce stade, ce qui pourrait provenir d'une élimination dans ce croisement des individus les moins "aptés" (plus petits dès le départ, ou à

croissance plus faible) dès le stade zygotique.

Sur les 10 parents utilisés, tous ont contribué à la formation de la génération suivante, et aucune fécondation préférentielle n'a été mise à jour. Toutefois, malgré le soin pris pour équilibrer les apports gamétiques des mâles et des femelles au moment de la fécondation, les contributions parentales ne sont pas équilibrées, et cela dès le stade de la fécondation ou du zygote lorsque la compétition entre les parents existe, ce qui est effectivement le cas en milieu naturel et dans les pontes en masse en éclosure. La qualité des gamètes, qui peut être différente selon les parents au moment où les croisements sont réalisés, peut expliquer ce phénomène (Lannan, 1980a, 1980b, 1980c et 1980d). Cela peut provenir d'une maturation plus ou moins avancée des parents, certains étant prêts à pondre avant d'autres malgré un conditionnement en commun, ou d'autres facteurs induits par l'environnement. Cette différence constitue l'effet maternel (et éventuellement paternel).

D'autre part, ces contributions varient au cours du temps, avec notamment un changement crucial entre le phase larvaire et la phase juvénile (Lannan, 1980a).

Pendant la phase larvaire, l'influence des génotypes paternels et maternels diffère. Pour les mâles, c'est d'abord la compétition spermatique qui détermine leurs contributions, puis une survie différentielle de leurs descendants. Les contributions des femelles dérivent de l'effet maternel intervenant dès le stade zygotique, jusqu'à la métamorphose. Les taux de survie ont été estimés approximativement tout au long de l'élevage: 30 % des ovocytes atteignent après fécondation le stade larve D, 3 % le stade de larve pédivéligne et seulement 0,1 % le stade naissant âgé de 2 mois.

Finalement, certains individus participent plus que d'autres à la formation d'une nouvelle génération de juvéniles, puis d'adultes: un suivi dans le temps des descendants obtenus permettra de déterminer si les individus ayant les contributions parentales les plus importantes chez les juvéniles restent les mêmes jusqu'à ce que leurs descendants soient adultes, ou si de nouvelles modifications apparaissent. Pour les élevages, il est de toute façon plus intéressant de choisir comme reproducteurs ceux dont les descendants adultes sont les plus représentés, tout en prenant garde à ne pas engendrer de consanguinité qui ferait ressortir le fardeau génétique de l'espèce (Sheridan, 1997). Reste à vérifier que l'expérience est renouvelable et que, sous certaines conditions d'élevage, ce sont toujours les mêmes reproducteurs qui ont les contributions parentales les plus élevées: les trois réplicats pour chaque type de croisements ne constituent que des pseudo-réplicats, la division n'ayant été faite que trois heures après fécondation. L'analyse d'individus provenant du croisement mélangé à j18, puis après métamorphose, devrait permettre de confirmer les résultats obtenus. L'augmentation du nombre d'individus génotypés par croisement rendrait également les tests statistiques plus robustes.




Les déficits en hétérozygotes observés dans les populations de *Crassostrea gigas* peuvent provenir d'un recouvrement, au sein d'une même population apparente, de deux groupes d'individus ayant subi une sélection dans des conditions environnementales différentes, par recouvrement des générations ou recouvrement spatial: effet Whalund (Whalund, 1928). Auquel cas deux pools génétiques différents peuvent avoir été sélectionnés. Ce dernier cas est considéré comme partiellement responsable des déficits en hétérozygotes chez d'autres bivalves (Roughgarden *et al.*, 1988; David *et al.*, 1997; Borsa *et al.*, 1991).

Certains géniteurs montrent des distorsions de ségrégation significatives. Cependant ces distorsions ne varient pas entre j6 et j18 mais entre j6-j18 et j90 pour un individu (Femelle F4). Ces résultats montrent que la distorsion de ségrégation apparaît très tôt pour la plupart des géniteurs et se maintient dans le temps sauf pour la femelle F4 où l'écart entre la représentation des 2 allèles se creuse, par le biais de mortalité différentielle. L'allèle 24 est sous représenté à j90 par rapport à j6-j18, montrant que le taux de mortalité est associé positivement à cet allèle. Les différences entre les parents au niveau de la mortalité de la descendance pourraient expliquer les taux de survie différentiels mis en évidence au chapitre 2.

Aucune corrélation n'a été trouvée entre survie et croissance au sein d'une famille, ce qui n'exclue pas qu'elle apparaisse plus tard dans le développement. L'analyse des parents sur plusieurs locus microsatellites pourrait permettre d'estimer les taux d'hétérozygotie moyens de chaque famille, et de rechercher une éventuelle relation entre ces taux et la survie.

Des études sur la contribution de chaque parent à la formation de la génération suivante, peuvent permettre d'identifier les facteurs influant sur ces contributions. L'utilisation de marqueurs génomiques garantit de surcroît la répétabilité des expériences. C'est la première fois qu'une telle étude de recherche de parenté, avec attribution de tous les descendants analysés à une famille biparentale et suivi de la population au cours du temps, est menée chez des mollusques. Elle devrait permettre d'approfondir nos connaissances sur les événements du cycle de vie de l'huître creuse qui influent sur la structure génétique d'une population, suivant son environnement et l'âge des individus qui la composent. Par la suite, dans des conditions d'élevage données, on devrait pouvoir sélectionner rapidement les reproducteurs qui engendreront les individus les plus performants, tant au niveau de la survie que de la croissance.

Bilan - Synthèse

-  Existence de compétition spermatique dans un croisement contrôlé à 10 parents chez *Crassostrea gigas*.
-  Effet "femelle" et effet "mâle" très forts sur le nombre de descendants observés au stade larvaire 6 jours après fécondation.
-  Le taux de survie de la descendance dépend du parent.

CONCLUSION GENERALE

BILAN

L'ensemble des résultats présentés ici constitue une avancée dans les connaissances sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*, cultivée depuis plus d'un siècle mais dont beaucoup d'aspects de la croissance étaient finalement méconnus. Les données sur le déterminisme de la croissance chez les mollusques sont rares par rapport à la quantité de données existantes chez les vertébrés et en particulier chez les mammifères. Avant l'étude des facteurs intrinsèques impliqués dans la croissance (contrôle endocrinien, mécanismes de genèse des tissus ... etc.) il était indispensable de comprendre et d'étudier la croissance à l'échelle de l'individu et de la population.

Le premier niveau d'étude, exposé dans la partie II, concerne l'analyse de la croissance d'une population obtenue en éclosion et de l'effet des conditions environnementales (densités différentes, en éclosion ou en milieu naturel). Un résultat important à la fois au niveau fondamental qu'au niveau appliqué est que les performances de croissance aux stades larvaires et jeune naissain expliquent une part importante de la variabilité aux stades plus avancés (juvénile et adulte). Ce résultat montre que la croissance précoce chez *Crassostrea gigas* est d'une part fortement déterminée génétiquement comme cela a été mis en évidence dans la littérature au stade adulte (héritabilités fortes), et d'autre part probablement liée à des mécanismes internes. On observe ce type de résultat en condition contrôlée (chapitre 1 et 2 et expérience de Bouin du chapitre 3 à niveau de densité constant). Néanmoins, lorsque les conditions environnementales sont modifiées, comme par exemple la densité, l'effet sur la croissance est fort.

La physiologie mesure l'énergie acquise par la consommation de nourriture et dépensée par consommation d'oxygène. Les observations de croissance de la partie II peuvent être expliquées par la part d'énergie absorbée par rapport à l'énergie dépensée. La quantité d'énergie absorbée explique mieux les variations de croissance que la quantité d'énergie dépensée. En effet, la croissance est étroitement liée à la quantité de nourriture disponible qui est directement liée à la densité d'élevage (chapitre 3). Cependant, la croissance d'individus de même âge et de même origine génétique est très variable, même lorsque les conditions environnementales sont identiques pour tous. Le mode alimentaire de l'huître creuse (filtreur) et le mode de vie (benthique fixé) expliquent en grande partie la forte corrélation entre les performances de croissance et les conditions trophiques environnementales. Des micro-variations de ces dernières ainsi que des phénomènes plus complexes d'interactions trophiques

et spatiales entre les individus peuvent contribuer à la forte variabilité de croissance. Des mécanismes de régulation de la prise de nourriture existent mais agissent à partir d'une quantité de nourriture seuil en dessous duquel la consommation augmente avec la quantité de nourriture. La mise en place d'une nouvelle technique de mesure des bilans énergétiques a permis de montrer que les individus les plus performants absorbent plus mais dépensent également moins d'énergie que les individus les moins performants. L'analyse des relations allométriques de la consommation d'oxygène montre qu'une population d'écloserie se comporte différemment d'une population naturelle.

Dans une population issue d'un croisement contrôlé, les participations des parents sont très déséquilibrées malgré toutes les précautions prises pour assurer des quantités de gamètes égales à la fécondation. Aucune conséquence sur la croissance à 2 mois n'a pu être mise en évidence: chaque famille ayant des performances de croissance strictement identiques. Une étude de croissance sur une période de temps plus longue est actuellement en cours. Les parents participant plus à la génération suivante ne montrent aucun avantage de croissance par rapport aux autres.

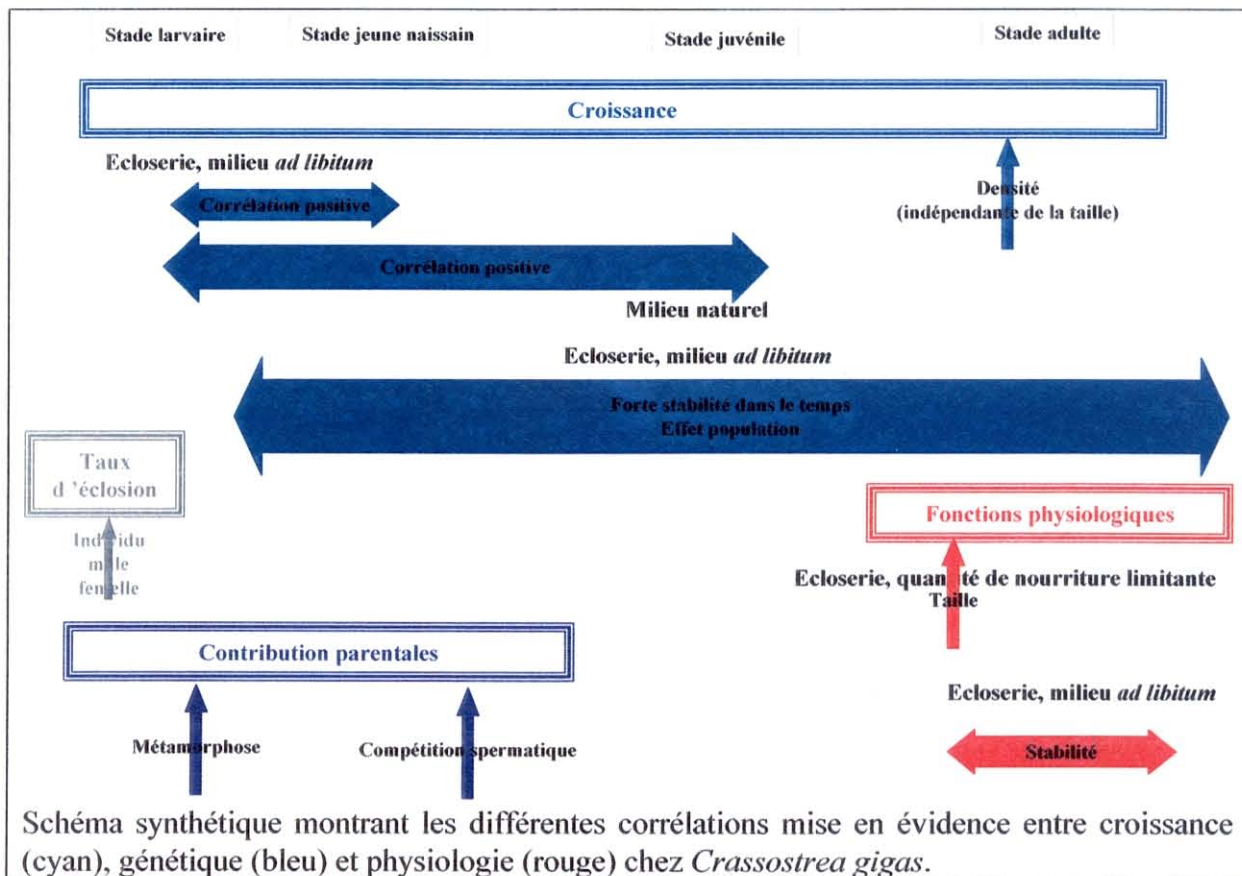
Par ailleurs, ces résultats démontrent l'existence de phénomènes de compétitions spermatiques et de mortalités différentielles. Les critères de sélection de "bons" géniteurs sont remis en cause. En effet, un individu peut contribuer fortement à la génération suivante au stade jeune puis perdre cet avantage à cause d'une mortalité plus forte. Les géniteurs réputés moins bons au départ (produisant peu de larves) peuvent s'avérer plus tard être de bons géniteurs car leurs descendants ont une meilleure survie.

A deux reprises, une relation étroite entre parenté et mortalité a été mise en évidence directement au chapitre 6 où les descendants ont des taux de survie qui diffèrent selon les parents et au chapitre 2 où le taux de survie dépend du type de croisement intra-population. Parallèlement, une relation entre croissance et mortalité a été révélée (voir diagramme ci-dessous).

Les performances physiologiques sont stables dans le temps mais la variabilité inter-individuelle très forte tend à masquer cette tendance. Les différences entre les individus sont d'ordre physiologique (absorption, consommation d'oxygène) et d'ordre comportemental (activité: FTA et RTA).

Le diagramme ci-dessous replace l'ensemble des résultats dans le cycle de vie de l'animal et par thème d'étude. Les résultats concernant la croissance sont représentés en vert, la physiologie en rouge et la génétique en bleu. Les questions posées au départ concernant les

premiers stades de la vie de l'huître trouvent maintenant des éléments de réponse. La croissance larvaire est corrélée positivement à la croissance post larvaire en éclosérie. Les performances de croissance aux stades juvénile et adulte sont remarquablement stables dans le temps. Une importante conséquence concerne la conservation du classement des individus: l'animal le plus performant pour la croissance de l'année n le sera toujours à l'année $n + 1$. Si cette conservation est remarquable en éclosérie, elle est moins nette dans le milieu naturel. Les fonctions physiologiques sont également stables dans le temps mais le comportement des individus diffère. Certains ont des paramètres physiologiques qui varient dans le temps, d'autres restent assez stables. L'activité des individus est une donnée très importante à prendre en compte dans les bilans énergétiques. La mise au point de dispositifs de mesures en continu permet la mesure du RTA et FTA et renseigne sur le comportement des animaux.



PERSPECTIVES

Les applications qui découlent de ces résultats sont de plusieurs ordres. Le choix des géniteurs pour une production en écloserie commerciale doit se faire de manière plus complète que par un simple examen microscopique de la qualité des gamètes femelles. La survie larvaire et post-larvaire sont des caractéristiques variables selon les géniteurs pouvant être plus importantes que la quantité de zygotes obtenus par géniteur.

Les techniques d'écloserie telles qu'elles sont pratiquées actuellement seraient valides pour les programmes d'amélioration génétique: la sélection massale peut être faite au stade précoce larvaire ou naissain de manière facile (simple tamisage) et avec des intensités fortes étant donné les effectifs importants à ces stades et la forte variabilité pour la croissance mise en évidence précocement (chapitre 1). La croissance est très stable en milieu contrôlé, et par conséquent, les pratiques consistant en l'élimination des individus à faible croissance se justifient. En effet, aucun mécanisme de compensation pour la croissance n'a pu être mis en évidence au stade juvénile et adulte chez *Crassostrea gigas* et donc les individus peu performants le resteront jusqu'au stade adulte. Ces questions de stabilité dans le temps des performances de croissance ont été très souvent débattues dans la littérature scientifique et en particulier du point de vue de l'application dans les programmes d'amélioration génétique. Il reste à valider ces résultats dans les conditions de production et étudier les performances des individus dans le milieu naturel.

Enfin, si la vitesse de croissance est un critère fiable comme base de sélection dans un programme d'amélioration génétique, les paramètres physiologiques peuvent également être considérés. Dans un contexte de surexploitation des ressources comme c'est le cas dans le bassin de Marenne-Oléron, la sélection sur l'indice AOR/OCR devrait aboutir à des individus tirant un meilleur parti des faibles ressources trophiques disponibles. En effet, cet indice ne dépend pas seulement de la quantité d'énergie absorbée mais surtout de la part d'énergie dépensée par rapport à l'énergie absorbée. Ainsi, un individu avec un indice élevé aura un impact sur le milieu réduit et la croissance reste compatible avec la rentabilité d'une exploitation ostréicole. L'amélioration du dispositif automatique de mesures des paramètres de filtration et de consommation d'oxygène peut contribuer à faciliter la réalisation d'un tel programme de sélection.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams MP, Walker RL and Heffernan PB. (1994). The effects of stocking density bag mesh size, and bottom sediment on the growth and survival of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, with emphasis on controlling oyster spat fouling. *J. Appl. Aquacult.* **4**(4): 25-44
- Akiyama Y, Nagasaki H, Nihei Z, Iwama T, Nomizu T, Utsunomiya J et Yuasa Y. (1996). Frequent microsatellite instabilities and analyses of the related genes in familial gastric cancer. *Japan. J. Cancer Res.* **87**: 595-601
- Alford RL, Hammond HA, Coto I et Caskey CT. (1994). Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **55**: 190-195
- Alzieu C. (1986). L'eau - Milieu de culture. In Lavoisier (ed.) *Aquaculture* **1**: 15-43
- Andrews JD (1979). Pelecypoda: Ostreidaea In Giese AC et Pearse JS (eds.) *Reproduction of Marine Invertebrates Volume V, Molluscs: pelecypods and lesser classes* 293-341
- Anonyme. (1987). Bilan énergétique chez les mollusques bivalves. Groupe de travail, La Tremblade. *Vie mar.* **7**: 1-68.
- Auster PJ et Stewart LL. (1982). Compensatory growth in the Bay Scallop *Argopecten irradians*. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.* **5**: 103-104
- Avisé JC. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New-York
- Bacon GS, MacDonald BA et Ward JE. (1998). Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles 1. Feeding activity and selection. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **219**(1-2): 105-125
- Baker SM et Mann R. (1994). Description of metamorphic phases in the oyster *Crassostrea virginica* and effects of hypoxia on metamorphosis. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **104**(1-2): 91-99
- Bamford DR et Gingles R. (1974). Absorption of sugars in the gill of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Bioch. Physiol.* **49A**: 637-646
- Barber BJ, Ford SE et Littlewood DTJ. (1991). A physiological comparison of resistant and susceptible oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) exposed to the endoparasite *Haplosporidium nelsoni* (Haskin, Stauber and Mackin). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **146**(1): 101-112
- Bardach JE, Ryther JH et McLarney WO. (1972). *Aquaculture - the farming and husbandry of freshwater and marine organisms*. Wiley Interscience, New York, 868 pp
- Bardouil M, Bohec M, Bougrier S, Lassus P et Truquet P. (1996). Feeding responses of *Crassostrea gigas* (Thunberg) to inclusion of different proportions of toxic dinoflagellates in their diet. *Oceanol. acta.* **19**: (2) 177-82
- Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayton D, Li L, Neibergs HL, Zhang N, Grosse WM, Weiss J, Creighton P, McCarthy F, Ron M, Teale AJ, Fries R, McGraw RA, Moore SS, Georges M, Soller M, Womack JE, and Hetzel DJS. (1994). A genetic linkage map of the human genome. *Nature Genetics* **6**: 227-235

- Batargias C, Kotoulas G, Magoulas A et Zouros E. (1997). Retrospective parentage identification in a mass spawning of gilthead sea bream, by means of microsatellite DNA. Preliminary results of genetic selection. In: Fifth Panhellenic Congress of Oceanography and Fisheries. Kavala, Greece, 15-18 April 1997.
- Baud JP, Gérard A et Naciri-Graven Y. (1997). Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae* – resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. *Mar. Biol.* **130**: 71-79
- Bayne BL. (1965). Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia* **2**: 1-47
- Bayne BL. (1983). Physiological ecology of marine molluscan larvae. In: The mollusca vol. 3 Development. Saleuddin ASM et Wilbur KM (eds) Academic Press New York
- Bayne BL et Newell RIE. (1983). Physiological energetics of marine molluscs. In The mollusca vol. 4 Physiology Part 1, Saleuddin ASM et Wilbur KM (eds) 407-515, Academic Press New York
- Bayne BL, Salked PN et Worrall CM. (1983). Reproductive effort and value in different populations of the marine mussel, *Mytilus edulis* L. *Oecologia* **59**: 18-26
- Bayne BL, Brown DA, Burns K, Dixon DR, Ivanovici A, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN, Stebbing ARD et Widdows J. (1985). The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Scientific, New-York, 384 pp
- Beattie JH, Chew KK et Hershberger WK. (1980). Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* **70**: 184-189
- Beattie JH, Perdue J, Hershberger W et Chew K. (1987). Effects of inbreeding on growth in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Shellfish Res.* **6**: 25-28
- Beaumont AR, Beveridge CM et Budd MD. (1983). Selection and heterozygosity within single families of the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Aquaculture* **4**(3): 151-161
- Beaumont AR. (1991). Genetic studies of laboratory reared mussels, *Mytilus edulis*: heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biol.J.Lin.Soc.* **44**(3): 273-285
- Beckmann JS et Soller M. (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of Eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology* **8**: 930-932
- Beiras R, Pérez Comacho A et Albentosa M. (1993). Influence of food concentration on energy balance and growth performance of *Venerupis pullastra* seed reared in an open-flow system. *Aquaculture* **116**: 353-365
- Beukema JJ et Cadée GC. (1986). Zoobenthos response to eutrophication of the Dutch Wadden sea. *Ophelia* **26**: 55-64
- Beverton RJH et Hold SJ. (1959). A review of the lifespans and mortality rates of fish in nature and their relation to growth and other physiological characteristics. In: Wolstenholmen GEW.

- O'Connor M (eds): Ciba foundation colloquium on ageing: the lifespan of animals. London: Churchill 142-177
- Bierne N, Launay S, Naciri-Graven Y et Bonhomme F.(1998). Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* Larvae. *Genetics* **148**: 1893-1906
- Blazka P, Volf M et Cepala M. (1960). A new type of respirometer for the determination of the metabolism of fish in an active state. *Physiologia bohemoslov* **9**: 533-544
- Borsa P, Zainuri M et Delay B. (1991). Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity* **66**: 1-8
- Borsa P, Jousselin Y et Delay B. (1992) Relationship between allozymic heterozygosity, body size, and survival to natural anoxic stress in the palourde *Ruditapes decussatus* L. (Bivalvia: Veneridae). *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **155**(2): 169-181
- Boudry P, Collet B, Kotoulas G, Magoulas A, Hervouet V, Bonhomme F et Gérard A. (1998). The use of microsatellite markers for parentage analysis in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). ICES C.M. 1998/K:7 (Annexe 3)
- Bougrier S, Hawkins AJS et Heral M. (1997a). Preingestive selection of different microalgal mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analysed by flow cytometry. *Aquaculture* **150**(1-2): 123-134
- Bougrier S, Collet B, Geairon P, Geffard O, Héral M et Deslous-Paoli JM. (1997b) Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **219**(1-2): 205-216 (Annexe 1)
- Bougrier S, Geairon P, Deslous-Paoli JM, Bacher C et Jonquière G. (1995). Allometric relationships and temperature effects on clearance and oxygen consumption rates in *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* **134**(1-2): 143-154
- Brand AR et Roberts D. (1973). The cardiac responses of the scallop *Pecten maximus* (L.) to respiratory stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **13**: 29-43
- Brey T et Gage JD. (1997). Interaction of growth and mortality in benthic invertebrate populations: Empirical evidence for a mortality-growth continuum. *Arch. Fish. Mar. Res.* **45**: 45-59
- Bretshneider LH. (1948). Insemination in *Lymnaea stagnalis* L. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* **51**: 358-362
- Brett JR. (1979). Environmental factors and growth. In: WS Hoar, DJ Randall et JR Brett (eds.) *Fish Physiology VII Bioenergetics and growth* Academic Press New York 559-675
- Britten RJ et Koehn D. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science* **161**: 529-540
- Brock V. (1980). Notes on the relations between density, settling and growth of two sympatric cockles, *Cardium edule* (L.) and *C. Glaucum* (Bruguière). *Ophelia* **1**: 241-248
- Brook JD, McCurrach M, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP et Hudson T. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family

- member. *Cell* **68**: 799-808
- Brown JR. (1988). Multivariate analyses of the role of environmental factors in seasonal and site-related variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **45**: 225-236
- Burczyk J, Adams WT et Jarbas YS. (1996). Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. *Heredity* **77**(3): 251-260
- Burke T. (1989). DNA fingerprinting methods for the study of mating success. *Tree* **4**(5): 139-144
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC et Sutherland GR. (1993). Incidence and origine of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 922-927
- Camacho AP, Villalba A, Beiras R et Labarta U. (1997). Absorption efficiency and condition of cultured mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis* Linnareus) of Galicia (NW Spain) infected by parasites *Marteilia refringens* Grizel et al. and *Mytilicola intestinalis* Steuer. *J. Shellfish Res.* **16**: 77-82.
- Cantatore P, Roberti M, Morisco P, Rainaldi G, Gadaleta M et Saccone C. (1987). A novel gene order in *Paracentrotus lividus* mitochondrial genomes. *Gene* **53**: 41-54
- Chakraborty R, De Andrade M, Daiger SP et Budowle B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann. Hum. Genet.* **56**: 45-57
- Chia FS. (1978). Perspectives: settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. In: FS Chia et ME Rice (eds): Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. Elsevier/North-Holland, New-York 283-285
- Choi KS, Wilson EA, Lewis, DH, Powell EN et Ray SM. (1989). The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: Quantification of the thioglycollate method. *J. Shellfish Res.* **8**(1): 125-131
- Clausen I et Riisgard HU. (1996). Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: No evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **141**(1-3): 37-45
- Cochard JC et Devauchelle N. (1993). Spawning, fecundity and larval survival and growth in relation to controlled conditioning in native and transplanted populations of *Pecten maximus* (L.): evidence for the existence of separate stocks *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **169**: 41-56
- Colbourne JK, Neff BD, Wright JM et Gross MR. (1996). DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Can. J. Fish. Aqu. Sci.* **53**: 342-349
- Coleman N. (1986). A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing the species into Victoria, Australia. Technical report n° 56, Marine Resources Management Branch, Fisheries and Wildlife Service, Department of Conservation, Forests and Lands, Queescliff, Victoria, Australia, 39 p.

- Comps M, Bonami JR, Vago C et Campillo A. (1976). Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C. R. Acad. Sci., Paris, Sciences de la vie*, **282**: 1991-1993
- Conover WJ. (1980). Practical nonparametric statistics, second edition, New York, John Wiley and sons.
- Côté J, Himmelman JH, Claereboudt M et Bonardelli JC. (1993). Influence of density and depth on the growth of juvenile sea scallops (*Placopecten magellanicus*) in suspended culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 1857-1869
- Coughlan J. (1969). The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar. Biol.* **2**: 356-358
- Crabb ED. (1927). The fertilisation process in the snail, *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* **53**: 67-108
- Crawford AM, Montgomery GW, Pierson CA, Brown T, Dodds KG, Sunden SLF, Henry HM, Ede AJ, Swarbrick PA, Berryman T, Penty JM et Hill DF. (1994). Sheep linkage mapping: nineteen linkage groups derived from the analysis of paternal half-sibs families. *Genetics* **137**: 573-579
- Crawford AM, Buchanan FC et Swarbrick PA. (1991). The use of dinucleotide repeats or microsatellites as genetic markers in domestic animals. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* **51**: 79-83
- Crenshaw JW, Heffernan PB et Walker RL. (1996). Effects of growout density on heritability of growth rate in the northern quahog, *Mercentaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.* **15**(2): 341-344
- Crisp DJ. (1974). Factors influencing the settlement of marine invertebrate larvae. In: PT Grant, Mackie AM (eds): Chemoreception in marine organisms, Academic Press, New-York 177-265
- Dallas J. (1992). Estimation of microsatellite mutation rate in recombinant inbred strains of mouse. *Mamm. Genome* **2**: 452-456
- David P et Jarne P. (1997). Context-dependent survival differences among electrophoretic genotypes in natural populations of marine bivalve *Spisula ovalis*. *Genetics* **146**: 335-344
- Defossez JM, Daguzan J et Pouliceck M. (1997). A new method for recording the *in situ* pumping activity of infaunal bivalves. *J. Molluscan Stud.* **63**(1): 9-17
- Defossez JM et Hawkins AJS. (1997). Selective feeding in shellfish: Size-dependent rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. *Mar. Biol.* **129**(1): 139-147
- De Larambergue M. (1939). Etude de l'autofécondation chez les gastéropodes pulmonés. Recherche sur l'aphallie et la fécondation chez *Bulinus (Isidora) contortus* Michaud. *Bull. Biol. Fr. Belg.* **73**: 21-231
- De Montaudouin X et Bachelet G. (1996). Experimental evidence of complex interaction between

- biotic and abiotic factors in the dynamics of intertidal populations of the bivalve *Cerastoderma edule*. *Oceanol. Acta* **19**: 449-463
- Deslous-Paoli JM et Héral M. (1984) Transferts énergétiques entre l'huître *Crassostrea gigas* de 1 an et la nourriture potentielle disponible dans l'eau d'un bassin ostréicole. *Haliotis*, **14**: 79-90
- Desrosiers RR, Gérard A, Peignon J-M, Naciri Y, Dufresne L, Morasse J, Ledu C, Phelipot P, Guerrier P et Dubé F. (1993). A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **170**: 29-43
- Diehl WJ, Gaffnay PM et Koehn RK. (1986). Physiological and genetic aspects of growth in the mussel *Mytilus edulis*. 1. Oxygen consumption, growth and weight loss. *Physiol. Zool.* **59**: 201-211
- Dietzman DE et Ford SE. (1991). Physiological differentiation in eastern oysters. *J. Shellfish Res.* **10**(1): 302
- Dral ADG. (1968). On the feeding of mussels (*Mytilus edulis* L.) in concentrated food suspensions. *Neth. J. Zool.* **18**: 440-441
- Donkin P, Widdows J, Evans SV, Staff FJ et Yan T. (1997). Effect of Neurotoxic Pesticides on the Feeding Rate of Marine Mussels (*Mytilus edulis*). *Pestic. Sci.* **49**: 196-209
- Doyle RW et Talbot AJ. (1986). Artificial selection on growth and correlated selection on competitive behaviour in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**: 1059-1064
- Dubé FL, Schmidt T, Johnson CH et Epel D. (1985). The hierarchy of requirements for an elevated intracellular pH during early development of sea urchin embryos. *Cell* **40**: 657-666
- Eapen JT. (1997). An electronic device to record behavioural activity of bivalves. *Indian J. Exp. Biol.* **35**(6): 663-664
- Ebenman B. (1992). Evolution in organisms that change their niche during the life cycle. *Am. Nat.* **139**: 990-1021
- Einot I et Gabriel KR. (1975). A study of the powers of several methods of multiple comparisons. *J. Am. Stat. Assoc.* **70**: 351
- Eldridge PJ et Eversole AG. (1979). Compensatory growth and mortality of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Veliger* **24**: 276-278
- Epifanio CE. (1979). Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of 2 or more species of algae in diets fed to the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture* **18**: 1-12
- Eriksen NT et Iversen JLL. (1997). On-line determination of respiration rates of aquatic organisms in a mono-phase oxystat at steady-state dissolved oxygen tensions. *Mar. Biol.* **128**: 181-189
- Estoup A, Lagiardère CR, Perrot E et Chourrout D. (1996). Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**(4): 295-298

- Everett RA. (1994). Macroalgae in marine soft-sediment communities: effects on benthic faunal assemblages. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **175**: 253-274
- Fairbrother JE et Beaumont AR. (1993). Heterozygote deficiencies in a cohort of newly settled *Mytilus edulis* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **73**: 647-653
- Famme P et Kofoed LH. (1980). The ventilatory current and ctenidial function related to the oxygen uptake in declining oxygen tension by the mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **66A**: 161-171
- Farrar N, Kiyosawa H, Hughes J, Welker D et Williams K. (1994). Nucleotide sequence of Ddp1, a high copy number nuclear plasmid of *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **31**: 184-195
- Ferguson A, Taggart JB, Prodohl PA, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P et Hynes RA. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. Fish Bio.* **47**(Suppl. A): 103-126
- Fisher NS, Winstead JT, Oliver LM, Edmiston HL et O.Bailey G. (1996). Physiologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. *J. Shellfish Res.* **15**: 543-553
- Foltz D et Zouros E. (1984). Enzyme heterozygosity in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) in relation to age and size. *Mar. Biol. Lett.* **5**(5): 255-263
- Foster-Smith RL. (1975). The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis* (L.), *Cerastoderma edule* (L.) and *venerupis pullastra* (Montagu). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **17**: 1-22
- Foster-Smith RL. (1976). Some mechanisms for the control of pumping activity in bivalves. *Mar. Behav. Physiol.* **4**: 41-60
- Fréchette M et Lefaiivre D. (1990). Discriminating between food and space limitation in benthic suspension feeders using self-thinning relationships. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **65**: 15-23
- Fréchette M et Lefaiivre D. (1995). On self-thinning in animals. *Oikos* **73**: 425-428
- Fredholm M et Winterø AM. (1995). Variation of short tandem repeats within and between species belonging to *Canidae* family. *Mamm. Genome* **6**: 11-18
- Fredholm M et Winterø AK. (1996). Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Animals Genetics* **27**: 19-23
- Fries R. (1993). Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. *Anim. Genet.* **24**: 111-116
- Fu YH, Kuhl DPA, Pizutti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk A, Holden J, Fenwick RG et Warren ST. (1991). Variation of CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**: 1047-1058
- Fu Y, Pizzuti R, Fenwick RG, and et al... (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**: 1256-1258
- Fujio Y, Nakamura Y et Sugita M. (1979). Selective advantage of heterozygotes at catalase locus in

- the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Japan J. Genet. **54**: 359-366
- Fujio Y. (1982). A correlation of Heterozygosity with Growth Rate in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J.Agr.Res.* **33**(2): 66-75
- Gaffney PM et Scott TM. (1984). Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery populations of bivalves. *Aquaculture* **42**(3-4): 289-302
- Galtstoft PS. (1964). The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull. U.S.A.* Fish and Wildlife Services (Government Printing Office, Washington, D.C.) **64**: 1-480
- Garcia de Leon FG, Dallas JF, Chatain B, Canonne M., Versini JJ et Bonhomme F. (1995). Development and use of microsatellites in sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)(Perciformes: Serranidae). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **4**: 62-68
- Garcia de Leon FG, Canonne M, Quillet E, Bonhomme F et Chatain B. (1998). The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **159**(3-4): 303-316
- Garton DW. (1984). Relationship between multiple locus heterozygosity and physiological energetics of growth in the estuarine gastropod *Thais heamastoma*. *Physiol. Zool.* **57**: 530-543
- Garton DW, Koehn RK et Scott TM. (1984). Multiple-locus heterozygosity and the physiological energetics of growth in the coot clam, *Mulina lateralis*, from a natural population. *Genetics* **108**(2): 445-455
- Gérard A, Naciri Y, Peignon J-M, Ledu C et Phélipot P. (1994). Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture and Fisheries Management* **25**(7): 709-720
- Gerdes D. (1983a). The Pacific oyster *Crassostrea gigas* . Part 1. Feeding behaviour of larvae and adults *Aquaculture* **31**(2-4): 195-219
- Gerdes D. (1983b). The Pacific oyster *Crassostrea gigas* . Part 2. Oxygen consumption of larvae and adults. *Aquaculture* **31**(2-4): 221-231
- Goodfellow PN. (1993). Microsatellites and the new genetic maps. *Curr. Biol.* **3**: 149-151
- Goulletquer P et Héral M. (1997). Marine molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. *U.S. Dep. Commer., NMFS* **129**: 137-164
- Goyard E. (1994). Réseau de suivi de croissance de l'huître creuse sur les côtes françaises. Rapport interne de la DRV de l'IFREMER. 62 p
- Grasse P. (1960). Traité de Zoologie. Tome V. Masson et Cie, Paris, 2219 p
- Grizel H. (1996). Some examples of the introduction and transfer of mollusc populations. *Rev. Sc. Tech. Office Int. Epizooties* **15**: 401-408
- Grizel H et Héral M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. int. Explor. Mer* **47**: 399-403

- Guo X et Allen SK. (1997). Sex and meiosis in autotetraploid pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Genome* **40**: 397-405
- Hadley NH et Manzi JJ. (1984). Growth of seed clams, *Mercenaria mercenaria* at various densities in a commercial scale nursery system. *Aquaculture* **36**: 369-378
- Hadley NH, Dillon RT et Manzi JJ. (1991). Realised heritability of growth rate in the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture* **93**: 109-119
- Haley LE et Newkirk GF. (1978). Selecting oysters for faster growth. *Proc. 8th Annu. Meet. World Mariculture Soc.* **8**: 557-566
- Hamada H et Kakunaga T. (1982). Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* **298**: 396-398
- Hamada H, Petrino MG et Kakunaga T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6465-6469
- Hamburger K, Mohlenberg F, Randlov A, Riisgard UH. (1983). Size, oxygen consumption and growth in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **75**: 303-306
- Hampton J. (1991). Estimation of southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* growth parameters from tagging data, using von Bertalanffy models incorporating individual variation. *fish. Bull.* **89**(4): 577-590
- Harris AS, Bieger S, Doyle RW et Wright JM. (1991). DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. *Aquaculture* **92**(2-3): 157-163
- Hawkins AJS. (1995). Effects of temperature change on ectotherm metabolism and evolution: Metabolic and physiological interrelations underlying the superiority of multi-locus heterozygotes in heterogeneous environments. *J. therm. Biol.* **20**: 23-33
- Hawkins AJS et Day AJ. (1997). The metabolic basis of genetic differences in growth efficiency among marine animals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **203**: 93-115
- Hawkins AJS, Bayne BL, Bougrier S, Héral M, Iglesias JIP, Navarro E, Smith RFM et Urrutia MB. (1998). Some general relationships in comparing the feeding physiology of suspension-feeding bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **219**(1-2): 87-103
- Hawkins AJS, Smith RFM, Bayne BL et Héral M. (1996). Novel observations underlying the fast growth of suspension-feeding shellfish in turbid environments: *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **131**(1-3): 179-190
- Hawkins AJS, Day AJ, Gérard A, Naciri Y, Ledu C, Bayne BL et Héral M. (1994). A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **184**: 21-40
- Hawkins AJS, Bayne BL, Day AJ, Rusin J et Worall CM. (1989). Genotype-dependent interrelations between energy metabolism, protein metabolism and fitness. *In* Reproduction,

- genetics and distributions of marine organisms, 23rd European Marine Biology Symposium, edited by JS Ryland et PA Tyler, Olson and Olson, Fredensborg, 283-292
- Hawkins AJS, Bayne BL et Day AJ. (1986). Protein turnover, physiological energetics and heterozygosity in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the basis of variable age-specific growth. *Proc. R. Soc., London*, **229**: 161-176
- Hearne CM, Ghosh S et Todd JA. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics* **8**: 288-294
- Hedgecock D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In Beaumont AR (ed.). Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman and Hall, London. pp. 122-134.
- Hedgecock D, McGoldrick DJ et Bayne BL. (1995). Hybrid vigor in Pacific oysters: an experimental approach using crosses among inbred lines. *Aquaculture* **137**: 285-298
- Heffernan PB, Walker RL et Crenshaw JWJ. (1991). Negative larval response to selection for increased growth rate in northern quahogs *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). *J. Shellfish Res.* **10**: 199-202
- Heffernan PB, Walker RL et Crenshaw JWJ. (1992). Embryonic and larval responses to selection for increased rate of growth in adult bay scallops *Argopecten irradians concentricus* (Say, 1822). *J. Shellfish Res.* **11**: 21-25
- Helm MM. (1977). Mixed algal feeding of *Ostrea edulis* larvae with *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **57**: 1019-1031
- Helm MM et Millican PF. (1977). Experiment in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* **11**: 1-12
- Héral M et Deslous-paoli JM. (1983). Energetic value of the tissue of the oyster *Crassostrea gigas* estimated by microcalorimetric measures and by biochemical evaluation. *Oceanol. Acta* **6**(2): 193-199
- Héral M, Deslous-paoli JM, Razet D et Prou J. (1984) Essais de mise en évidence *in situ* de paramètres biotiques et abiotiques de l'eau et de l'interface eau-sédiment intervenant dans la production de l'huître *C.gigas*. *Oceanis* **10**(4): 465-475
- Héral M, Bacher C, Feuillet GM et Sauriau PS. (1995). Benthic effects of biodeposition of oyster culture in mesotidal estuarine conditions. ICES C.M. 1995/R:1
- Héral M (1993). Why carrying capacity models are useful tools for management of bivalve molluscs culture ? In RF Dame (ed.) *Bivalve Filter Feeders in Estuarine Coastal Ecosystem Processes*. NATO ASI Series, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **G33**: 455-477
- Herbinger CM, Doyle RW, Pitman ER, Paquet D, Mesa KA, Morris DB, Wright JM et Cook D. (1995). DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* **137**(1-4): 245-256
- Herbinger CM, Doyle RW, Taggart CT, Lochmann SE, Brooker AL, Wright JM et Cook D. (1996).

- Family relationships and effective population size in a natural cohort of cod larvae. *Can. J. Fish Aqua. Sc.* **54** (Suppl. 1): 11-18
- Heyen DW, Beever JE, Da Y, Evert RE, Green C, Bates SRE, Ziegle JS et Lewin HA. (1997). Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semi-automated parentage testing. *Animals Genetics* **28**: 21-27.
- Higgins PJ. (1980). Effect of food availability on the valve movements and feeding behavior of juvenile *Crassostrea virginica* (Gmelin). I. Valve movements and periodic activity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **45**: 229-244
- Hilbish TJ, Winn EP et Rawson PD. (1993). Genetic variation and covariation during larval and juvenile growth in *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Biol.* **115**: 97-104
- His E. (1972). Premiers éléments de comparaisons entre l'huître portugaise et l'huître japonaise. *Sci. Pêche Bull. Inst. Pêches Marit.* **219**: 1-9
- Hollander M et Wolfe DA. (1973). Nonparametric Statistical methods, New-York, Wiley
- Holley ME et Foltz DW. (1987). Effects of multiple-locus heterozygosity and salinity on clearance rate in brackish water clam, *Rangia cuneata* (Sowerby). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **111**: 121-131
- Holliday JE, Maguire GB et Nell JA. (1991). Optimum stocking density for nursery culture of Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). *Aquaculture* **96**: 7-16
- Holm-Hansen O, Lorenzen CJ, Holmes RW et Strickland JDH. (1965). Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Conc. Int. Explor. Mer* **30**: 3-15
- Horstmann HJ. (1955). Untersuchungen zur physiologie der begattung und befruchtung der Schlammschnecke *Lymnaea stagnalis* L. *Z. Morphl. Oekol. Tiere* **44**: 222-268
- Hospital F, Chevalet C et Mulsant P. (1992). Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics* **132**: 1199-1210
- Houlden BA, England P et Sherwin WB. (1996). Paternity exclusion in koalas using hypervariable microsatellites. *J. Heredity* **87**: 149-152
- Hull SC. (1987). Macroalgal mats and species abundance: a field experiment. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* **25**: 519-532
- Huvet A. (1997). Différenciation génétique de deux huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*: apport des marqueurs microsatellites. Rapport de DEA Biologie des Populations, Génétique et Eco-éthologie.
- Iglesias JIP, Camacho AP, Navarro E, Labarta U, Beiras R, Hawkins AJS et Widdows J. (1996). Microgeographic variability in feeding, absorption, and condition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK.): a transplant experiment. *J. Shellfish Res.* **15**: 673-680
- Iglesias JIP, Urrutia MB, Navarro E, Alvarez-Jorna P, Larretxea X, Bougrier S et Héral M. (1996). Variability of feeding processes in the cockle *Cerastoderma edule* (L.) in response to changes in seston concentration and composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **197**(1): 121-143

- Innes DJ et Haley LE. (1977). Genetic aspects of larval growth under reduced salinity in *Mytilus edulis*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, **153**: 312-321
- Jarayabhand J et Newkirk GF. (1989). Effects of competition on growth of the European oyster *Ostrea edulis* Linnaeus 1750. *J. Shellfish Res.* **8**: 359-365
- Jarayabhand P et Thavornyutikarn M. (1995). Realized heritability estimation on growth rate of oyster, *Saccostrea cucullata* Born, 1778. *Aquaculture* **138**: (1-4) 111-118
- Jarne P, Viard F, Delay B et Cuny G. (1993). Variable microsatellites in the highly selfing snail *Bulinus truncatus* (Basommatophora: Planorbidae). *Molec. Ecol.* **6**: 527-528
- Jeffreys AJ, Wilson V et Thein SL. (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* **314**: 67-73
- Jensen KT. (1992). Dynamics and growth of the cockle, *Cerastoderma edule*, on an intertidal mud-flat in the Danish Wadden sea: effect of submersion time and density. *Neth. J. Sea Res.* **28**: 335-345
- Jensen KT. (1993). Density dependent growth in the cockle (*Cerastoderma edule*): evidence from interannual comparisons. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **73**: 333-342
- Jokela J et Mutikainen P. (1995). Phenotypic plasticity and priority rules for energy allocation in a freshwater clam: a field experiment. *Oecologia*. **104**: 122-132.
- Jones AG et Avise JC. (1997). Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnatus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Mol. Ecology* **6**: 203-213
- Jones HD, Richards OG et Southern TA. (1992). Gill dimensions, water pumping rate and body size in the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **155**: 213-237
- Jørgensen CB. (1990). Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology. Fredensborg: Olsen et Olsen
- Kamermans P. (1993). Food limitation in cockles (*Cerastoderma edule* (L.)): influences of location on tidal flat and nearby presence of mussel beds. *Neth. J. Sea Res.* **31**: 71-81
- Kellog KA, Markert JA, Stauffer JR et Kocher TD. (1995). Microsatellite variation demonstrate multiple paternity in lekking cichlid fish from lake Malawi, Africa. *Proceedings of the Royal Society, London* **260B**: 79-84
- Kincaid HL. (1976). Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* **33**: 2420-2426
- King D. (1994). Triple repeat DNA as highly mutable regulatory mechanism. *Science* **263**: 595-596
- Kinghorn BP. (1983). A review of quantitative genetics in fish breeding. *Aquaculture* **31**: 283-304
- Kjørboe T et Møhlenberg F. (1981). Particle Selection in Suspension-Feeding Bivalves. *Mar.Ecol.(Prog.Ser.)* **5**(3): 291-296

- Kjørboe T, Møhlenberg F et Nøhr O. (1980). Feeding, particle selection and carbon absorption in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **61**: 283-288
- Kirby-Smith WW. (1972). Growth of the bay scallop: the influence of experimental water currents. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **8**: 7-18
- Kleibert M. (1961) "The fire of life: an introduction to animal energetics." Wiley (Interscience), New-York/London.
- Koehn RK et Gaffney PM. (1984). Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **82**(1): 1-7
- Koehn RK et Shumway SE (1982). A genetic/physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Mar. Biol. Lett.* **3**: 35-42
- Koorey DJ, Bishop GA et McCaughan GW. (1993). Allele non-amplification: a source of confusion in linkage studies employing microsatellite polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.* **2**(3): 289-291
- Kuang S, Fang J, Sun H et Li F. (1997). Seasonal studies of filtration rate and absorption efficiency in the scallop *Chlamys farreri*. *J. Shellfish Res.* **16**(1): 39-45
- Labarta U, Fernandez-Reiriz MJ et Babarro JMF. (1997). Differences in physiological energetics between intertidal and raft cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. (Prog. Ser.)* **152**: 167-173
- Laing I, Utting SD et Kilada RWS. (1987). Interactive effect of diet and temperature on the growth of juvenile clams. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **113**: 23-38
- Lannan JE. (1972). Estimating heritability and predicting response to selection for the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Proc. Natl. Shellfish. Assn.* **62**: 62-66
- Lannan JE. (1980a). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. I. Genetic and environmental variation in survival in the larval rearing system. *Aquaculture* **21**: 323-336
- Lannan JE. (1980b). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstocks conditioning to maximise larval survival. *Aquaculture* **21**: 337-345
- Lannan JE. (1980c). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. III. Selective breeding for improved larval survival. *Aquaculture* **21**: 347-351
- Lannan JE. (1980d). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. IV. Inbreeding and larval survival. *Aquaculture* **21**: 353-356
- 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. Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris
- Lei J, Payne BS et Wang SY. (1996). Filtration dynamics of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**(1): 29-37

- Le Pennec M. (1978). Génèse de la coquille larvaire et post-larvaire chez divers bivalves marins. Thèse d'état, Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Levinson G et Gutman GA. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 203-221
- Li G et 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
- Litt M et Luty JA. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Human Genet.* **44**: 397-401
- Longwell AC et Stiles SS. (1973). Oyster genetics and the probable future role of genetics in aquaculture. *Malacol. Rev.* **6**: 151-177
- Loosanoff VL et Nomejko CA. (1946). Feeding of oyster in relation to tidal stages and to periods of light and darkness. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* **90**: 244-264
- Loosanoff VL, Miller WS et Smith PB. (1951). Growth and setting of larvae of *Venus mercenaria* in relation to temperature. *J. Mar. Res.* **10**: 59-81
- Losee E. (1978). Influence of Heredity on larval and spat growth in *Crassostrea virginica*. In Proceedings of the 9th annual meeting world mariculture society (Avault, JW eds) 101-107
- Losee E. (1979). Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture* **16**: 123-126
- Loughna PT et Goldspink G. (1985). Muscle protein synthesis rates during temperature acclimation in a eurythermal (*Cyprinus carpio*) and a stenothermal (*Salmo gairdneri*) species of teleost. *J. Exp. Biol.* **118**: 267-276
- McDonald BA et Thompson RJ. (1985). Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. I Growth rates of shell and somatic tissue. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **25**: 279-294
- McDonald BA et Thompson RJ. (1985). Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II Reproductive output and total production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **25**: 295-304
- McGoldrick DJ. (1997). An experimental investigation of the genetic basis of heterosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). PhD Dissertation, Genetics. University of California, Davies
- McGoldrick DJ et Hedgecock D. (1996). Microsatellite development in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Shellfish Res.* (Abstract) **15**: 512
- Magoulas A. (1998). Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA. Proceeding of the Seminar Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM). Zaragossa, Spain, April 28-30, 1997. pp 153-168.

- Magoulas A, Gjetvaj B, Terzoglou V et Zouros E. Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics*, in press.
- Malecha SR. (1977). Genetics and selective breeding of *Macrobrachium rosenbergii*. In JA Hanson et HL Goodwin (eds.), *Shrimp and prawn farming in the western hemisphere*, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., Stroudsburg, PA, 328-355
- Malecha SR. (1983). Crustacean genetics and breeding: An overview. *Aquaculture* **33**: 395-413
- Malinowski SM. (1987). Increasing small-scale shellfish farming efficiency: 2. The potential of isolating slow growing individuals and increasing efficiency through culling. Final Report submitted to The New York State Urban Development Corporation, 13-31
- Malinowski SM. (1988). Variable growth rates of seed clam *Mercenaria mercenaria* (Linne) in an upflow nursery system and the economics of culling slow growing animals. *J.Shellfish Res.* **7**(3): 359-365
- Mallet AL et Haley LE. (1983). Growth rate and survival in pure population matings and crosses of the oyster *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40**: 948-954
- Mallet AL et Haley LE. (1984). General and specific combining abilities of larval and juvenile growth and viability estimated from natural oyster populations. *Mar. Biol.* **81**: 53-59
- Mallet AL et Carver E. (1995). Comparative growth and survival patterns of *Mytilus trossulus* and *Mytilus edulis* in Atlantic Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**: 1873-1880
- Mallet AL, Freeman FR et Dickie LM. (1986). The Genetics of production characters in the blue Mussel *Mytilus edulis*. I. A preliminary analysis. *Aquaculture* **57**: 133-140
- Mann R et Taylor RE jr. (1977). Long term studies of the growth of the Japanese oyster, European oyster and Manila clam in a waste recycling aquaculture system. *Tech. Rep. Woods Hole Ocean. Inst.* 10p
- Marklund S, Ellegreen H, Erikson S, Sandberg K. et Anderson L. (1994). Parentage testing and linking analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellite. *Anim. Genet.* **25**: 19-23
- Marteil L. (1976). La conchyliculture française: deuxième partie: biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.* **40**(2): 149-346
- Matsuyama Y, Uchida T et Honjo T. (1997). Toxic effects of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on clearance rate of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **146**(1-3): 73-80
- Medcof JC (1961). Oyster farming in the Maritimes. *Fish. Res. Board Can. Bull.* **131** 158 p
- Menzel RW et Hopkins SH. (1955). The growth of oysters parasitised by the fungus *Dermocystidium marinum* and the trematode *Bucephalus cuculus*. *J. Parasit.* **41**(4): 333-342
- Menesguen A et Dreves L. (1987). Sea-temperature anomalies and population dynamics variations: Effects on growth and density of three bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **36**(1): 11-21

- Mayhoefer E. (1985). Comparative pumping in rates in suspension-feeding bivalves. *Mar. Biol.* **85**(2): 137-142
- Moehlenberg F et Riisgaard HU. (1979). Filtration rate, using a new indirect technique, in thirteen species of suspension-feeding bivalves. *Mar. Biol.* **54**(2): 143-147
- Miller RG Jr. (1981). Simultaneous statistical inference, New York, Springer-Verlag
- Moore D. (1993). Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In Ausubel F.M. (ed.). Current protocols in molecular biology, New-York, **1**(2-2): 1-2
- Morán P, Pendás AM, Beall E et García-Vásquez E. (1996). Genetic assessment of the reproductive success of Atlantic salmon precocious parr by means of VNTR loci. *Heredity* **77**(6): 655-660
- Morton BS. (1970). The tidal rythm and rythm of feeding and digestion in *Cardium edule* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **50**: 499-512
- Mouabad A et Pihan JC. (1993). The *Dreissena polymorpha* behavioural test: a biological tool for predicting and assessing the toxicity in freshwaters. *Hydroecol. Appl.* **5**(1): 97-109
- Murawski SA et Fogarty MJ. (1984). A spatial yeild model for bivalve populations accounting for densitydependent growth and mortality. ICES C.M. 1984/K:26
- Naciri Y, Vigouroux Y, Dallas J, Desmarais E, Delsert C et Bonhomme F. (1995). Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **4**(1): 83-89
- Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E et White R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* **235**: 1616-1622
- Nassif NT et Mckinlay AG. (1996). Detection and characterisation of two novel hypervariable microsatellite repeat regions within intron 2 of the α -globin gene of the bivalve mollusc *Anadara trapezia*. *Gene* **183**: 225-230
- Navarro JM et Widdows J. (1997). Feeding physiology of *Cerastoderma edule* in response to a wide range of seston concentration. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **152**: 175-186
- Nell JA, Smith IR et Sheridan AK. (1999). Third generation evaluation of Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) breeding lines. *Aquaculture* **170**: 195-203
- Neudecker T. (1981). Experimental offshore nursery - growing of *Crassostrea gigas* Thunberg in Germany In: (C. Claus, N. Depauw, and E. Jaspers, eds.) Nursery Culturing of Bivalve Molluscs. European Mariculture Society Special Publication No. 7. EMS, Bredene, Belgium 197-210
- Newkirk GF. (1978). Interaction of genotype and salinity in larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* **48**: 227-234
- Newkirk GF. (1980). Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture* **19**: 209-228

- Newkirk GF. (1981). On the predictability of bivalve growth rates: is a slow growing oyster a runt for life ? In C Claus, N Depauw et E Jaspers (eds.) Nursery Culturing of Bivalve Molluscs. European Mariculture Society Special Publication No. 7. EMS, Bredene, Belgium 211-218
- Newkirk GF. (1983). Applied breeding of commercially important molluscs: A summary of discussion. *Aquaculture* **33**(1-4): 415-422
- Newkirk GF et Haley LE. (1982a). 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**: 177-184
- Newkirk GF et Haley LE. (1982b). Progress in selection for growth-rate in the european oyster *Ostrea-edulis*. *Mar. Ecol. -Prog. Ser.* **10**: 77-79
- Newkirk GF et Haley LE. (1983). Selection for growth rate in the European oyster, *Ostrea edulis*: response of second generation groups. *Aquaculture* **33**(1-4): 149-155
- Newkirk GF, Haley LE, Waugh DL et Doyle R. (1977a). Genetics of Larvae and Spat Growth Rate in the Oyster *Crassostrea virginica*. *Mar.Biol.* **41**: 49-52
- Newkirk GF, Haley LE, Waugh DL et Doyle R. (1977b). Genetics of Larval tolerance to reduced salinities in two populations of oysters, *Crassostrea virginica*. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**: 383-387
- Newkirk GF, Haley LE et Dingle J. (1981). Genetics of the blue mussel *Mytilus edulis* (L.): non additive genetic variation in larval growth rate. *Can. J. Genet. Cytol.* **23**: 349-354
- Okumus I et Stirling HP. (1994). Physiological energetics of cultivated mussel (*Mytilus edulis*) populations in two Scottish west coast sea lochs. *Mar. Biol.* **119**: 125-131
- Otsen M, Den Bieman M, Winer ES, Jacob HJ, Szpirer J, Szpirer C, Bender C et Van Zutphen LFM. (1995). Use of simple sequence length polymorphisms for genetic characterisation of rat inbred strains. *Mamm. Genome* **6**: 192-195
- Owen WB. (1962). Handbook of Statistical tables. Redding, Massachusetts, Addison-Wesley
- Paulet YM, Lucas A et Gérard A. (1988). Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* (L.) populations from Brittany *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **119**: 145-156
- Pauly D. (1980). On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stocks. *J. Cons. Inst. Explor. Mer* **39**: 175-192
- Pavé A. (1994). Modélisation en biologie et en écologie. Aleas editeur, Lyon, 559 p
- Paynter KT. (1996). The effects of Perkinsus marinus infection on physiological processes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.* **15**(1): 119-125
- Paynter KT et Dimichele L. (1990). Growth of tray-cultured oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin) in Chesapeake Bay. *Aquaculture* **87**: 289-297
- Pechenik JA. (1980). Growth and energy balance during the larval lives of three prosobranch gastropods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **44**: 1-28

- Pechenik JA. (1984). The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **74**: 241-257
- Pechenik JA. (1987). Environmental influences on larval survival and development. In AC Giese, JS Pearse et VB Pearse (eds.) *Reproduction of marine invertebrates*, Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, California, **9**: 551-609
- Pechenik JA. (1990). Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates: Does it occur: Is there a price to pay? *Ophelia* **32**(1-2):63-94
- Pechenik JA et Lima GM (1984). Relationship between growth, differentiation, and length of larval life for individually reared larvae of the marine gastropod, *Crepidula*. *Biol.Bull.* **166**(3): 537-549
- Pechenik JA, Heyman WD. (1987). Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata*. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* **112**: 27-38.
- Pechenik JA, Rittschof D et Schmidt AR. (1993). Influence of delayed metamorphosis on survival and growth of juvenile barnacles *Balanus amphitrite*. *Mar.Biol.*, **115**: 287-294
- Pechenik JA, Hilbish TJ, Eyster LS et Marshall D. (1996a). Relationship between larval and juvenile growth rates in two marine gastropods, *Crepidula plana* and *C. fornicata*. *Mar.Biol.*, **125**: 119-127
- Pechenik JA, Hammer K, Weiss C. (1996b). The effect of starvation on acquisition of competence and postmetamorphic performance in the marine prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* **199**: 137-152
- Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR et Barrett JA. (1995). Non amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecology* **4**: 249-252
- Pérez-Lezaun A, Calafell F, Mateu E, Comas D, Ruiz-Pacheco R et Bertranpetit J. (1997). Microsatellite variation and the differentiation of modern humans. *Human Genetics* **99**: 1-7
- Perron FE. (1980). Laboratory culture of the larvae *Conus textile* L. (Gastropoda: Toxoglossa). *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* **42**: 27-38
- Petersen CH. (1982). The importance of predation and intra- and interspecific competition in the population biology of two infaunal suspension-feeding bivalves, *Protothaca staminea* and *Chione undatella*. *Ecol. Monogr.* **52**: 437-475
- Peterson CH et Beal BF. (1993). Bivalve growth and higher order interactions: Importance of density, site, and time. *Ecology* **70**(5): 1390-1404
- Peterson CH et Black R. (1993). Experimental tests of the advantages and disadvantages of high density for two coexisting cockles in a southern Ocean lagoon. *J. Anim. Ecol.* **62**: 614-633
- Pohlo RW. (1973). Feeding and associated functionnal morphology in *Tagelus californianus* and *Florimetus obesa* (Bivalvia: Tellinacea). *Malagologia* **12**: 1-11
- Pogson G et Zouros E. (1994). Allozyme and RFLP Heterozygosities as Correlate of Growth Rate

- in the Scallop *Placopecten magellanicus*: A Test of the Associative Overdominance Hypothesis. *Genetics* **137**(1): 221-231
- Pritchard A, Laping J, Seilhamer J et Cummings D. (1983). Inter-species sequence diversity in the replication initiation region of *Paramecium* mitochondrial DNA. *J. Molec. Biol.* **64**: 1-15
- Puigcerver M. (1996). Analysis on individual growth of juvenile carpet shell clams, *Tapes decussatus* (L.), in three different rearing conditions employed in the Ebro's Delta, Spain. *Aquacult. Res.* **27**: 399-404
- Purchon RD. (1968). "The biology of mollusca", Pergamon Press, Oxford, England
- Purdom CE. (1974). Variation in fish. In FR Harden Jones (ed.) *Sea Fisheries Research*. Elek Science, London, 347-355
- Pynnönen KS et Huebner J. (1995). Effects of episodic low pH exposure on the valve movements of the freshwater bivalve *Anodonta cygnea* L. *Wat. Res.* **29**: 2579-2582.
- Quayle DB. (1988). Pacific oyster culture in British Columbia. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* **218**: 247p
- Raby D, Mingelbier M, Dodson JJ, Klein B, Lagadeuc Y et Legendre L. (1997). Food-particle size and selection by bivalve larvae in a temperate embayment. *Mar. Biol.* **127**(4): 665-672
- Rassman K, Schlötterer C et Tautz D. (1991). Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* **12**: 113-118
- Raven CP. (1966). Morphogenesis: the analysis of molluscan development. Pergamon Press, Oxford
- Rawson PD et Hilbish TJ. (1990). Heritability of juvenile growth for the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Biol.* **105**(3): 429-436
- Reid RGB. (1971). Criteria for categorizing feeding types in bivalves. *Veliger* **13**: 358-359
- Renault T, Cochenne N, Le Deuff RM et Chollet B. (1994). Herpes-like virus infecting Japanese oysters (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Path.* **14**
- Renault T, Le Deuff RM, Cochenne N, Chollet B et Maffart P. (1995). Herpes-like virus associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.* **26**(5-6): 539-543
- Ricker WE. (1968). "Methods for assessment of fish production in fresh waters." (*Int. Biol. Prog. Handbook 3.*) Blacwell, Oxford, England
- Riisgård HU et Møhlenberg F. (1979). An improved automatic recording apparatus for determining the filtration rate of *Mytilus edulis* as a function of size and algal concentration. *Mar. Biol.* **52**: 61-67
- Rodriguez W, Espinos FJ, Otero F et Silveiro N. (1992). Description of a highly efficient system for *Ostrea edulis* L. larval settlement. *Actes de colloques IFREMER* **14**: 89-92

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ron M, Blanc Y, Band M, Ezra E et Weller JI. (1996). Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implication for genetic improvement. *J. Dairy Sci.* **79**: 676-681
- Roughgarden J, Gaines S et Possingham H. (1988). Recruitment dynamics in complexe life cycles. *Science* **241**: 1460-1466
- Rheault RB et Rice MA. (1996). Food-limited growth and condition index in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791), and the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* (Lamarck 1819). *J. Shellfish Res.* **15**: 271-283
- Rhyu MG, Park WS et Meltzer SJ. (1994). Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* **9**: 29-32
- Rice MA et Pechenik JA (1992). A review of the factors influencing the growth of the northern Quahog, *Mercenaria mercenaria* (Linneaus, 1758). *J. Shellfish Res.* **11**: 279-287
- Ricker WE. (1975) Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bull. Fish. Res. Bd. Ca.* **191**: 1-382
- Sainsbury KJ. (1980). Effect of individual variability on the von Bertalanffy growth equation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **37**(2): 241-247
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Schard S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB et Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Salànkı J. (1964). Contributions to the problem of daily rhythm in the activity of the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Annal. Biol. Tihany* **31**: 109-116
- SAS Institute Inc. (1988) *SAS/STAT User's Guide, Release 6.03*, SAS Institute Inc. 1028 pp
- Scheltema RS. (1962). Pelagic larvae of the New England intertidal gastropods I *Nassarius obsoletus* Say and *Nassarius vibex* Say. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **81**: 1-11
- Scheltema RS. (1974). Biological interactions determining larval settlement of marine invertebrates. *Thalassia jugosl.* **10**: 263-296
- Schizas NV, Street GT, Coull BC, Chandler GT et Quattro JM. (1997) An efficient DNA extraction method for small metazoans. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **6**(4): 381-383
- Schlöterer C et Tautz D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**: 211-215
- Severejn HJ, De Severejn YG, Ewald JJ et Morales F. (1996). Effect of environmental parameters and the initial size on the growth of the commercial clam under natural conditions. *Revista de la Facultad de Agronomia* **13**(3): 341-356
- Shapiro SS et Wilk MB. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**: 591-611
- Sheridan AK. (1997). Genetic improvement of oyster production - a critique. *Aquaculture* **153**: 165-179

- Sheridan AK, Smith IR et Nell JA. (1996). Reducing the impact of environmental variation in a growth rate improvement program for the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*. *Aquaculture* **143**(2):145-154
- Shumway SE. (1982). Oxygen consumption in oysters: an overview. *Mar. Biol. Letters* **3**: 1-23
- Shumway SE, Cucci TL, Newell RC et Yentsch CM. (1985). Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* **91**(1-2): 77-92
- Singh SM. (1979). Adaptative significance of genetic variation in natural populations. *Genetics* **91**: 119
- Singh SM. (1978). A model for the maintenance of genetic variability and its utilization in genetic improvement of oyster populations. *Aquaculture* **15**: 289-295
- Singh SM et Zouros E. (1981) Genetics of growth rate in oysters and its implication for aquaculture. *Can.J.Genet.Cytol.* **23**: 119-130
- Singh SM et Zouros E. (1978). Genetic variation associated with growth rate in the american oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution*.**32**: 342-353
- Singh SM et Zouros E. (1977). Correlation of homozygosity and growth rate in oysters. *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 580
- Skibinski DOF, Beardmore JA et Cross TF. (1983). Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. *Biol. J. Lin. Soc. London* **19**: 137-183
- Slettan A, Olsaker I et Lie O. (1993). Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitive sequences from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Anim. Genet.* **24**: 195-197
- Smaal AC, Vonck APMA et Bakker M. (1997). Seasonal variation in physiological energetics of *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule* of different size classes. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **77**: 817-838
- Smith PJ, Ozaki H et Fujio Y. (1986). No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New-Zealand. *New Zealand J. Mar. Freshwater Res.* **20**: 569-574
- Smith IR, Sheridan AK et Nell JA. (1995). Evaluation of growing methods for use in a Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) selective breeding program. *Aquaculture* **131**(3-4): 189-195
- Sobral P et Widdows J. (1997). Effects of elevated temperatures on the scope for growth and resistance to air exposure of the clam *Ruditapes decussatus* (L.), from southern Portugal. *Sci.Mar.* **61**(1): 163-171
- Sokal RR et Rohlf FJ. (1995). Biometry. WH Freeman and Co, New York, 887 pp
- Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE et Moyzis RK. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* **10**: 807-815
- Strathmann MF. (1987a). Reproduction and development of marine invertebrates of the northern

Pacific coast, University of Washington Press, Seattle

- Strathmann RR. (1987b). Larval feeding. In Giese AC, Pearse JS, Pearse VB (eds) *Reproduction of Marine Invertebrates* **9** Blackwell Scientific Publications, Palo Alto
- Stirling HP et Okumus I. (1995). Growth and production of mussels (*Mytilus edulis* L.) suspended at salmon cages and shellfish farms in two scottish sea lochs. *Aquaculture* **134**: 193-210
- Stearns SC. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press, New York.
- Strand M, Prolla T, Liskay R et Peter T. (1994). Destabilisation of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**: 274-276
- Strickland J et Dabinett P. (1993). Rates of feeding, oxygen consumption and ammonia excretion as a function of size for hatchery reared spat of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* **93**(4): 125-127
- Strömberg T et Nielsen M. (1989). Heritability of Growth in Larvae and Juveniles of *Mytilus edulis*. *Aquaculture* **80**: 1-6
- Tapia C, Dupre E, et Bellolio G. (1993). Description of settlement behaviour of pediveliger larvae of *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. *Rev. Biol. Mar.* **28**: 75-84
- Taylor AC et Brand AR. (1975). Effects of hypoxia and body size on the oxygen consumption of the bivalve *Arctica islandica* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **19**: 187-196
- Teissier G. (1937). Les lois quantitatives de la croissance. *Ann. Physiologie* **12**: 527-545
- Thiriot-Quiévreux C. (1986). Study of aneuploidy in spats of Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* **70**(3): 225-231
- Thiriot-Quiévreux C et Ayraud, N. (1982). The karyotypes of some marine bivalve and gastropod species. *Mar. Biol.* **70**(2): 165-172
- Thiriot-Quiévreux C, Noel T, Bougrier S et Dallot S. (1988). Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **75**(1-2): 89-96
- Thiriot-Quiévreux C, Pogson G et Zouros E. (1992). Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* **35**: 39-45
- Tomassone R, Dervin C et Masson JP. (1993). *Biométrie, modélisation de phénomènes biologiques*. Masson, Paris 553 p
- Toro JE. (1990). Response to selection, heritability and genetic correlation for live weight and shell height in the European oyster *Ostrea edulis* Linne. *Rev. Biol. Mar.* **25**: 135-146
- Toro JE et Newkirk GF. (1990a). Divergent selection in the European oyster (*Ostrea edulis* L.): response to selection and estimates of genetic parameters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **62**(3): 219-227
- Toro JE et Newkirk GF. (1990b). Phenotypic analysis in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* Philippi 1845: relationship between juvenile and adult growth rates. *Aquacult. Fish. Manag.*

21(3):285-291

- Toro JE et Newkirk GF. (1991). Response to artificial selection and realized heritability estimate for shell height in the Chilean oysters *Ostrea chilensis*. *Aquat. Living Resour.* **4**: 101-108
- Toro JE, Sanhueza MA, Winter JE, Aguila P et Vergara AM. (1995). Selection response and heritability estimates for growth in the Chilean oyster *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845). *J. Shellfish Res.* **14**(1): 87-92
- Toro JE, Vergara AM et Gallegillos R. (1996a). Multiple-locus heterozygosity, physiology and growth at two different stages in the life cycle of the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **134**(1-3): 151-158
- Toro JE, Aguila P et Vergara AM. (1996b). Spatial variation in response to selection for live weight and shell length from data on individually tagged Chilean native oysters (*Ostrea chilensis* Philippi, 1845). *Aquaculture* **146**: 27-36
- Urrutia MB, Iglesias JIP, Navarro E et Prou J. (1996). Feeding and absorption in *Cerastoderma edule* under environmental conditions in the bay of Marennes-Oleron (western France). *J.Mar.Biol.Ass.U.K.* **76**(2): 431-450
- Vahl O. (1978). Seasonal changes in oxygen consumption of the Iceland scallop *Chlamys islandica* (O.F. Müller) from 70° N. *Ophelia* **17**: 143-154
- Vahl O. (1981a). Age-specific residual reproductive value and reproductive effort in the iceland scallop, *Chlamys islandica* (O.F. Müller). *Oecologia* **51**: 53-56
- Vahl O. (1981b). Energy transformation by the Iceland scallop *Chlamys islandica* (O.F. Müller) from 70° N. I. The age-specific energy budget and net growth efficiency. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **53**: 281-296
- Vahl O. (1981c). Energy transformation by the Iceland scallop *Chlamys islandica* (O.F. Müller) from 70° N. II. The population energy budget. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **53**: 297-303
- Van Haren RJF et Kooijman SALM. (1993). Application of a dynamic energy budget to *Mytilus edulis* (L.). *Neth. J. Sea. Res.* **31**: 119-133
- Verdonk NH et van den Biggelaar JAM. (1983). Early development and the formation of the germ layers. In van den Biggelaar JAM et Tompa ASS (eds) *The Mollusca 3 Development*, Academic Press, New York
- Verhulst PF. (1844). Recherche mathématique sur la loi d'accroissement de la population. *C.R. Acad. Royal Belgique* **18**: 1-32
- Vincent B, Joly D et Brassard C. (1989). Effects of density on the growth of the bivalve *Macoma balthica* (L.) in the intertidal zone. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **126**(2): 145-162
- Wahlund S. (1928). Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom standpunktd der vererbunslehre ausbetrachtet. *Hereditas* **11**: 65-106
- Walne PR. (1965). Observations on the influence of food supply and temperature on the feeding and growth of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest., London, Ser. 2* **25**(4): 1-53

- Walne PR. (ed) (1974). Culture of bivalve molluscs: fiftyyears experience at Conwy, Whitefriars Press Ltd, London
- Walsh PS, Metzger DA et Higuchi R. (1991). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques* **10**(4): 506-513
- Wang WX et Widdows J. (1993). Calorimetric studies on the energy metabolism of an infaunal bivalve, *Abra tenuis*, under normoxia, hypoxia and anoxia. *Mar. Biol.* **116**(1): 73-79
- Ward JE, Levinton JS, Shumway SE et Cucci T. (1997). Site of particle selection in a bivalve mollusc. *Nature* **390**(6656): 131-132
- Ward TJ. (1982). Effect of cadmium on particle clearance by the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (I. & R.). *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* **33**(4): 711-715
- Weber JL. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**: 524-530
- Weber JL et May PE. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Human Genet.* **44**: 388-396
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal M, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G et Lathrop M. (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**: 794-801
- Whitely NM, Taylor EW, Clarke A et El Haj AJ. (1997). Haemolymph oxygen transport and acid-base status in *Glyptonotus antarcticus* eights. *Pol. Biol.* **18**(1): 10-15
- Widdows J. (1978). Combined effects of body size, and food in the mussel *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **58**: 109-124
- Widdows J, Fieth P et Worrall CM. (1979). Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **50**: 195: 207
- Widdows J, Donkin P, Brinsley MD, Evans SV, Salkeld PN, Franklin A, Law RJ et Waldock MJ. (1995). Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **127**(1-3): 131-48
- Wiegert RG. (1968). Thermodynamic considerations in animal nutrition. *Am. Zool.* **8**: 71-81
- Wilbur HM et Collins JP. (1973). Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* **182**: 1305-1314
- Wildish D, Lassus P, Martin J, Saulnier A et Bardouil M. (1998). Effect of the PSP (paralytic shellfish poisoning) - causing dinoflagellate, *Alexandrium sp.* on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **11**(1): 35-43
- Wilkins NP. (1981). The rationale and relevance of genetics in aquaculture: an overview. *Aquaculture* **57**: 171-176
- Winberg GC. (1956). Rate of metabolism and food requirements of fishes (Russian). Belorussian State Univ., Minsk. *Trans. Ser. Fish. Res. Board Can.* **194**

- Winter JE. (1973). The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuous automatic recording apparatus. *Mar. Biol.* **22**: 317-328
- Winter JE. (1977). Suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with particular reference to aquaculture. *Medio Ambiente* **3**(1): 48-69
- Winter JE. (1978). A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* **13**(1): 1-33
- Winter JE, Toro JE, Navarro JM, Valenzuela GS et Chaparro OR. (1984). Recent developments, status and prospects of molluscan aquaculture on the Pacific coast of South America. *Aquaculture* **39**: 95-134
- Winterø AK, Fredholm M et Thompsen PD. (1992). Variable (dG-dT)_n - (dC-dA)_n in the porcine genome. *Genomics* **12**: 281-288
- Wong AK, Yee AH, Van de Sande JH et Rattner JB. (1990). Distribution of CT-rich tract is conserved in vertebrates chromosomes. *Chromosoma* **99**: 344-351
- Whyte JNC. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* **60**(3-4): 231-241
- Xie Q et Burnell GM. (1995). The effect of activity on the physiological rates of two clam species, *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) and *Tapes decussatus* (Linnaeus). *Biol. Envi.: Proc.R.Irish Acad.* **95B**(3): 217-223
- Yonge CM. (1949). On the structure and adaptations of the Tellinacea, deposit-feeding Eulamellibranchia. *Phil. Trans. R. Soc., London B* **23**: 29-76
- Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, Holman K, Mulley JC, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR et Richards RI. (1991). Fragile-X genotype characterised by an unstable region of DNA. *Science* **252**: 1179-1181
- Zoghbi HY, Chung M, Banfi S, Kwiatowski TJ, Serviado A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW et Orr HT. (1993). Expansion of an unstable trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type-1. *Am. J. Human Genet.* **53**: 9
- Zouros E. (1993). Associative overdominance: evaluating the effects of inbreeding and linkage disequilibrium. *Genetica* **89**: 35-46
- Zouros E et Foltz DW. (1984a). Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oyster Populations. *Dev.Gen.* **4**: 393-405
- Zouros E et Foltz DW. (1984b). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia* **25**(2): 583-591
- Zouros E et Pogson GH. (1994). The present status of the relationship between heterozygosity and heterosis. In Beaumont AR (ed.). Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman and Hall, London, pp. 135-146
- Zouros E, Singh SM et Miles HE. (1980). Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and

its possible explanations. *Evolution*. **34**: 856-867

Zouros E, Singh SM, Foltz DW et Mallet AL. (1983). Post-settlement viability in the American oyster (*Crassostrea virginica*): an overdominant phenotype. *Genet. Res.* **41**: (3) 259-70

Zouros E, Thiriot-Quievreux C, Kotoulas G. (1996). The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. *Genet. Res.* **68**(2): 109-116

ANNEXES

Annexe 1

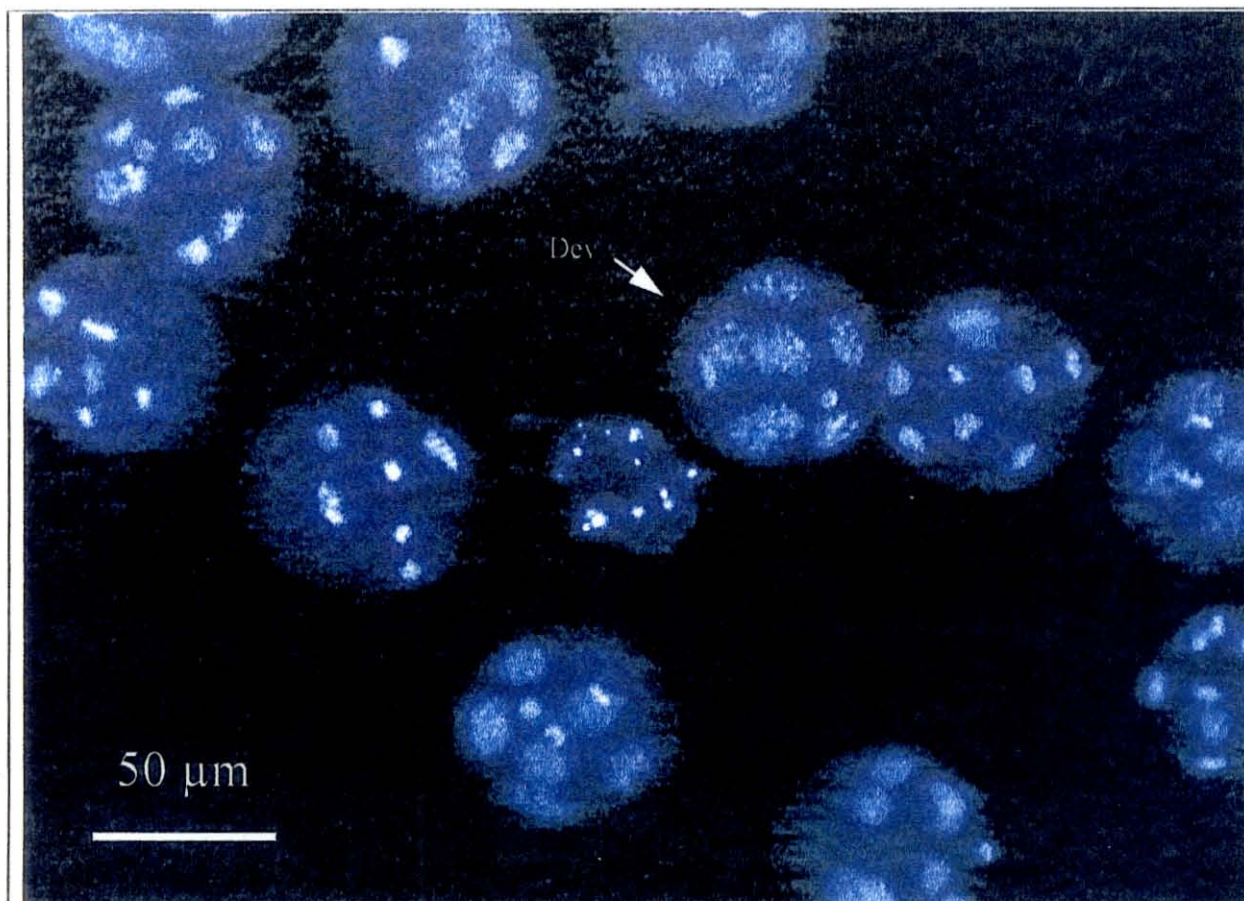


photo 1: Embryons de *Crassostrea gigas* âgés 3 heures en épifluorescence. dev = exemple d'un embryon normalement développé.

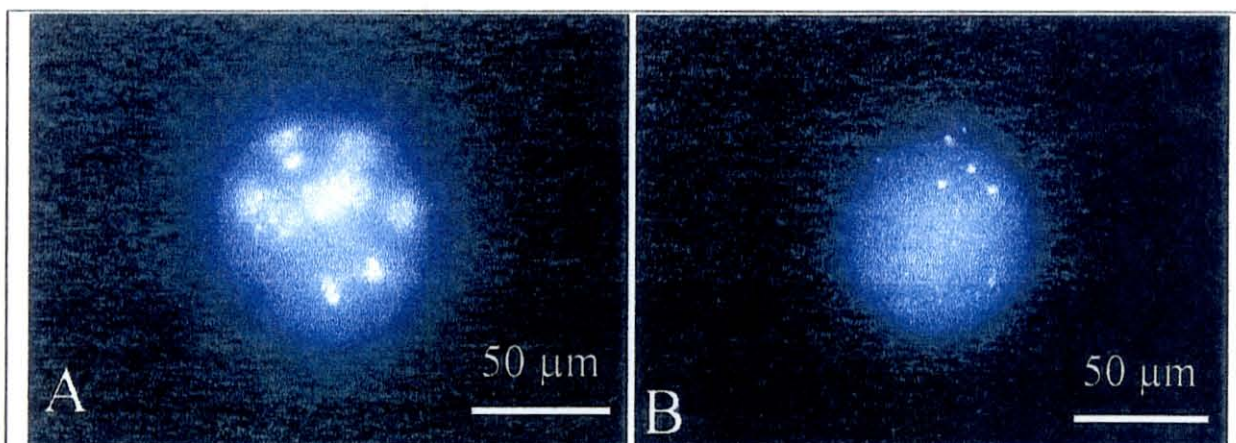


photo 2 A. Exemple d'embryon développé B. Exemple d'ovocyte non fécondé, les têtes des spermatozoïdes sont visibles.

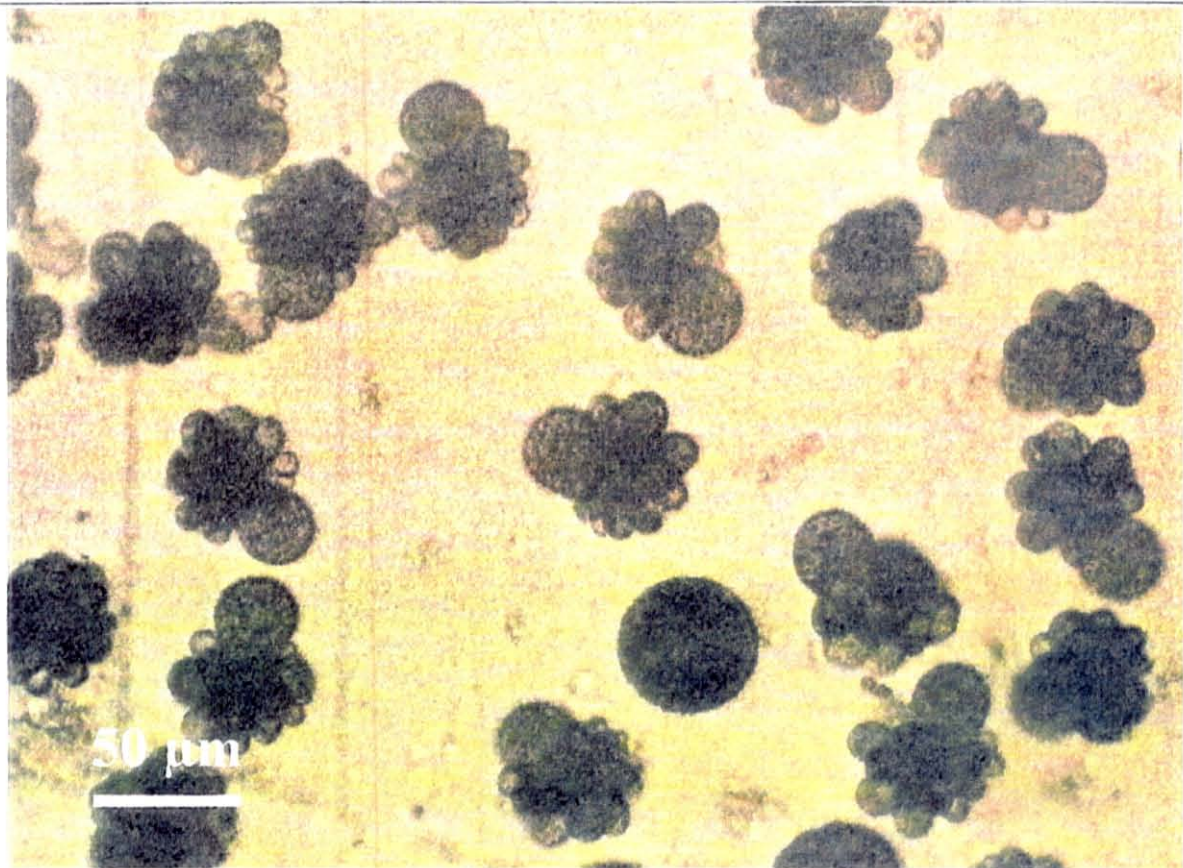


photo 3: Embryons de *Crassostrea gigas* âgés 4 heures après fécondation (stade morula).

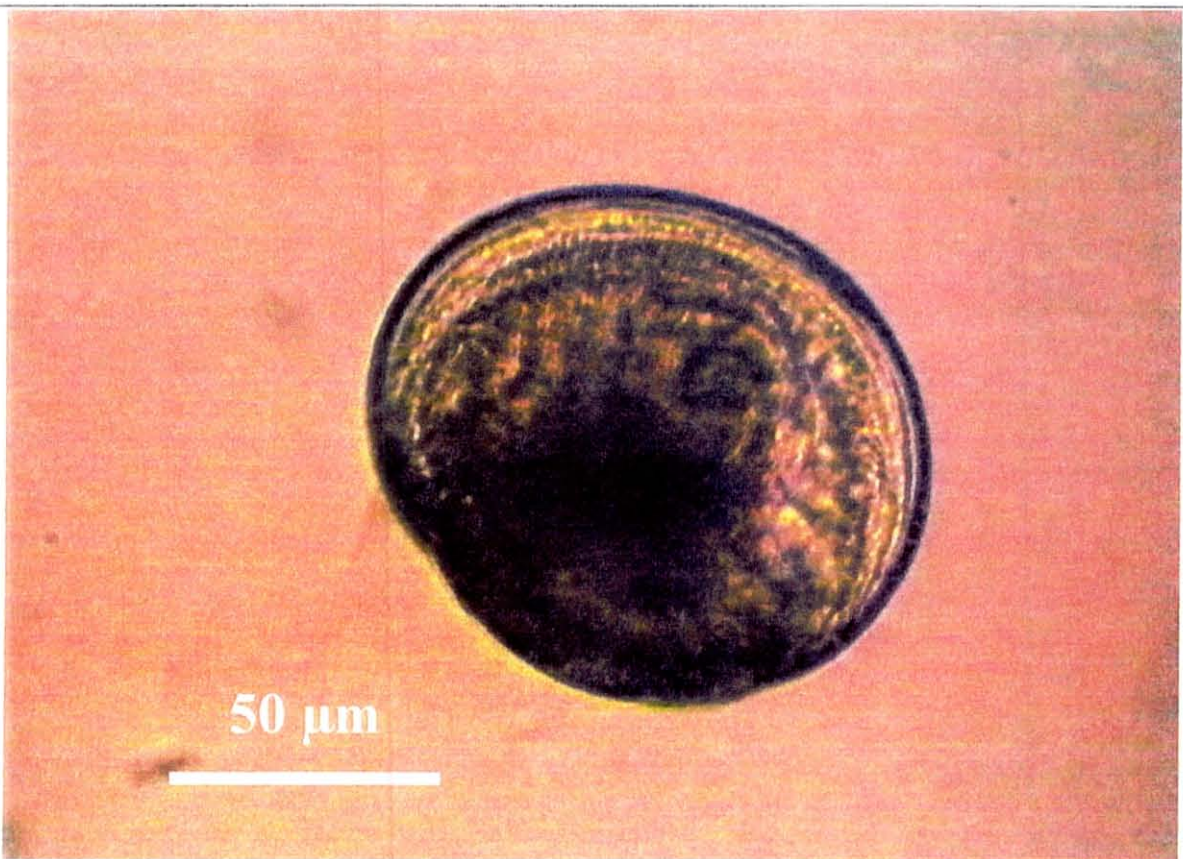


photo 4: Larve de *Crassostrea gigas* 7 jours après la fécondation.

Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg)

S. Bougrier, B. Collet, P. Geairon, O. Geffard, M. Héral, J. M. Deslous-Paoli

CNRS-IFREMER, CREMA, 17 137 L'Houmeau, France

IFREMER, URGE, 17 390 La Tremblade, France

IFREMER, URAPC, 17 390 La Tremblade, France

IFREMER, DEL, 34 203 Sète, France

Accepted 25 June 1997

Abstract

A continuous monitoring system has been developed to measure the respiratory time activity (RTA) of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). This activity was recorded over 24 h using this technique, at constant temperatures of 15 and 21°C in the laboratory. At 21°C, respiratory activity was measured before and after a period of starvation, during which spawning occurred. In the field, RTA was measured during two successive tidal cycles of a day. The respiratory time activity was defined as the percentage of time spent active by the oyster relative to the total experimental time. Important individual variability was noticed, percentage of time spent active ranged from 0 (RTA = 0%) to 100% (RTA = 100%). RTA measured on the whole experimental population, taking into account active and non-active oysters, varied from 52 to 86% under laboratory conditions and, according to the season, from 44 to 82% in the field. Considering only the active oysters (RTA>0%) which represented, according to the different experiments, from 75 to 100% of the studied population, RTA varied from 54 to 86% in the laboratory and from 59 to 94% in the field experiments. The influence of RTA on growth predictions is discussed.

Keywords : Continuous monitoring system, Oxygen uptake, Respiratory time activity, Oysters, *Crassostrea gigas*

Article Journal of Experimental Marine Biology & Ecology 226 (1998) : 279-291

Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamark) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis

Pierre Boudry, Serge Heurtebise, Bertrand Collet, Florence Cornette, André Gérard

IFREMER, Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie, 17 390 La Tremblade,
France

Accepted 25 October 1997

Abstract

Restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified mitochondrial DNA fragments were used to examine genetic differentiation between populations of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). The taxonomic status of *C. angulata* and *C. gigas* has often been questioned since no morphological or genetic differences had ever been observed between the two taxa. Samples identified as *C. angulata*, were collected from 16 sites located in southern Portugal and Spain and samples identified as *C. gigas*, from European and Asian sites. Of the six haplotypes observed, one was commonly found among oysters identified as *C. gigas* while another one was most frequent among oysters identified as *C. angulata*. Analysis of haplotype diversity among sites showed that samples originating from southern Portugal and Spain cluster with the Taiwanese sample. These results implicate Taiwan as the possible origin of European *C. angulata* populations. The ability to differentiate between these two previously indistinguishable taxa allowed us to identify a population in Portugal as mixed. These results open new perspectives for the study of characters previously described as varying between *C. gigas* and *C. angulata*, such as growth performance and disease susceptibility.

Keywords : *Crassostrea angulata*, *Crassostrea gigas*, PCR, mtDNA RFLP, Genetic differentiation

Annexe 4: ICES STATUTORY MEETING 1998

Theme Session K
Use of Genetics in Aquaculture
CM 1998/K:7

**The use of microsatellite markers for parentage analysis in the Pacific cupped oyster,
Crassostrea gigas (Thunberg).**

by

Boudry P.¹, Collet B.¹, Kotoulas G.², Magoulas A.², Hervouet V.¹, Bonhomme F.³, Gérard A.¹

¹ IFREMER, BP133, 17390 La Tremblade, FRANCE

² IBMC, P.O. Box 2214, 71003 Iraklion, GREECE

³ LGP, 1 quai de la Daurade, 34200 Sète, FRANCE

Abstract: Highly polymorphic genetic markers can be useful tools for the analysis of parental contributions. The present paper reports 3 experiments using microsatellite markers to analyse parental contributions in controlled *in vitro* factorial crosses of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. Parentage analysis was eased by the large polymorphism observed at the 3 loci studied. In a cross between 20 males and 20 females, a quarter of the progeny could be assigned to a given parent using a single microsatellite locus showing 28 alleles. In 3 crosses between 5 males and females, all the progeny could be assigned to a family by using 3 loci. In all cases, the combined genotyping at 2 loci allowed parentage to be determined unambiguously. Despite the balanced gametic contribution of each parent before fertilisation, unbalanced parental contributions are observed in the progeny, both at larval and juvenile stages. Evidence of gametic and zygotic competition is given to explain the observed unbalanced parental contributions.

Keywords: parental contributions, microsatellites, *Crassostrea gigas*.

Résumé: Les marqueurs génétiques très polymorphes sont des outils très utiles pour l'analyse des contributions parentales. Notre étude présente 3 expériences utilisant les marqueurs microsatellites pour l'analyse des contribution parentales dans des croisement contrôlés *in vitro* chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. L'analyse de parenté a été facilitée par le grand polymorphisme observé aux 4 locus étudiés. Dans un croisement entre 20 mâles et 20 femelles, le père ou la mère d'un quart des descendants ont pu être déterminés en utilisant un seul locus microsatellite présentant 28 allèles. Dans 3 croisements entre 5 mâles et 5 femelles, tous les descendants ont pu être assignés à une famille en utilisant 3 locus. Dans tous les cas, la combinaison des génotypes à 2 locus a permis l'identification des parents. Malgré des contributions gamétiques équilibrées entre parents avant la fécondation, des contributions parentales déséquilibrées sont observées dans les descendants, aux stades larvaires et juvéniles. Nous démontrons des effets de compétition gamétique et zygotique ce qui permet de comprendre les déséquilibres des contributions parentales observées.

Mots-clés: contributions parentales, microsatellites, *Crassostrea gigas*.

Introduction

Very high fecundity is a characteristic of many aquacultural species. It is therefore common practice for hatcheries to produce large amounts of offspring from a limited number of parents. The genetic variability present in these offspring is of course directly related to the number of parents used, but can be also reduced by unbalanced contributions of each parent, leading to very small effective population sizes. The genetic consequences of such practices are of concern, especially if some of these offspring are to be used as parents for the next generation. Inbreeding is likely to occur, leading to a decrease in performance (Kincaid, 1976; Bierne et al., 1998). Furthermore, a reduced genetic variability limits the possibilities of genetic improvement by selective breeding.

Individual tagging is impossible at early stages of life, so genetic management of stocks in aquaculture is commonly based on families, reared in separate structures. This practice can lead to environmental heterogeneity among families however and therefore bias genetic analyses. As replication is costly, alternative methods, based on DNA markers, have been proposed as a tool for pedigree identification of mass-reared aquacultural populations (Harris et al. 1991; Herbinger *et al.*, 1996a; Garcia de Leon *et al.* 1998) or for studies in the wild (Ferguson *et al.*, 1995; Kellog *et al.*, 1995; Colbourne *et al.*, 1996; Herbinger *et al.*, 1996b).

In the wild, the effective size of a population (N_e) is almost always smaller than the actual number of individuals due to many reasons including overlapping generations, non random mating, unbalanced sex ratio and selection (Hedgcock, 1994). One possible approach for the study of some of these factors is the examination of parental contributions from one generation to another, in wild or experimental populations.

In this paper, we report some results concerning the analysis of parental contribution using microsatellite markers. The results of 3 different experiments are presented and some possible causes of the observed unbalanced parental contributions are identified.

Material and Methods

Parental oysters

Individuals were sampled from the French Atlantic coast where *Crassostrea gigas* was introduced in the early 1970s. For the first and the second experiment, mature oysters were chosen at random and crossed (see below). For each parent a fragment of gill was preserved in 100% ethanol for further DNA analyses. For the third experiment, 100 oysters were first analysed at 3 microsatellite loci (see below) and gill fragments were collected by biopsy. After the conditioning period, 10 individuals (5 males and 5 females) were selected in such a way that each chosen parent was heterozygote and carried alleles different from those of the other parents. This enabled the unambiguous identification of the 20 alleles present in the progeny in order to trace parentage, with no risk of null alleles.

Crosses

For each experiment, spermatozooids of each male were individually collected by stripping the gonad. The sperm was diluted with 1 μ m filtered sea water, its concentration was estimated using Thoma slides coupled to an image processing system (Alcatel), and stored at 4 °C. Oocytes of each female were then collected using the same procedure and numbered using Malassez slides. For each female, oocytes were distributed in each fertilisation beaker

and fertilised separately by each male at a ratio of 100 spermatozoa per oocyte. Three different type of crosses were performed by in vitro fertilisation:

- First experiment: 20 males crossed with 20 females with separate fertilisation ($20 \times 20 = 400$ separate crosses mixed together after 3h),
- Second experiment: 3 sets of 5 males and 5 females (3 sets of $5 \times 5 = 25$ separate crosses mixed together after 3h)
- Third experiment: 5 males and 5 females with two different types of crosses:
 - 5 males \times 5 females = 25 separate crosses mixed together after 3h,
 - The gametes of the 5 males and the 5 females were first mixed within each gender and then mixed together.

Early embryonic development was examined using nuclear DNA staining with an epifluorescence microscope, as described in Gérard *et al.* (1994).

Larval rearing

Larvae were reared in GRP (Glass Reinforced Polyester) tanks filled with 1 μm filtered sea water (temperature 23 °C, salinity 28-30 ‰) and were fed *Isochrysis galbana* and *Extubocellulus criberiger*. The total amount of algae provided was 60 cells/ μl . This concentration was in excess to avoid competition for food between larvae and therefore to maximise phenotypic variability. Every 48 hours, the larvae were collected by sieving and a sample was counted (Cell counter) and measured (Profile projector, Nikon). Density was progressively reduced by discarding a part of the population without any selective sieving.

Settlement

In the first experiment, Successive sieving operations were performed in order to separate "sieving groups". When the first pediveligera larvae appeared, the largest larvae (size greater than 280 μm) were retained by sieving and left to settle. The remaining larval population was kept in the larval rearing tanks. Successive sieving operations were performed in the same way. Each time, the largest individuals were transferred to the settlement raceways and the smaller individuals were returned to the larval rearing tanks. PVC boards were used as collectors. After settlement, the collectors were maintained vertically in 800 l tanks with *Skeletonema costatum* enriched sea water.

In the second and the third experiments, larvae were settled on cultch (Walne, 1974).

DNA extraction

Samples were preserved in 100 % ethanol. For large sized oysters, DNA extractions were performed by Phenol/Chloroform method. For larvae, because of the small amounts of tissue that were available, a Chelex-based extraction method was used (Bierne *et al.*, 1998).

Microsatellite analysis

Four microsatellite loci were used to assess parentage. Three of these markers (Cg108, Cg49 and Cg44) are described by Magoulas *et al.* (in press). The forth one (Di10Cg) was developed more recently in the Laboratoire Génome et Populations (UPR 9060 CNRS, Université de Montpellier II, France). All have a dinucleotidic pattern.

Radioactive PCR amplifications were carried out in 15 μl of a mixture containing 4 μl of DNA, 1.5 μl of TAQ buffer 10X, 1.5 μl of dNTPs, 0.21 μl of R-primer, 1 μl of F-primer labelled with radioactive isotope, 1.8 μl 1.2 μl or 0.6 μl of MgCl_2 according to microsatellite

marker, 0.05µl of TAQ and qsp H₂O 15µl. Radioactive labelling was made with $\gamma^{33}\text{P}$ and carried out in a mixture of 1µl containing 0.23µl of F-primer, 0.1µl of kinase buffer 10X, 0.06µl of kinase, 0.1µl of $\gamma^{33}\text{P}$ and 0.51µl of H₂O. This mix was heated up to 37°C for 30 minutes and added to the PCR mix.

After a denaturing step of 2 min at 94°, samples were processed through 30 cycles consisting of 1 min at 94°, 1 min at an optimal annealing temperature and 1 min 15 sec at 72°. The last elongation step was lengthened to 5 min. Then, 8 µl of loading buffer (25 ml formamide, 0.025g xylene cyanol, 0.025g bromophenol blue and 1 ml EDTA 0.5M) was added to each PCR product. The mixture was heated for 5 min at 94° and aliquots of 3.6 µl were electrophoresed on 8% denaturing polyacrylamide gels. Gels were run for 2-5 hours at 50W (voltage and intensity were set up non-restrictive conditions, 1900 V and 150 mA respectively), dried and exposed to film for 6-48 hr.

Results

First Experiment

In the first experiment, polymorphic microsatellite loci were used in order to identify parentage in the progeny of a factorial cross between 20 males and 20 females. The 400 bi-parental crosses were mixed together 3 hours after fertilisation. The first pediveligera and larvae larger than 280 µm appeared 17 days after fertilisation. The sieving operations were performed 17, 20, 23 and 26 days after fertilisation and led to the separation of 4 sieving groups, numbered 1, 2, 3 and 4 respectively.

Sampling was performed 45 days after fertilisation. The 40 parents and 197 spat were analysed using one locus (cg44). 28 alleles were observed among the 40 parents. Male and female parents were determined for 54 and 62 offspring respectively (Table 1) and 19 spat were unambiguously assigned to a single bi-parental family.

Table 1: Number of offspring unambiguously assigned to a single male or a single female parent in each sieving group of the "20 x 20" cross.

Males (genotype)	Sieving group				Total	Females (genotype)	Sieving group				Total
	1	2	3	4			1	2	3	4	
B1m (16/16)		2			2	B1f (25/43)					
B2m (29/29)						B2f (2/47)					
B3m (37/37)						B3f (2/46)					
B4m (30/34)						B4f (24/42)	3	1		3	7
B5m (30/30)						B5f (32/34)	3	5	14	6	28
J1m (40/40)		1	1	4	6	J1f (30/38)	4	6	3	7	20
J2m (32/36)	1		2		3	J2f (29/47)					
J3m (26/26)		1	2	2	5	J3f (19/19)					
J4m (2/24)	3	2	3	6	14	J4f (40/37)		1	1	3	5
J5m (48/48)	2			2	4	J5f (39/39)					
M1m (28/28)			2	1	3	M1f (24/24)					
M2m (29/29)						M2f (46/46)					
M3m (19/32)						M3f (14/39)				2	2
M4m (21/21)						M4f (34/34)					
M5m (34/41)						M5f (35/35)					
V1m (17/20)	1	1		2	4	V1f (29/29)					
V2m (32/39)						V2f (20/20)					
V3m (14/14)				2	2	V3f (20/20)					
V4m (34/37)						V4f (33/33)					
V5m (34/46)	4	5	1	1	11	V5f (33/33)					
Total	11	12	11	20	54	Total	10	13	18	21	62

Second experiment

In the second experiment, polymorphic microsatellite loci were used in order to identify parentage in 3 samples of 50 10-month old individuals, obtained by 3 "5 x 5" factorial crosses (A, B and C). The offspring of each bi-parental cross were mixed together after fertilisation, so the trace of parentage was lost. For the parentage identification, we utilised three loci, Cg108, Cg49 and Di10Cg, showing 32, 25 and 25 alleles respectively in the 30 parents. The results of the parentage analyses are summarised in Table 2.

In cross A, the parents were identified for 50/50 individuals. One animal out of the fifty analysed was proven not to be an offspring of any of the A cross, but an offspring of a family from the B cross. We classed this animal as a "contaminant". In this sample, a high frequency of a "null allele" for locus Di10Cg was observed in the progeny of a single female (A9), heterozygous at this locus. The assignment of these offspring to this mother was verified by the analysis based on the two other loci (Cg108 and Cg49). After parentage identification on the basis of these two loci had been done, we observed that the female J4 had produced 17 of the offspring in our sample.

In cross B, the parentage of all but one individual (49/50) has been unambiguously determined. One of these 49 animals with unambiguous parentage determination is a contaminant produced by the A cross.

In cross C, Parents have been identified for 47/50 individuals. No contaminants were found. For the three other specimens, the mother has been identified, but the father could be either of two possible males. These three animals were only typed for two loci.

Table 2: Number of offspring per family in the 3 "5 x 5" crosses and χ^2 heterogeneity tests.

CROSS A		Males					Total	Heterogeneity test between	
Females	A1	A2	A3	A4	A5			males	females
A6	1	2	3	2	3	11		NS	***
A7	1	2	3	6	8	20			
A8	0	0	0	0	0	0			
A9	4	3	4	1	5	17			
A10	0	0	0	0	1	1			
Total	6	7	10	9	17	49			
CROSS B		Males					Total	Heterogeneity test between	
Females	B1	B2	B3	B4	B5			males	females
B6	1	6	0	0	0	7		***	***
B7	0	1	2	0	0	3			
B8	0	1	0	0	0	1			
B9	1	6	1	1	1	10			
B10	5	17	0	4	1	27			
Total	7	31	3	5	2	48			
CROSS C		Males					Total	Heterogeneity test between	
Females	C1	C2	C3	C4	C5			males	females
C6	0	0	2	0	1	3		***	**
C7	0	2	12	0	2	16			
C8	0	0	3	0	0	3			
C9	1	0	11	0	2	14			
C10	2	1	7	0	1	11			
Total	3	3	35	0	6	47			

***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, NS: not significant

The observed numbers of offspring per parent (male or female) are significantly different between parents in the 3 crosses (except among males in the cross A).

We compared the early embryonic development, recorded 3 hours after fertilization, and the parental contributions in the spat using the Spearman's rank correlation coefficient method. None of the coefficients are significant but the coefficients are rather high for females in the cross A.

Table 3: Comparison between early embryonic development and parental contributions in the 3 "5 x 5" crosses.

Cross	Males		Females	
	Early embryonic development (%)	Parental contribution (%)	Early embryonic development (%)	Parental contribution (%)
A	77,2	12.2	79,6	06.1
	74,8	14.3	97,4	16.3
	75,8	20.4	26,6	00.0
	80,8	18.4	97,0	10.2
	80,6	34.7	88,6	02.0
Spearman's rank correlation coefficient	$r_s = 0.3$ ($p = 0.54$)		$r_s = 0.9$ ($p = 0.07$)	
B	87,8	14.6	70,4	14.6
	88,0	64.6	86,8	06.3
	87,4	06.3	75,6	02.1
	64,4	10.4	83,4	20.8
	84,8	04.2	96,2	56.3
Spearman's rank correlation coefficient	$r_s = 0.7$ ($p = 0.16$)		$r_s = 0.5$ ($p = 0.31$)	
C	94,8	06.4	84,4	06.4
	75,8	06.4	96,0	34.0
	91,0	74.5	96,2	06.4
	89,2	00.0	74,2	29.8
	75,4	12.8	75,4	23.4
Spearman's rank correlation coefficient	$r_s = -0.05$ ($p = 0.84$)		$r_s = -0.31$ ($p = 0.68$)	

Third experiment

In the third experiment, microsatellite analysis of 6-day and 18-day old larvae was performed on a single locus (Di10Cg). Parentage analysis was made easier as the 10 parental oysters involved were initially chosen to carry different alleles and to be heterozygote (i.e. 20 alleles segregating in the progeny).

Gametic competition during in vitro fertilisation was assessed by comparing two crosses :

- Cross D: 5 males x 5 females = 25 separate crosses mixed together after 3h,
- Cross D': gametes of the 5 males and the 5 females were first mixed within each gender and then mixed together.

The male contributions were found to be significantly different between the two crosses ($p=0.026$) but the female contributions were not ($p=0.51$).

Change of parental contributions over time during the larval stage was assessed by comparing larvae sampled 6 and 18 days after fertilisation in cross D. Male contributions are significantly different between these two samples ($p=0.012$) but female contributions are not ($p=0.93$).

Table 4: Male and Female contributions in the crosses D (25 separate crosses) and D' (pooled gametes) at day 6 (D and D') and day 18 (D).

CROSS D Day 6		Females					Contribution (%)	χ^2 heterogeneity test between	
Males	D1	D2	D3	D4	D5	males		females	
D6	18	10	8	9	25	0.257	NS	NS	
D7	9	13	11	8	19	0.221			
D8	8	8	3	10	14	0.158			
D9	11	17	4	5	21	0.213			
D10	10	13	7	6	5	0.151			
Contribution (%)	0.205	0.224	0.121	0.139	0.308	1			
CROSS D' Day 6		Females					Contribution (%)	χ^2 heterogeneity test between	
Males	D1	D2	D3	D4	D5	males		females	
D6	4	1	3	0	26	0.137	*	**	
D7	7	8	5	5	21	0.185			
D8	4	14	2	9	11	0.161			
D9	19	21	20	4	31	0.382			
D10	5	9	6	6	8	0.137			
Contribution (%)	0.157	0.213	0.145	0.096	0.390	1			
CROSS D Day 18		Females					Contribution (%)	χ^2 heterogeneity test between	
Males	D1	D2	D3	D4	D5	males		females	
D6	25	20	17	19	56	0.343	**	NS (p = 0.06)	
D7	4	12	4	5	16	0.103			
D8	8	11	10	8	17	0.135			
D9	20	22	17	6	22	0.218			
D10	19	17	12	17	15	0.201			
Total	0.19	0.205	0.150	0.138	0.316	1			

*: p <0.05, ** p<0.01, NS: not significant

*: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS: not significant

Discussion

Most papers dealing with parentage analysis report results concerning the following question : "Who are the parents of that offspring ?".

In some cases, a probabilistic approach is developed (e.g. Alford *et al.*, 1994) as it is not possible to unambiguously distinguish all possible parents, due to limited polymorphism in the potential parents. Such results can be of great use in mass selection breeding programs, in order to minimise inbreeding. In other cases, polymorphism is high enough to differentiate all possible parents and therefore assign each offspring unambiguously to its parents.

When parentage analysis is possible, genetic study of quantitative characters can be performed on the progeny reared in a common environment (e.g. Batargias *et al.* in Magoulas, 1998). These studies also enable the quantification of the contribution of each parent to the following generation, and subsequently makes possible the identification of the factors that influence these contributions.

Parentage analysis

When parents are chosen randomly, parentage analysis in the progeny is mostly dependent on polymorphism and the number of loci scored. If, at a given locus, an allele is carried by a single potential parent, then it can be used directly to assign any offspring carrying that allele to that parent. So the rarer an allele is, the more informative it is. In our

first experiment, a quarter of the studied progeny could be assigned to a given parent using only one locus, showing 28 alleles over the 40 parents. In our second experiment, 3 loci were scored and 100 % of the progeny could be assigned to one of the 25 full-sib families. In our three crosses, only 4, 18 and 32 % of the studied progeny required the combination of 2 loci to determine parentage. This efficiency is mostly due to the high polymorphism of the markers used: 11 to 18 alleles per locus segregating in each "5 x 5" cross, and more than 50 alleles per locus in the wild (Huvet *et al.*, in prep).

Why unbalanced parental contributions ?

Our results clearly demonstrate that parental contribution in the studied progenies are unbalanced, despite the care taken to balance gametic contributions between males and between females at the fertilisation stage. Three main factors can be distinguished to explain such unbalanced contributions.

The quality of the gametes can be different between parents when crosses are performed. These differences could be due to differences in the timing of maturation between parents (some oysters being ready to spawn earlier than others despite the common pre-conditioning and conditioning periods) or other environmentally induced differences. These differences are commonly known as "maternal effects" (and similarly paternal effects could also exist). In order to assess the quality of the gametes, we have compared early embryonic developments (3h after fertilisation) with parental contributions recorded (second experiment). No significant relationships were found with parental contribution, but this might be due to the limited number of parents involved in these crosses. Nevertheless, it can be noted that one of the female parents which had a very low mean early embryonic development percentage (26.6 %) has a parental contribution equal to 0 (Table 3). Pre-fertilisation methods should be developed in order to assess the potential importance of gamete quality in unbalanced parental contributions.

Non random mating can also explain unbalanced parental contributions. In the case of controlled in vitro fertilisation (with balanced pre-fertilisation gametic contribution), gametic competition can occur. In our third experiment, we compared parental contribution between each gender with and without gametic competition (crosses D' and D respectively). Our results show that male contributions are significantly different but that female contributions are not. As male contributions are not significantly unbalanced in cross D but they do in cross D', this is likely to be due to competition between spermatozoa in cross D'.

The third main reason for unbalanced parental contribution is zygotic competition and differential viability between families. In this case, parental contributions might change over time as mortalities occur. In our third experiment we show that parental contributions are significantly different between day 6 and day 18. This demonstrates that some selection occurred during the larval stage, favouring the progeny of some parents over others. The analysis of samples at later stages (namely after settlement) should bring new insights about selective processes before and after metamorphosis.

Acknowledgements

This research was supported by the EU contract FAIR PL. 95.421. We thank J.-P. Baud, S. Heurtebise, C. Ledu, M. Nourry and P. Phélipot for technical assistance in hatchery and nursery work. We thank H.R. McCombie and S. Hubert for helpful comments on this manuscript.

References

- Alford R.L., Hammond H.A., Coto I., Caskey C.T. (1994). Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *American Journal of Human Genetics* 55:190-195.
- Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y., Bonhomme F. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* 148:1893-
- Colbourne J.K., Neff B.D., Wright J.M., Gross M.R. (1996). DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 342-349.
- Ferguson, A., Taggart J.B., Prodohl P.A., McMeel O., Thompson C., Stone C., McGinnity P., Hynes R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology* 47(Suppl. A): 103-126.
- Harris A.S., Bieger S., Doyle R.W., Wright, J.M. (1991). DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. *Aquaculture* 92(2-3): 157-163.
- Garcia de Leon F.G., 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(3-4): 303-316.
- Gérard A., Naciri Y., Peignon J.M., Ledu C., Phelipot P. (1994) Optimization of triploid induction by the use of 6-DMZAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture and Fisheries Management* 25: 709-719.
- 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, pp. 122-134.
- Herbinger C.M., Doyle R.W., Pitman E.R., Paquet D., Mesa K.A., Morris D.B., Wright, J.M., Cook D. (1996a). DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* 137(1-4): 245-256.
- Herbinger CM, Doyle R.W., Taggart C.T., Lochmann S.E., Brooker A.L., Wright J.M., Cook D. (1996b). Family relationships and effective population size in a natural cohort of cod larvae. *Canadian journal of Fish and Aquatic Science* 54 (Suppl. 1) 11-18.
- Kellog K.A., Markert J.A., Stauffer J.R., Kocher T.D. (1995). Microsatellite variation demonstrate multiple paternity in lekking cichlid fish from lake Malawi, Africa. *Proceedings of the Royal Society, London* 260B: 79-84.
- Kincaid H.L. (1976). Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board, Canada* 33: 2420-2426.
- Magoulas A. (1998). Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA. *Proceeding of the Seminar Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM)*. Zaragossa, Spain, April 28-30, 1997. pp 153-168.
- Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V., Zouros E. Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics*, in press.
- Walne, P.R., (ed) 1974. *Culture of bivalve molluscs: fifty years experience at Conwy*, Whitefriars Press Ltd, London.

Annexe 5: Article accepté dans *Aquaculture*

Relationship between pre- and post-metamorphic growth in the Pacific oyster

***Crassostrea gigas* (Thunberg)**

Bertrand Collet, Pierre Boudry¹, Anne Thebault, Serge Heurtebise, Bérénice

Morand and André Gérard.

IFREMER G.A.P. Génétique, Aquaculture et Pathologie, BP 133 La Tremblade, France

Corresponding author. Email address: pboudry@ifremer.fr

phone number: (+33) 5 46 36 98 44 fax number: (+33) 5 46 36 37 51

Abstract

Twenty male and 20 female parental oysters, originated from 4 sites located along the French Atlantic coast, were crossed together. The 400 crosses were performed separately and then pooled to give a batch of larvae with a large genetic basis. Successive sieving after 17 days at 23 °C enabled the separation of the largest larvae from the batch. These larvae (i.e. sieving groups) were left to metamorphose onto flat PVC collectors changed daily. Four groups of larvae representing distinctly different growth rates were successively separated during the attachment and metamorphosis of the whole population which lasted 12 days, from the 17th day to the 29th after fertilisation. A part of each sieving group was settled separately as replicates on cultch. Weekly, the post metamorphic height was recorded individually on 100 oysters per sieving group generating 400 growth curves. The oysters were removed from the collectors and weighed twice. The effect of the date of settlement (i.e. developmental rate) and sieving group (i.e. larval growth rate) affected significantly ($P < 0.0001$) the spat growth rate. The correlation between sieving groups (i.e. larval growth) and spat growth rate was positive. After 11 months of growth under intensive conditions, the sieving group still had a significant effect on the total weight of juveniles settled on cultch ($P < 0.0001$). These results justify the size-grading of larvae in bivalves hatcheries and show the great importance of early growth on the later stage growth in *Crassostrea gigas*.

Keywords: Growth; *Crassostrea gigas*; metamorphosis; settlement

1. Introduction

In many marine invertebrates, metamorphosis involves the change from a free-living, planktonic life to a relatively sedentary, benthic one. An important physiological alteration occurs during metamorphosis (Baker and Mann, 1994) so that larval growth may involve very different mechanisms compared to juvenile growth. In order to investigate the implications of metamorphosis on juvenile growth, some experiments have been carried out in which the length of the larval period or the nutritional condition of the larvae was altered in some invertebrate species and the effects on subsequent juvenile growth studied (Balanus amphitrite, Pechenik et al., 1993; Crepidula plana and C. fornicata Pechenik and Eyster, 1989). These studies showed that a delayed metamorphosis affects juvenile growth in Balanus amphitrite but not in Crepidula fornicata. Other studies have been performed in order to focus on possible genetic correlation between larval and post-metamorphic growth but the results published to date are inconsistent. A positive relationship between larval and spat growth was found in Crassostrea virginica (Losee, 1979; Newkirk et al., 1977). Newkirk and Haley (1982) reported a lack of correlation between height of larval period (and larval size) and size of juvenile and adult European oysters, Ostrea edulis. Furthermore, Hilbish et al. (1993) found no significant genetic correlation between growth of 10-day-old larvae and 9-month-old juveniles in Mercenaria mercenaria. Heffernan et al. (1991) showed that selecting for faster growth in adult Mercenaria mercenaria leads to slower larval growth. No substantial relationship between larval and juvenile growth was found in Crepidula fornicata (Pechenik et al., 1996).

Larval and juvenile growth rates are very variable among individuals and appear to be heritable (Mytilus edulis: Mallet et al., 1986; Strömngren and Nielsen, 1989; Mercenaria

mercenaria: Rawson and Hilbish, 1990; Hadley et al., 1991; Hilbish et al., 1993). In this context, a correlation between larval and post-larval growth would be of great interest for selective breeding. Moreover, in bivalve hatcheries, the most common practice is the systematic culling of the smallest larvae in order to reduce the time of larval rearing and to reduce size variability (Bardach et al., 1972). However, the effect of this sieving operation on post-metamorphic growth is still unknown, since the relationship between larval and juvenile growth remains unclear.

In the present study, a batch of larvae of the Pacific oyster Crassostrea gigas was obtained under laboratory conditions. Successive sieving enabled the separation of the largest larvae from the batch. These larvae were left to settle on collectors which were changed daily. In this way, the temporal distribution of the settlement of the batch after sieving as a whole was maximised. This experiment aimed to establish a relationship between larval growth, as measured by the length of their larval life, and early post-settlement growth.

2. Material and methods

Crosses

In order to build a population with a large genetic base, 40 parental oysters originating from 4 sites located along the French Atlantic coast were crossed in the IFREMER hatchery in La Tremblade (Charente maritime, France). In order to ensure an equal gametic contribution of each parent, 400 factorial crosses were performed separately with 40 parents: 20 males crossed with 20 females (5 males and 5 females per population). Spermatozooids were collected first, by stripping the male gonad. The sperm was diluted with 1 μ m filtered sea water, its concentration was estimated using Thoma slides coupled to an image processing

system (Alcatel), and it was stored at 4°C. Oocytes of the female were then collected using the same procedure and numbered using Malassez slides. For each female, 3,000,000 oocytes were distributed in each fertilisation beaker and fertilised separately by each male at a ratio of 100 spermatozoa per oocyte. Four hundred in vitro fertilisations were performed separately by this method and all the fertilised oocytes were pooled together 3 hours after fertilisation. The mean percentage of embryos developed was 87.6%. Larvae were reared in 4 GRP (Glass Reinforced Polyester) 300 litres tanks filled with 1 µm filtered sea water (temperature 23°C and salinity 28‰) and were fed Isochrysis galbana and Extubocellulus criberiger. The total amount of algae provided was 60 cells.µl⁻¹. This concentration was in excess (Nascimento, 1980) to avoid competition for food between larvae and to maximise phenotypic variability. Larval concentration at day 1 was 13 larvae.ml⁻¹ and was progressively reduced down to 1 larva.ml⁻¹ at day 17, by discarding a part of the population without any selective sieving.

Sieving groups

Every 48 hours, all the larvae were collected by sieving and a sample was counted (Cell counter) and measured (Profile projector, Nikon). When the first pediveliger larvae appeared, the largest larvae (height greater than 280 µm) were retained after sieving on a 200 µm-mesh and left to settle. The remaining larval population was kept in the larval rearing tanks. Successive sieving operations were performed in the same way. Each time, the largest individuals were transferred to the settlement raceways and the smaller individuals were returned to the larval rearing tanks. Thus, sieving group (SG) 1 corresponds to the fastest-growing larvae and sieving group 4 to the slowest-growing larvae.

Settlement procedure

PVC boards, covered with a layer of wax and a second layer of polyester resin were used as collectors. The wax layer allows easy removal of the oysters from the collector at a very early stage without damaging them, while the resin layer is a good substrate for attachments and metamorphosis of the animals. At each sieving operation, the larvae were split between the PVC sheet collector raceway and a cultch tank in order to have a large reserve of animals of the 4 sieving groups. The PVC collector system consisted of four 37.5 x 50 cm boards per raceway with 26°C and 10 µm-filtered sea water automatically aerated for 15 min every 2 hours. A sample of larvae was taken from the first settlement raceway every day and examined and numbered. The collectors were then replaced for a new day of settlement. For each sieving group but the first there was a variable number of days of settlement. After attachment and metamorphosis, the collectors were maintained vertically in 800 litre tanks with Skeletonema costatum enriched sea water.

Growth recording

A large proportion of the animals were removed from the boards at random to reduce competition for space: for each pair of overlapping individuals, the biggest and the smallest was alternatively discarded. Therefore, no competition for space occurred among the remaining oysters. Out of these animals, 100 were chosen at random from each sieving group and individually identified by writing the number directly on the board, near the hinge of the oyster. The height from the hinge to the edge of the upper valve was recorded 4 times, weekly with a digital calliper to an accuracy of 0.01 mm. The last measurement occurred 58 days after fertilisation when all the animals were removed from the boards, labelled and then weighed with a precision of 0.1 g. The overall spat growth rate (GR, g.d⁻¹) was calculated by dividing

this weight by the time of spat growth (number of days after settlement). The date of attachment and metamorphosis is noted DSET.

The sieving groups obtained by the cultch rearing method were transferred to the IFREMER nursery in Bouin (Vendée, France) and reared under the same food and density conditions. 100 animals per sieving group were weighed 11 months after fertilisation.

Data analysis

The overall spat growth rate (GR) was analysed using the following model:

$$GR = \alpha.SG + \beta.DSET + \epsilon$$

The effect of SG and DSET on GR were tested by analysis of variance using SAS software (SAS Institute, 1988), with SG and DSET respectively fixed effect factor and random effect factor nested within SG. The effect of sieving date (SG) on the spat growth rate and the live weight at 11 months were also analysed by analyse of the variance. The initial weight of larvae at settlement and the difference between groups is supposed to be insignificant. Multiple comparisons was performed using the Student-Newman-Keuls' test.

3. Results

Larval rearing

The total number of larvae obtained at day 1 was 16,240,000. After progressive adjustment of concentration, this number was reduced to 1,134,000 at day 17. Average larval growth curve followed an exponential pattern (Figure 1). The mean larval height before sieving at day 17 was $271.7 \pm 51.0 \mu\text{m}$ giving a coefficient of variation of 18.8 %. The

coefficient of variation increased from 3 % at day 1 to 9 % at day 6 and finally stabilised around 20 % from day 9 to day 17. The first pediveliger and larvae larger than 280 μm (minimum size for larvae retained on a 200 μm -mesh sieve) appeared at day 17. The sieving operations were performed 17, 20, 23 and 26 days after fertilisation and led to the separation of the sieving groups (SG) numbered 1, 2, 3 and 4 respectively. Mean larval height measured after sieving and mean larval growth rates is higher for the 1st sieving group and lower for the 4th sieving as shown in Table 1. The larvae were allowed to settle for periods lasting 1, 4, 2 and 4 days, respectively, for the sieving groups 1, 2, 3 and 4. No larvae remained in the settlement tank at the end of the settlement period in any of the sieving groups.

Spat growth

The coefficient of variation of spat height ranged from 18.8 % to 43.8 % for the whole population between days 37 and day 58 after fertilisation. No spat died between the first day and the last day of measurement. The raceways did not affect significantly the post-metamorphic growth rates (data not shown).

Growth curves of the 4 sieving groups are given in terms of number of days after fertilisation (Figure 1) and number of days after settlement by using the 1st day of settlement of each sieving groups (Figure 2).

The overall spat growth increments were 49.89 ± 2.38 , 22.03 ± 1.36 , 18.58 ± 0.81 and $11.63 \pm 0.84 \text{ g.d}^{-1}$ respectively for the sieving groups SG1, SG2, SG3 and SG4. The model was significantly improved when SG and DSET were included over the simple factor models. The effect of SG (i.e. larval growth rate) on the spat growth rate is highly significant (Table 2). Day of settling (DSET) appears to be also significant. The correlation between the larval

growth rate (rank of the sieving group) and the spat growth rate is significant ($F = 283.0$ $P = 0.0001$, Figure 3).

The relationship between the total weight after removal of the oysters from the PVC collectors and the spat height on collectors gave mean R squared statistics equal to 0.52, 0.79, 0.78 and 0.83 respectively for sieving groups 1, 2, 3 and 4. The rank of the sieving group still affects the total weight very strongly, both on removal from the collectors ($P < 0.0001$) and 7 days after ($P < 0.0001$).

Juvenile growth

After 11 months of growth, the sieving groups obtained with the cultch method had a mean total weight of 21.6 ± 1.4 g, 18.7 ± 1.2 g, 18.3 ± 1.3 g and 12.1 ± 1.1 g for sieving groups 1, 2, 3 and 4 respectively. The rank of the sieving group significantly affects the final live weight at 11 months ($P < 0.0001$, Figure 4).

4. Discussion

The early spat growth rate is dependent on the date of settlement

In the present experiment, an effect of the date of metamorphosis (i.e. rate of development) and the date of sieving (i.e. rate of larval growth) on overall early spat growth rate was found in Crassostrea gigas when environmental conditions (temperature, salinity, amount and quality of food) were maintained as constant as possible during all the larval and post-larval stages. However, the experimental design makes the settling date nested within the sieving date and leads to the difficulty to analyse these factors separately.

Larval growth rate and spat growth rate were found to be effectively strongly

correlated in Crassostrea virginica (Newkirk et al., 1977) and slightly correlated in Crepidula fornicata (Pechenik et al., 1996). In the same way, the length of larval period (after release of the larvae by the brooding females) appears to be negatively correlated with the height at 5 months in Ostrea edulis (Newkirk and Haley, 1982), but in this analysis, the height itself was used as the growth parameter and was not corrected for the date of settlement. In the light of the present results, the effect of the larval period on the postsetting growth rate could be due to a difference in the growing time. The present work shows the importance of considering the date of settlement rather than the date of fertilisation for analysing growth kinetics, the best approach being to compute growth rates at least for the early spat stage. Losee (1979), showed a difference in the growth rate 29 weeks post-settlement between spat of Crassostrea virginica settled at different dates. However, the short delay between sieving groups wasn't taken into account and all the cohorts were weighed the same day. Three days in settlement distinguish Losee's setting groups and the difference in growth detected 29 weeks later is consistent with 3 days of early growth. A delay of 2 or 3 days in post metamorphic growth due to different date of settlement still has consequences several months after, because the speed of growth is very high at an early stage and decreases at later stages (Quayle, 1969), as show in the present study. Newkirk et al. (1977) obtained 4 settlement groups in Crassostrea virginica by changing the collectors every 2 days. The mean size of settlement groups was negatively correlated with the rank of the settlement group. Again, two days of post-metamorphic growth can easily explain the differences in size between settlement groups or at least the correlation observed between growth before and after settlement. Settlement groups of Ostrea edulis were obtained similarly by Newkirk and Haley (1982) and a correlation was found between the duration of the larval period and the size of 5-month-old spat. As shown on the growth kinetics in terms of time after fertilisation (Figure 1), this correlation can be explained by the growth delay

existing between settlement groups.

Pechenik et al. (1996) sorted Crepidula plana larvae into 3 groups of slow-growing, medium-growing and fast-growing individuals and measured them 3, 6 and 9 days after metamorphosis finding no significant differences in juvenile growth rates between the 3 groups. Furthermore, Hilbish et al., 1993, found no significant genetic correlation between growth of 10-day-old larvae and 9-month-old juveniles in Mercenaria mercenaria.

These inconsistencies in the results published may be partly explained by the use of different growth variables by the authors (absolute parameters and growth rates).

The final live weight at 11 months is different between sieving groups. This could be because the individuals did not have exactly the same amount of time to grow as spat. The delay in growth between sieving groups 1 and 4, corresponds roughly to 10 days of spat growth, 0.54 g at 66 days after fertilisation. If we consider this delay constant over time, it would give a difference at 11 months of 2.7 g between the 2 groups. However, the measured difference is 9.5 g, much higher than expected by the shorter growing time. This can be interpreted by the effect of the sieving group (i.e. rate of larval growth) discussed above, or to the delay in growth that get higher with time.

Does time of metamorphosis depend on the age or on the size of the larvae ?

For the 4 sieving groups, only larvae which had reached a height greater than 280 μm at a given date were left to attach and metamorphose. The coefficient of variation for larval height around 100 μm ranged between 8.5 % and 18.7 % from day 6 to 9, which is very high compared to the mean of 4.0 % obtained by Nascimento (1983) for larvae of a similar height. This is a consequence of the absence of selective conditions maintained throughout the larval

rearing (low larval densities and non limiting amount of food). Therefore, in this experiment, sieving group is a good indicator of the larval growth rate. Comparing the larval and spat growth rates using sieving groups based on the date of settlement (Newkirk et al., 1982) requires that the date of metamorphosis is dependent on size rather than age of the larvae. However, Pechenik and Heyman (1987) showed that the larvae do not become competent at a particular size in Crepidula. Pechenik et al. (1996) showed that larvae could become competent even when larval growth was halted by starvation. Pechenik et al. (1996) showed that the onset of metamorphic competence in Crepidula fornicata could be uncoupled from the process of growth, in that starved larvae did not grow at all but did slowly became competent to metamorphose. Coon et al. (1990) showed that competence of Crassostrea gigas larvae to settle occurred earlier than competence to metamorphose. Factors determining when metamorphosis occurs have been discussed many times. In the present work the larvae were left to settle in non-selective conditions of rearing, without any settlement inducers. At each sieving operation the smallest individuals were returned to the GRP larval tank where no settlement occurred in spite of the fact that GRP is a highly attractive substrate for settlement of C. gigas larvae (Holliday, 1996; personal observations). The larvae retained by the sieve (> 280 µm) settled quickly when placed onto the settlement board. These observations are consistent with a settlement dependent on size under these experimental conditions. Therefore, the hypothesis of a strong link between competence and larval size is supported. In the present study, the date of sieving affects the partial growth rate only at a very early stage (44 days after fertilisation). The experimental design led to an interaction between date of sieving and date of settlement and the effect of the date of sieving for later stage could not be studied.

New settlement methods for growth experiments

The advantage of settlement on flat collectors for the purpose of this experiment was that all the variability in size was kept and no competition for space or food occurred between individuals. Very high attachment and survival rates were obtained with a system using glass plates (Ostrea edulis, Rodriguez et al., 1992) and PVC slats (Crassostrea gigas and Crassostrea virginica, Hidu et al., 1981). PVC slats have also been used previously as a growing method after settlement (Smith et al., 1995). The growth appeared to be more efficient on this type of rearing system compared to cultch which is explained by the absence of spatial competition. On such a collecting surface, the growth is very homogeneous and is highly related to the total weight as observed on oysters settled on scallop shell (Haley and Newkirk, 1978). The high variability in size between the individuals just settled (a factor of between 3 and 4) shows that all the variability in size of spat is conserved and that both slow-growing and fast growing-spat have the same chance of reaching later stages.

Acknowledgements

This research was supported by the EU contract FAIR PL. 95.421. We thank C. Ledu and P. Phelipot for hatchery assistance; J.-P. Baud and M. Nourry for looking after the animals in the Bouin nursery; Y. Naciri-Graven and M. Héral for initiating this project; M. Barré for helpful discussions on data analyses. We thank C. Collins and H. McCombie for revising and helping with the translation of this manuscript.

References

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.

Bardach, J.E., Ryther, J.H., McLarney W.O., 1972. Aquaculture - the farming and husbandry of freshwater and marine organisms. Wiley Interscience, New York.

Coon, S.L., Fitt, W.K., Bonar, D.B., 1990. Competence and delay of metamorphosis in the pacific oyster Crassostrea gigas. Marine Biology 106, 379-387.

Hadley, N.H., Dillon, R.T., Manzi, J.J., 1991. Realised heritability of growth rate in the hard clam Mercenaria mercenaria. Aquaculture 93, 109-119.

Haley, L. E., Newkirk, G.F., 1978. Selecting oysters for faster growth. Proceedings of the World Mariculture Society 8, 557-564.

Heffernan, P.B., Walker, R.L., Crenshaw, J.W.J., 1991. Negative larval response to selection for increased growth rate in northern quahogs Mercenaria mercenaria (Linnaeus, 1758). Journal of Shellfish Research 10, 199-202.

Hidu, H., Conary, C., Chapman, S.R., 1981. Suspended culture of oysters - biological fouling control. Aquaculture 22, 189-192.

Hilbish, T.J., Winn, E.P., Rawson, P.D., 1993. Genetic variation and covariation during larval and juvenile growth in Mercenaria mercenaria. Marine Biology 115, 97-104.

Holliday, J.E., 1996. Effects of surface orientation and slurry coating on settlement of Sydney rock, Saccostrea commercialis, oysters on PVC slats in a hatchery. Aquaculture Engineering 15, 159-168.

Losee E., 1979. Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (Crassostrea

virginica). Aquaculture 16, 123-126.

Mallet, A.L., Freeman, F.R., Dickie, L.M., 1986. The Genetics of Production Characters in the Blue Mussel Mytilus edulis. I.A Preliminary Analysis. Aquaculture 57, 133-140.

Nascimento, I., 1983. Growth of the larvae of Crassostrea gigas Thunberg, fed with different algal species at high cell concentrations. Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer 39, 134-139.

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.

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.

Pechenik, J.A., Eyster, L.S., 1989. Influence of delayed metamorphosis on the growth and metabolism of young Crepidula fornicata (Gastropoda) juveniles. Biological Bulletin 176, 14-24.

Pechenik, J.A., Heyman, W.D., 1987. Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod Crepidula fornicata. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 112, 27-38.

Pechenik, J.A., Hammer, K., Weiss, C., 1996. The effect of starvation on acquisition of competence and postmetamorphic performance in the marine prosobranch gastropod Crepidula fornicata. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 199, 137-152.

- Pechenik, J.A., Rittschof, D., Schmidt A.R., 1993. Influence of delayed metamorphosis on survival and growth of juvenile barnacles Balanus amphitrite. *Marine Biology* 115, 287-294.
- Pechenik, J.A., Hilbish, T.J., Eyster, L.S., Marshall D., 1996. Relationship between larval and juvenile growth rates in two marine gastropods, Crepidula plana and C. fornicata. *Marine Biology* 125, 119-127.
- Quayle, D.B., 1969. Pacific oyster culture in British Columbia, Bulletin 169 of the Fisheries Research Board of Canada.
- Rodriguez, W., Espinos, F.J., Otero F., Silveiro N., 1992. Description of a highly efficient system for Ostrea edulis L. larval settlement. *Actes de colloques IFREMER* 14, 89-92.
- Rawson, P.D., Hilbish, T.J., 1990. Heritability of juvenile growth for the hard clam Mercenaria mercenaria. *Marine Biology* 105, 429-436.
- SAS Institute Inc., 1988. SAS/STAT User's Guide, Release 6.11, SAS Institute Inc.
- Smith, I.R., Sheridan, A.K., Nell J.A., 1995. Evaluation of growing methods for use in a Sydney rock oyster Saccostrea commercialis (Iredale and Roughley) selective breeding program. *Aquaculture* 131, 189-195.
- Strömngren, T., Nielsen, M., 1989. Heritability of growth in larvae and juveniles of Mytilus edulis. *Aquaculture* 80, 1-6.

Tables

Table 1: Growth parameters for the larvae in *Crassostrea gigas*. SG = sieving group, sieving date and settling dates are given in days after fertilisation, H = mean height after sieving on a 200 μm -mesh sieve to retain larvae larger than 280 μm (mean \pm s.e.), LGR = mean overall larval growth rate (mean \pm s.e.).

SG	Sieving	Settlement	H (μm)	LGR ($\mu\text{m.d}^{-1}$)
1	17	17	314.7 \pm 3.4	18.7 \pm 3.0
2	20	20, 21, 22, 23	328.2 \pm 3.1	16.5 \pm 2.6
3	23	23, 24	331.6 \pm 3.5	14.5 \pm 2.3
4	26	26, 27, 28, 29	340.6 \pm 3.8	13.1 \pm 2.1

Table 2: A. Results of MIXED model testing the effect of sieving group (SG) and the date of attachment and metamorphosis (DSET, nested within SG) the overall growth rate in *Crassostrea gigas*. DSET and SG are treated as, respectively, a random and fixed effect factors; Student-Newman-Keuls grouping distinguishes groups different with a 5 % risk. All data: $n = 363$. B. Results of the Student-Newman-Keuls grouping procedure. Groups with different letters are different at 0.05 level.

SG	DSET(SG)	Mean \pm s.e.	n	SNK Groups	
1	17	0.48 \pm 0.02	99	-	A
2	20	0.52 \pm 0.06	29	A	-
	21	0.45 \pm 0.07	29	B	-
	22	0.40 \pm 0.04	29	BC	-
	23	0.42 \pm 0.08	9	C	-
2	All	0.45 \pm 0.03	96	-	B
3	23	0.35 \pm 0.03	50	A	-
	24	0.37 \pm 0.03	49	B	-
3	All	0.36 \pm 0.02	99	-	B
4	26	0.30 \pm 0.03	31	A	-
	27	0.27 \pm 0.03	25	B	-
	28	0.25 \pm 0.04	23	C	-
	29	0.25 \pm 0.04	8	BC	-
4	All	0.28 \pm 0.02	87	-	C
All	All	0.40 \pm 0.01	381	-	-

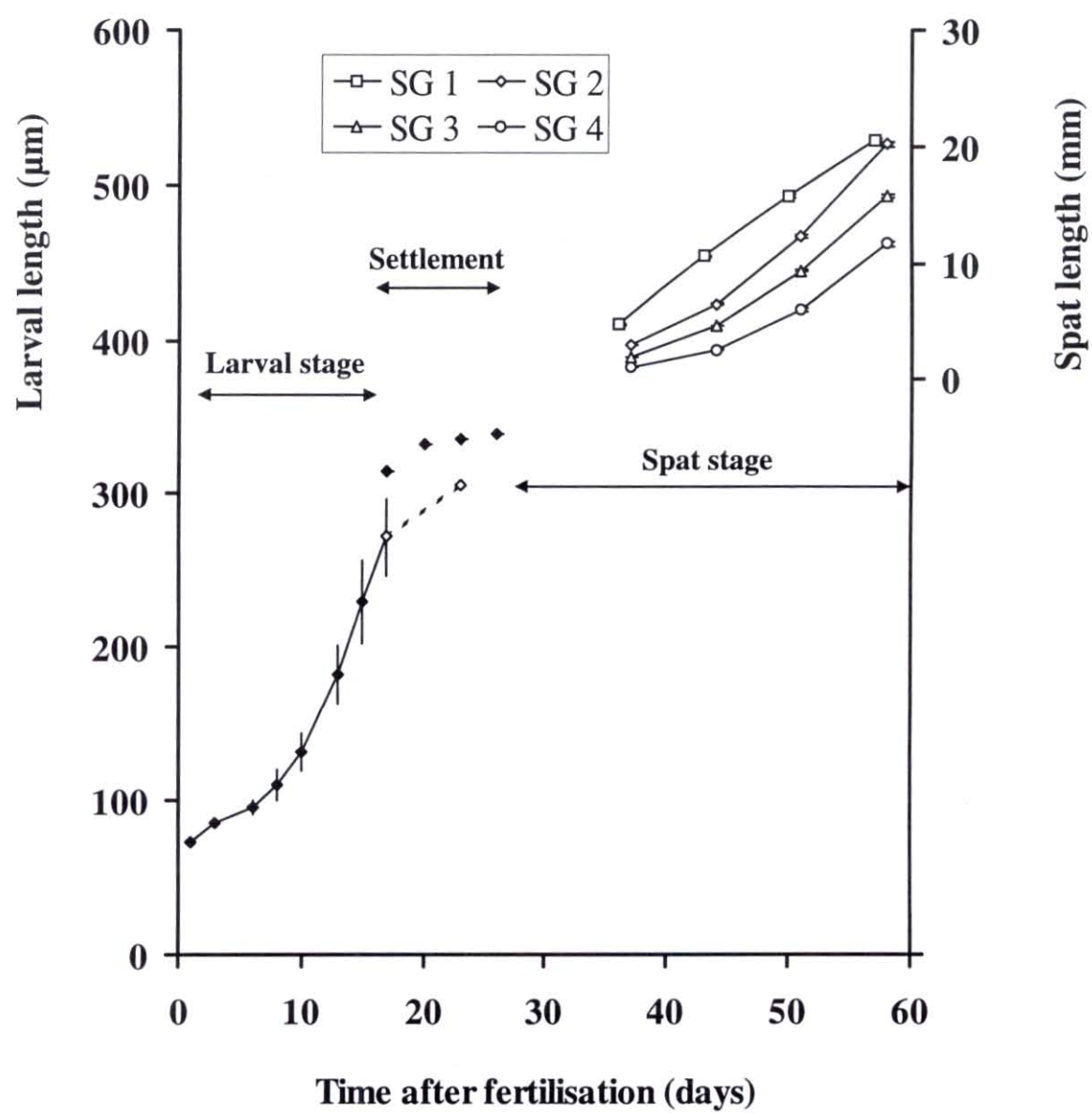
Figure legends

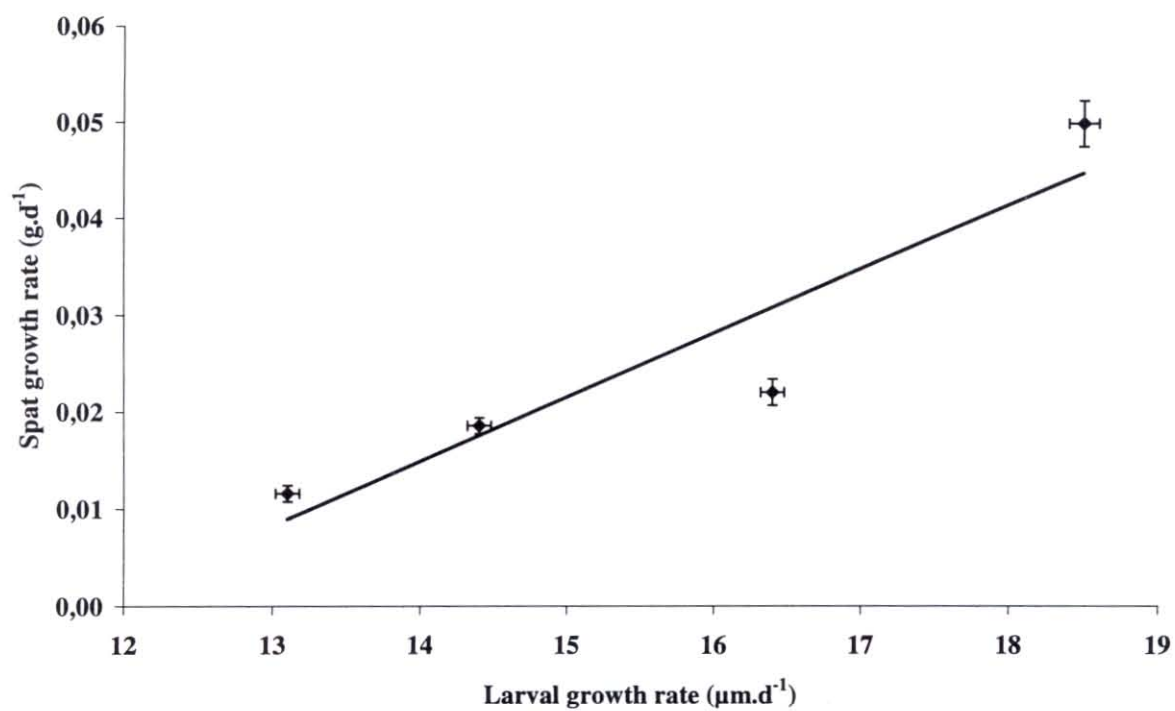
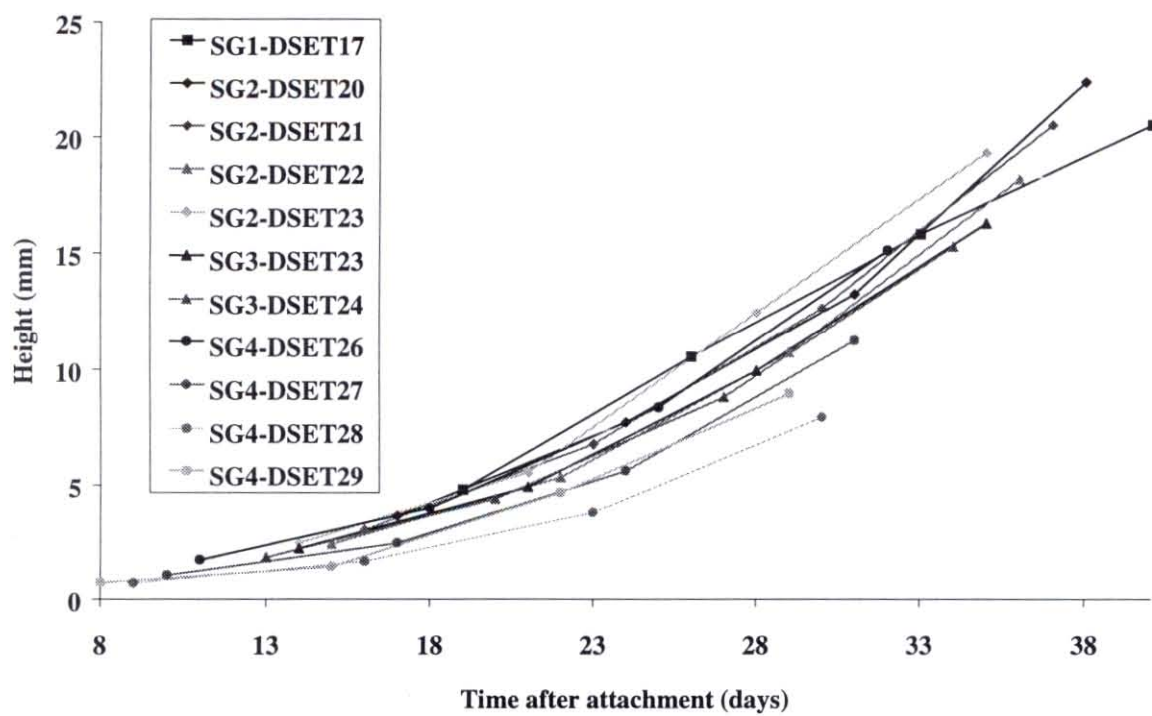
Figure 1: Growth and kinetics at larval and spat stages in Crassostrea gigas. Larvae were all reared together (0 to 17 days post fertilisation). Four sieving operations and attachment on boards led to 4 sieving groups (SG) attached and metamorphosed from 17 to 29 days after fertilisation and recorded for growth 4 times after settlement. SG1 represents the fastest growing larvae, SG4 represents the slowest growing larvae. Data are mean \pm s.e.

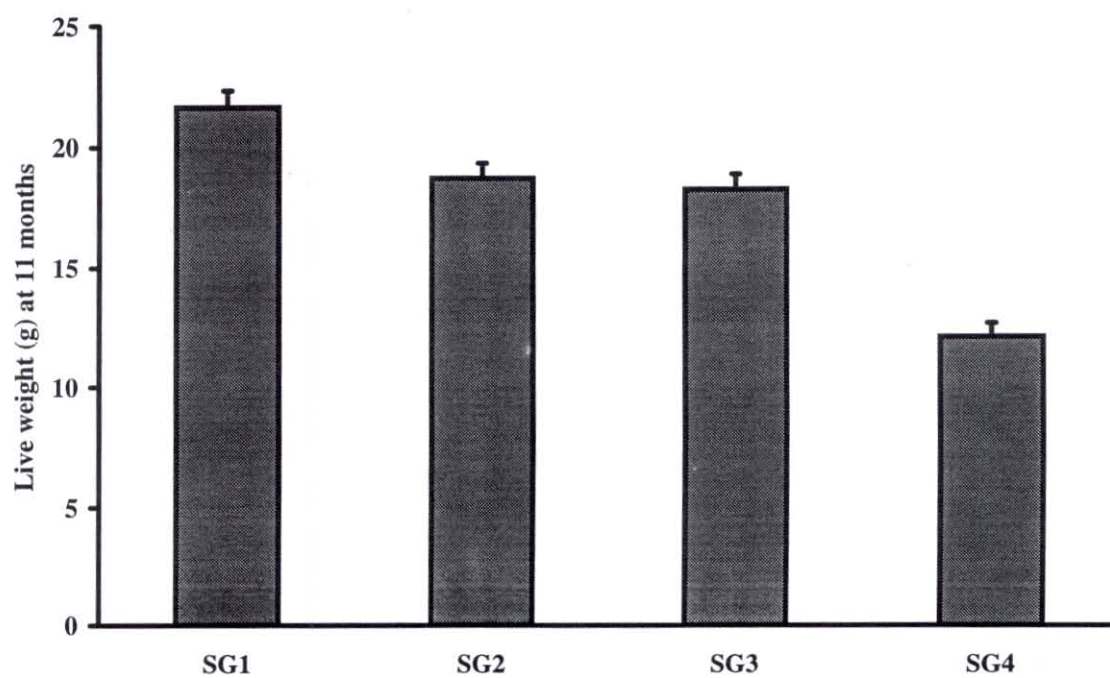
Figure 2: Spat growth curves of the sieving groups in terms of date after metamorphosis in Crassostrea gigas. Data are mean \pm s.e., $n = 363$.

Figure 3: Relation between larval growth rate and spat growth rate in Crassostrea gigas. Data are mean \pm s.e.

Figure 4: Juvenile total weight (g) at 11 months of the 4 sieving group (SG) in Crassostrea gigas. SG1 represents the fastest growing larvae, SG4 represents the slowest growing larvae. Data are mean \pm s.e., $n = 100$ per SG.





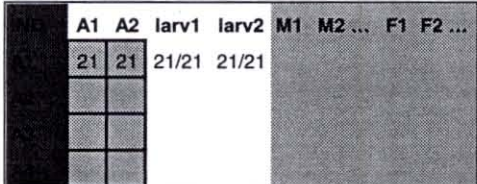


Annexe 6: Macro Visual BasicProgramme de recherche de parenté à l'aide d'un locus microsatellite:1. Construction du fichier des génotypes possibles à partir des génotypes des parents

```

Sub Saisie_Matrice()
    Dim line1, line2, Subscript
    line1 = 1
    line2 = 1
    Do While line1 < 21
        Sheets("CG44").Select
        Range(Cells(line1 + 1, 3), Cells(line1 + 1, 4)).Select
        Selection.Copy
        Sheets("DataSet").Select
        Subscript = 1
        line2 = 20 * (line1 - 1) + 2
        Do While Subscript < 21
            Cells(line2 + Subscript - 1, 4).Select
            Selection.PasteSpecial Paste:=xlValues, Operation:=_xlNone, SkipBlanks:=False, Transpose:=False
            Subscript = Subscript + 1
        Loop
        line1 = line1 + 1
    Loop
    Sheets("CG44").Select
    Range(Cells(22, 3), Cells(41, 4)).Select
    Selection.Copy
    Sheets("DataSet").Select
    Subscript = 1
    Do While Subscript < 21
        Cells(20 * (Subscript - 1) + 2, 6).Select
        Selection.PasteSpecial Paste:=xlValues, Operation:=_xlNone, SkipBlanks:=False, Transpose:=False
        Subscript = Subscript + 1
    Loop
End

```

2. Recherche des mâles possibles et des femelles possibles pour les descendants


Feuille "**Génotypes**", le génotype est codé par les 2 allèles A1 et A2, la liste des mâles et femelles possibles s'affiche en ligne (Mi = Mâles, Fi = Femelles).

IND	SEXE	A1	A2	Gen
B1m	m	8	8	8/8
B2m	m	14.5	14.5	14.5/14.5

Feuille "**Données**" contenant les génotypes des parents.

FAM	M	F	M1	M2	F1	F2	GEN1	GEN2	GEN3	GEN4
1	B1m	B1f	8	8	12.5	21.5	8/12.5	8/21.5	8/12.5	8/21.5
2	B1m	B2f	8	8	1	23.5	8/1	8/23.5	8/1	8/23.5

Feuille "**Dataset**", générée par le programme.
Chaque famille (FAM, parents M et F) donne 4 génotypes possibles (GEN1 à GEN4)

```

SubSub Parentage()
    Dim larv1, larv2, li, ind, var1, var2
    li = 2
    Do While li < 25
        Worksheets("Genotypes").Activate
        If Cells(li, 4) = "" Then
            li = li + 1
        Else
            Range(Cells(li, 4), Cells(li, 5)).Copy
            Worksheets("Données").Activate
            ActiveSheet.Cells(2, 8).PasteSpecial Paste:=xlValues
            Columns("J:J").Select
        End If
    Loop

```



```
Selection.Copy
Columns("L:L").Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlValues, Operation:= _xlNone, SkipBlanks:=False, Transpose:=False
Application.CutCopyMode = False
Selection.Sort Key1:=Range("L1"), Order1:=xlDescending, Header:= _xlGuess, OrderCustom:=1,
    MatchCase:=False, _Orientation:=xlTopToBottom
    ind = 1
    var1 = "ffff"
    Do While var1 <> ""
        ActiveSheet.Cells(ind, 12).Activate
        var1 = ActiveCell.Value
        ActiveSheet.Cells(ind + 1, 12).Activate
        var2 = ActiveCell.Value
        If var1 = var2 Then
            Cells(ind + 1, 12).Delete DécaléVers:=xlUp
        Else
            ind = ind + 1
        End If
    Loop
Range("L1:L21").Select
Application.CutCopyMode = False
Selection.Copy
Range("M1").Select
Selection.PasteSpecial Paste:=xlValues, Operation:= _xlNone, SkipBlanks:=False, Transpose:=True
ActiveSheet.Range("M1:AG1").Copy
Worksheets("Genotypes").Activate
ActiveSheet.Cells(li, 6).PasteSpecial Paste:=xlValues
li = li + 1
End If
Loop
```

3. Transfert des données de pesée et mise à jour automatique de la courbe de croissance

```
Sub transfer()
liindiv1 = 1
numindividu = "xxxx"
Do While numindividu <> ""
liindiv2 = liindiv1
liindiv1 = liindiv1 + 1
Workbooks("tw490.xls").Activate
Worksheets("tw490").Activate
Cells(liindiv1, 1).Activate
numindividu = ActiveCell.Value
Workbooks("twlink.xls").Activate
Worksheets("1").Activate
Do While numindividu <> individu
    liindiv2 = liindiv2 + 1
    ActiveSheet.Cells(liindiv2, 1).Activate
    individu = ActiveCell.Value
Loop
Workbooks("tw490.xls").Activate
Worksheets("tw490").Activate
Cells(liindiv1, 2).Copy
Workbooks("twlink.xls").Activate
Worksheets("1").Activate
ActiveSheet.Cells(liindiv2, 31).PasteSpecial Paste:=xlValues
Loop
End Sub
```

Annexe 7

Programmes SAS

```
data nonlin;  
infile "c:/windows/bureau/bertrand/thèse/data/chap1/len.prn";  
input SG IND DSET DPS LEN GR;  
run;
```

```
proc sort;  
by sg dset;  
run;
```

```
proc glm;  
class sg dset;  
model GR=sg dset(sg);  
random dset(sg);  
means sg /snk;  
run;
```

Annexe 8

Protocoles de Biologie moléculaire

Protocole de marquage d'amorce et d'amplification:

<u>L10 larves et Adultes</u>		<u>Locus CG44:</u>	
Amorce 1	0,189 µl	Amorce 1	0,23 µl
Tampon Kinase 10X	0,142 µl	Tampon Kinase 10X	0,1 µl
γ - ³³ P-ATP	0,0788 µl	γ - ³³ P-ATP	0,1 µl
T4 polynucléotide kinase	0,0079 µl	T4 polynucléotide kinase	0,06 µl
eau	1 µl	eau	0,51 µl
V final	1,4177 µl	V final	1 µl
Amorce 2	0,189 µl	Amorce 2	0,21 µl
Tampon Taq 10X	1,05 µl	Tampon Taq 10X	1,5 µl
MgCl ₂	0,42 µl	MgCl ₂	1,8 µl
dNTP	0,39 µl	dNTP	1,5 µl
Taq	0,074 µl	Taq	0,05 µl
ADN	8 µl	Eau	4,94
V final	11,541	ADN	4 µl
		V final	15

Composition des réactifs:

Tampon Kinase 10X Eurogentec	Tris-HCl pH 7,6 50 mM MgCl ₂ 10 mM DTT 5 mM Spermidine-HCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM
Tampon Taq 10X Goldstar	Tris-HCl pH 9,0 750 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM Tween 20 0,1 %
Magnésium	MgCl ₂ 25 mM
γ - ³³ P-ATP	10 µCi.µl ⁻¹
T4 polynucléotide kinase	10 unités.µl ⁻¹
Taq Polymérase	5 unités.µl ⁻¹
Amorces	10 nM
dNTP	2 mM

Tampons et réactifs pour la migration:Gel d'acrylamide 6 % dénaturant

	Quantités	[C] finale
Urée	420 g	7 M
TBE 10X	100 ml	1 X
Acrylogel 40 % w/v (Acrylamide + NN'-Méthylène acrylamide)	150 ml	6%
Eau bidistillée	qsp 1000 ml	

TBE 10 X

	Quantités	[C] finale
Tris base	162 g	2,67 M
Acide borique	27,5 g	0,44 M
EDTA	50 ml 0,5 M	25 mM
Eau bidistillée		

Catalyseurs de polymérisation du gel d'acrylamide pour 70 ml d'acrylamide

Persulfate d'ammonium 1 mg/l	360 µl
TEMED	70 µl

Tampon de migration dénaturant

Formamide	25 ml
Xylène Cyanol	0,025 g
Bleu de Bromophénol	0,025
EDTA 0,5 ml	1 ml

Annexe 9

Ségrégations zygotique par famille, P = probabilité associée au χ^2 testant l'écart entre effectifs attendus (1:1:1:1) et observés.

Effectifs					Effectifs				
Famille	zygote	Observé	Attendu	P	Famille	zygote	Observé	Attendu	P
M1 X F1	1825	16	13	0,006	M2 X F1	1425	1	5,75	1,7E-04
	1831	7	13			1431	1	5,75	
	2525	22	13			2825	14	5,75	
	2531	7	13			2831	7	5,75	
M1 X F2	1812	7	9,75	0,264	M2 X F2	1412	5	9,5	4,0E-04
	1830	8	9,75			1430	3	9,5	
	2512	15	9,75			2812	10	9,5	
	2530	9	9,75			2830	20	9,5	
M1 X F3	1811	13	11,75	8,9E-05	M2 X F3	1411	6	6	0,072
	1817	24	11,75			1417	2	6	
	2511	7	11,75			2811	11	6	
	2517	3	11,75			2817	5	6	
M1 X F4	1821	15	10,5	0,019	M2 X F4	1421	10	7,25	4,3E-04
	1824	4	10,5			1424	0	7,25	
	2521	16	10,5			2821	15	7,25	
	2524	7	10,5			2824	4	7,25	
M1 X F5	1826	25	28	4,8E-08	M2 X F5	1426	5	14,75	8,1E-08
	1837	40	28			1437	2	14,75	
	2526	3	28			2826	29	14,75	
	2537	44	28			2837	23	14,75	

Famille	zygote	Effectifs		P
		Observé	Attendu	
M3 X F1	1925	5	8	0,100
	1931	4	8	
	2325	11	8	
	2331	12	8	
M3 X F2	1912	2	8,75	0,019
	1930	7	8,75	
	2312	12	8,75	
	2330	14	8,75	
M3 X F3	1911	9	8,75	8,9E-06
	1917	2	8,75	
	2311	21	8,75	
	2317	3	8,75	
M3 X F4	1921	16	11,5	4,0E-04
	1924	0	11,5	
	2321	19	11,5	
	2324	11	11,5	
M3 X F5	1926	4	16	2,6E-04
	1937	13	16	
	2326	28	16	
	2337	19	16	

Famille	zygote	Effectifs		P
		Observé	Attendu	
M4 X F1	1525	12	12,5	0,270
	1531	7	12,5	
	-225	15	12,5	
	-231	16	12,5	
M4 X F2	1512	16	18,25	0,034
	1530	25	18,25	
	-212	9	18,25	
	-230	23	18,25	
M4 X F3	1511	19	13	2,5E-06
	1517	25	13	
	-211	8	13	
	-217	0	13	
M4 X F4	1521	18	7	4,0E-07
	1524	0	7	
	-221	10	7	
	-224	0	7	
M4 X F5	1526	14	19	0,015
	1537	22	19	
	-226	11	19	
	-237	29	19	

Famille	zygote	Effectifs		P
		Observé	Attendu	
M5 X F1	3425	15	10,75	0,445
	3431	9	10,75	
	925	11	10,75	
	931	8	10,75	
M5 X F2	3412	9	10,75	0,152
	3430	17	10,75	
	912	10	10,75	
	930	7	10,75	
M5 X F3	3411	20	10	0,001
	3417	7	10	
	911	11	10	
	917	2	10	
M5 X F4	3421	20	12,25	2,3E-06
	3424	5	12,25	
	921	23	12,25	
	924	1	12,25	
M5 X F5	3426	5	8,75	0,090
	3437	15	8,75	
	926	8	8,75	
	937	7	8,75	