

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE
Ecole Doctorale SEDD

Thèse pour obtenir le grade de **Docteur en Biologie**

Julien Normand

Déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction chez les huîtres creuses (Crassostrea gigas) triploïdes

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Génétique et Pathologie - IFREMER



Soutenue le 30 Juin 2009 devant le jury composé de :

Docteur Pierre Boudry, IFREMER

Docteur Edwige Quillet, INRA

Professeur Michel Mathieu, Université de Caen

Professeur Pascale Garcia, Université de La Rochelle

Docteur Caroline Fabioux, Université de Bretagne Occidentale

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Les expérimentations et analyses présentées dans cette thèse ont été réalisées au Laboratoire de Génétique et Pathologie d'Ifremer à la Tremblade. Le Laboratoire de Physiologie des Invertébrés (UMR100 – PE2M) de Brest m'a accueilli pour la phase finale de la rédaction.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été cofinancés par la Région des Pays de la Loire, projet Gerrico axe I : Bioproductions et ressources marines. La bourse de thèse dont j'ai bénéficié consistait en un cofinancement Ifremer-Région Poitou-Charentes.

Imprimé à Brest, le 19 Novembre 2009

Illustrations : Julien Normand.

Remerciements :

J'adresse d'abord mes remerciements aux organismes financeurs qui ont rendu possible ce travail : la région Poitou-Charentes et Ifremer qui ont financé ma bourse de thèse au cours de ces 3 ans, et la région Pays de Loire qui a participé au financement des expérimentations à travers le projet GERRICO. J'aimerais également exprimer ma gratitude envers les responsables des stations et des laboratoires qui m'ont accueilli à La Tremblade et Bouin, et au LPI-Brest.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury : le Dr. Quillet et le Pr. Mathieu qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et le Dr. Fabioux, le Pr. Garcia et le Dr. Boudry qui en étaient les examinateurs.

J'adresse toute ma gratitude et toute mon amitié à mon directeur de thèse, le Dr. Pierre Boudry qui m'a encadré avec bienveillance et sagacité. Il m'a fait confiance, m'a énormément appris sur la façon de pratiquer la recherche en général, et m'a transmis son enthousiasme pour les approches scientifiques « un peu trap's ». Ce fut un plaisir de tous les jours de travailler à ses côtés, je lui dois beaucoup.

Je ne saurais oublier les chercheurs qui ont contribué à l'encadrement de ces travaux : Stéphane Pouvreau, Arnaud Huvet et Joël Haure formaient le comité de thèse et m'ont prodigué leurs conseils avisés sur la conduite des expérimentations et Bruno Ernande a co-dirigé cette thèse et m'a introduit à la programmation sous SAS. Tous ont fait montre d'une grande gentillesse à mon égard, et m'ont fait partager leur engouement pour le plus fascinant des modèles biologiques (l'huître donc). Je remercie tout spécialement Stéphane qui, le premier, s'est intéressé à mes triploïdes matures et m'a recommandé auprès de Pierre.

A mes chères stagiaires, Mathilde Couturier et Sophie Castagnet...Merci les filles pour votre aide précieuse, votre gentillesse et votre indulgence à mon égard. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous, j'espère que je ne vous ai pas trop dégoûtées du bivalve.

Je remercie sincèrement les personnels du LGP dont le travail quotidien a permis le bon déroulement de ces travaux. Une pensée particulière va aux zootechniciens de La Tremblade et Bouin qui m'ont aidé dans la production du matériel biologique de qualité, préalable indispensable à la conduite des expérimentations menées. Un grand merci également à Helen McCombie qui m'a si souvent aidé pour la rédaction de textes en anglais.

Au bout de 3 ans (et même un peu plus) de vie partagée, des liens amicaux se sont tissés avec bon nombre des collègues de la station de La Tremblade. Je n'en dresserai pas la liste, et j'espère qu'ils me le pardonneront, mais je les salue tous affectueusement. Merci pour m'avoir fait découvrir votre métier, vos passions, pour avoir partagé avec moi quelques moments de vie et des litres de café. Merci à la formidable équipe du LPI-Brest qui m'a accueilli, recueilli, hébergé pour la rédaction.

Merci également aux ostréiculteurs qui se sont toujours montrés ouverts et bienveillants à mon égard. Ils m'ont fait prendre conscience des réalités, parfois dures, des métiers de l'huître. Une partie de notre travail consiste à soutenir leur profession et dans ce

sens, c'est grâce à leur activité que cette étude a pu être financée. J'aurais aimé leur être plus utile.

Un merci chaleureux à tous ceux qui sont venus à la soutenance. J'ai été heureux et fier de partager ça avec vous..

Pour finir, je remercie les amis qui m'ont soutenu, remonté, accompagné et supporté au cours des trois longues années. Mômman Flo, sans qui j'en serais encore à me demander dans quel sens on tient la pipette. Stéphane Bodin qui m'a fait partager sa passion pour le marais. C'est réussi, je suis accroc à la pousse en claire. Sophie, qui met du soleil dans les infexpés. On va l'avoir ce Nobel d'ostréiculture !!! Mon bon Jean-Côme, tes coins à brochet sont fabuleux. Pour te remercier, je te refille mes spots à poissons-chats. De rien, de rien... Yann, étrange hybride toi même ! Tu m'intrigues, ...tu m'épates aussi. Salut à mon cher Isma qui partage mon ostréomanie (entre autres pathologies). Nos discussions à bâtons rompus ont beaucoup contribué à ce manuscrit, grâce t'en soit rendue. Ma p'tite Elo... chuis pas encore parti que tu me manques déjà. Ca s'peut-tu qu'on se retrouve au Québec? Pascaline, Angie, Benji, Christopher, Bichon, Cap'tain Guilou, Yves et Afi, bonne route, bon vent, au plaisir de se retrouver (en gresouilles pour les thésards !). Salut à mes vieux copains parigots, aux brestois, aux ex-brestois, aux vosgiens, aux cousins. Merci pour les soirées inoubliables, les convictions partagées, les analyses musicologiques et les cds de brutal death morbihanais. C'est notre amitié qui entretient la flamme...

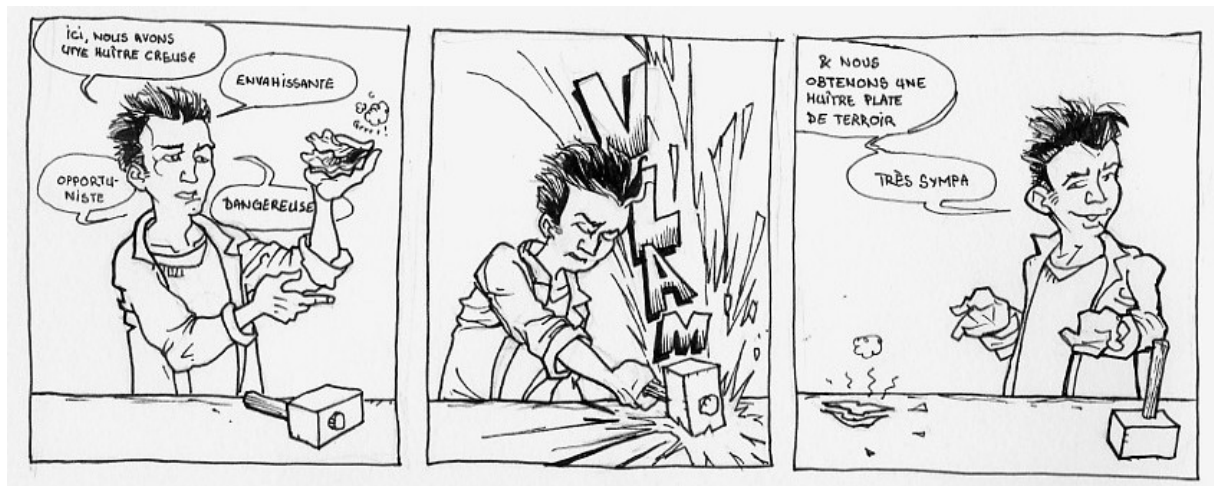
A mes parents, ma sœur, toujours présents, toujours complices...

Aux huîtres, rétives ou délicieuses. Pardon pour les lames de scalpel rouillées.

Table des matières

Préambule : Contexte général.....		7
Introduction : Contexte scientifique.....		10
1 ^{ère} Partie	L'huître creuse diploïde.....	12
I.	Eléments de biologie générale.....	13
II.	La reproduction de l'huître creuse.....	16
III.	Le développement gonadique : aspects qualitatifs.....	19
IV.	Le développement gonadique : aspects quantitatifs.....	27
2 ^{ème} Partie	Polyploïdie et triploïdie chez <i>Crassostrea gigas</i>	40
I.	Généralités sur la polyploïdie.....	42
II.	La triploïdie chez l'huître creuse.....	46
Problématique et Approches expérimentales.....		63
1 ^{ère} Partie	Problématique et approches expérimentales.....	64
I.	Problématique de l'étude.....	65
II.	Approches expérimentales employées.....	66
2 ^{ème} Partie	Méthodes.....	69
I.	Méthodes pour la caractérisation du développement gonadique.....	70
II.	Analyse de la ploïdie par cytométrie en flux.....	78
III.	Génotypage et assignation de parenté.....	82
Résultats.....		91
Chapitre I	Etude de l'effort reproducteur et de la croissance chez <i>Crassostrea gigas</i> : comparaison d'huîtres diploïdes et triplides issues d'induction chimique ou du croisement 4n x 2n et cultivées en condition d'élevage intensif.....	92
I.	Introduction.....	94
II.	Material and methods.....	97
III.	Results.....	101
IV.	Discussion.....	109

Chapitre II	Etude des bases génétiques de la variation de l'allocation à la reproduction et à la croissance chez de jeunes huîtres creuses diploïdes et triploïdes élevées en mélange de familles	115
I.	Introduction.....	118
II.	Material and method.....	121
III.	Results.....	128
IV.	Discussion.....	136
V.	Conclusion.....	142
Chapitre III	Réponses d'huîtres creuses diploïdes et triploïdes à une sélection directionnelle effectuée sur l'intensité du développement gonadique de leurs géniteurs diploïdes : allocation à la reproduction et à la croissance.....	144
I.	Introduction.....	145
II.	Matériel et Méthodes.....	149
III.	Résultats.....	149
IV.	Discussion.....	171
V.	Conclusion.....	179
Discussion.....		180
I.	Résultats principaux et conclusions.....	181
II.	Perspectives.....	190
Annexe I:		
Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (<i>Crassostrea gigas</i>) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave.....		197
Annexe II:		
Valorisation des résultats de thèse : publications, présentations orales et posters.....		203
Références.....		205



Préambule : Contexte général

Evolution des techniques de l'ostréiculture

La production et l'élevage d'huîtres constitue aujourd'hui la deuxième activité d'aquaculture (derrière la culture des algues brunes) de par le monde (4,4 millions de tonnes et 3,22 milliards de dollars en 2007), et l'huître creuse représente à elle seule 98 % de celle-ci (FAO, 2009).

Avant d'atteindre cette importance, la culture de l'huître a longtemps été une activité traditionnelle, notamment au Japon et en Europe. Au Japon, la culture de l'huître creuse est rapportée dès le XVI^{ème} siècle et les modes de culture ont considérablement évolué depuis cette époque. Ainsi, la culture des huîtres s'effectuait jusqu'au XVII^{ème} siècle sur un substrat rocheux (qui assurait le recrutement et servait de support à la croissance des adultes), et a progressivement évolué jusqu'aux techniques modernes de captage et d'élevage sur des radeaux flottants (Akashige, 2005). En Europe, les gisements naturels d'huîtres plates, *Ostrea edulis*, étaient exploités depuis l'époque romaine. L'aquaculture, alternative à la cueillette, s'est développée en France dans le courant du XVII^{ème} siècle avec l'utilisation pour l'élevage de bassins d'eau de mer creusés à terre, ceux-ci étant souvent d'anciens marais salants. La découverte des techniques de captage¹ au cours du XIX^{ème} siècle a grandement amélioré la disponibilité en naissain et a constitué une étape importante vers une domestication de l'huître. L'introduction en France de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* a ensuite été réalisée à la fin du 19^{ème} siècle, afin de pallier à la demande croissante d'huîtres plates. Cette première introduction a été suivie de celle de l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* à la fin des années 1970, afin de remplacer les stocks de *C. angulata* décimés par une épizootie (Grizel et Héral, 1991).

Ces changements d'espèces furent accompagnés de profondes évolutions des pratiques de culture et de commercialisation des huîtres. La motorisation des embarcations ostréicoles, le développement de l'élevage sur table, et le transfert de lots à grande échelle entre des zones de recrutement, de pousse et d'affinage parfois très éloignées les unes des autres constituent autant de changements profonds des conditions de culture des huîtres. La banalisation du transport de produits frais a considérablement développé le marché de consommateurs potentiels et grandement contribué à en faire un met festif, notamment en France.

¹ Collecte des juvéniles planctoniques dans le milieu, en leur offrant un support de fixation sur lequel ils recrutent. Les individus ainsi « captés » sont ensuite placés en élevage.

Le développement des structures permettant l'élevage à terre constitue probablement la dernière étape marquante de l'histoire des techniques d'ostréiculture. Les techniques modernes d'écloserie et de nurserie permettent en effet l'élevage hors-sol de l'huître pendant les phases précoces, assurant aux ostréiculteurs une disponibilité en naissain durant les années de faible recrutement naturel. La production de naissain d'écloserie est aujourd'hui un maillon essentiel de l'élevage de l'huître creuse aux Etats-Unis, en Australie, en Chine, et en France remplissant plusieurs missions distinctes. En France, le développement des écloseries a d'abord permis de faire face à la variabilité inter-annuelle des taux de recrutement dans les bassins naisseurs (Arcachon et Marennes-Oléron), et a ensuite (à partir de la fin des années 1990) permis la diffusion de naissain triploïde. Dans d'autres parties du monde, comme les côtes Pacifique des USA ou du Mexique, le naissain d'écloserie est la base même de l'aquaculture de *Crassostrea gigas*, en l'absence de recrutement local. En Australie, les écloseries privées participent aujourd'hui à la mise en place de plan de sélection génétique à grande échelle, et en proposent des naissains améliorés aux ostréiculteurs (voir pour revue Boudry, sous presse). Sur la côte est des USA, le réensemencement en naissain d'écloserie triploïde de *Crassostrea gigas* a été envisagé pour pallier au déclin des bancs naturels de *Crassostrea virginica*, mis en danger par la surpêche, la dégradation de l'habitat et les maladies (Rotschild et al., 1994).

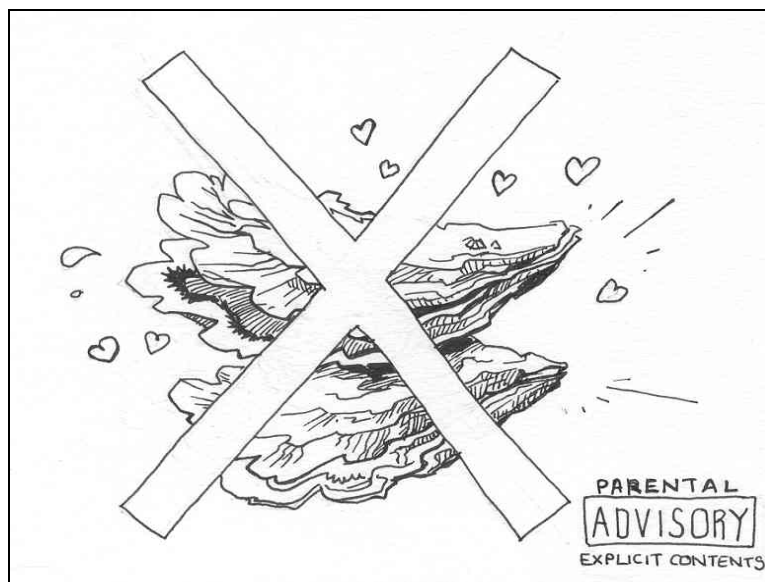
Dans les années 1990, le développement général de l'aquaculture et l'importance économique croissante de ce secteur ont entraîné en parallèle l'essor de l'amélioration génétique des espèces concernées (Hulata, 2001). Le développement des techniques de reproduction contrôlées en écloserie a permis de commencer à appliquer à l'aquaculture les techniques d'amélioration génétique développées en agriculture parmi lesquelles l'induction de la triploïdie (Boudry et al., 2004).

Introduction :

Le contexte scientifique

Avant-propos

L'objectif du travail présenté dans cette thèse était d'analyser les bases génétiques de la variation de l'effort reproducteur chez les huîtres creuses *Crassostrea gigas* triploïdes. Cette analyse a été faite en grande partie par l'observation comparée de la biologie de la reproduction (et des caractères phénotypiques associés) d'individus triploïdes et diploïdes. Cette section propose de présenter les notions de la biologie de l'huître diploïde nécessaires à l'interprétation et à la discussion des résultats présentés ci-après (Sand-Jensen, 2007). Des informations générales sur son écologie, sa stratégie d'histoire de vie et son anatomie seront exposées et serviront de préambule à une revue de la littérature traitant de la reproduction chez cette espèce. Une seconde synthèse bibliographique sera ensuite présentée et traitera des modifications induites sur la reproduction et la physiologie par la polyploïdie en général, et, par la triploïdie chez *Crassostrea gigas* particulièrement.



1^{ère} Partie :
La reproduction chez *C. gigas*

I. Eléments de Biologie générale

I.1. Aire de répartition

L'huître creuse *Crassostrea gigas*, communément appelée « huître du Pacifique » ou « huître japonaise » a été décrite par Thunberg en 1795. C'est un mollusque bivalve de la famille des Crassostreidae, dont l'aire de répartition originelle s'étendrait des rivages du nord-ouest de la Russie au sud de la Chine, et incluant les côtes japonaises et coréennes. Sa présence naturelle le long des côtes chinoises reste cependant à confirmer, puisque des introductions massives d'individus ont eu lieu dans les années 1970 (Wang et al., 2004) et qu'il demeure difficile d'identifier les différentes espèces d'huîtres creuses en Chine (Reece et al., 2008). L'espèce a été introduite par l'homme sur de nombreux littoraux de par le monde à des fins d'aquaculture ou par accident, et s'est remarquablement implantée dans de nombreux cas. On la trouve ainsi aujourd'hui notamment en Europe, Afrique du Sud, Australie, Nouvelle-Zélande, U.S.A. (Ruesink et al., 2005). Elle est qualifiée d'espèce invasive dans plusieurs régions du monde. En Europe, ses peuplements sauvages ont progressé vers le nord au cours de ces dernières décennies, depuis l'estuaire de la Loire qui constituait la limite nord de son aire de peuplement avant l'été 1976 (date des premières observations de recrutement naturel en Bretagne) (Meistertzheim, 2008). Après avoir colonisé la mer de Wadden (Pays-Bas), et les côtes du Danemark dans le courant des années 1990, ses populations naturelles les plus septentrionales sont aujourd'hui localisées sur les littoraux de la Norvège et de la Suède (Rohfritsch et al., 2008). Les principales causes évoquées pour expliquer cette récente extension de l'aire de répartition de *C. gigas* en Europe du nord sont le réchauffement des eaux côtières, l'ostréiculture et la possible adaptation génétique à de nouvelles conditions environnementales (Meistertzheim, 2008 ; Rohfritsch et al., 2008).

I.2. Ecologie

L'huître creuse est un mollusque filtreur qui se nourrit principalement de phytoplancton. Son cycle de vie comprend une phase adulte fixée et une phase larvaire pélagique, la fécondation se produisant dans la colonne d'eau après l'émission des gamètes. La durée de la phase larvaire est variable, de 2 à 10 semaines selon les paramètres environnementaux (His et al., 1989 ; Collet et al., 1999 ; Taxis, 2005). Cette phase larvaire longue assure un fort potentiel dispersif à l'espèce, mais constitue également une phase critique au cours de laquelle se produisent des mortalités importantes, estimées aux alentours de 90% pour des populations en expansion (Brandt et al., 2008) et probablement supérieures pour les populations implantées. En éclosion, les taux de mortalités sont généralement inférieures (Robert et Gérard, 1999) mais sont très variables.

Les bancs naturels de *Crassostrea gigas* peuvent former des récifs denses dans les milieux abrités (baies, estuaires et étangs côtiers) en zone intertidale. L'huître y domine alors largement les peuplements locaux (en abondance), formant un substrat dur qui abrite lui-même d'autres espèces, et contrôle l'environnement physico-chimique par son activité de filtration. Cette action locale sur les communautés et les réseaux trophiques lui a valu le qualificatif d'« ingénieur d'écosystème » (Crooks, 2002).

L'huître creuse vit essentiellement en zone intertidale, un milieu soumis à une très forte variabilité à la fois spatiale (du haut en bas de l'estran) et temporelle (au fil des marées et des saisons) pour ses paramètres biotiques et physico-chimiques. Cette hétérogénéité des conditions du milieu s'accompagne d'une forte plasticité phénotypique, traduisant le contrôle prioritairement environnemental des fonctions physiologiques. Elle entraîne également des pressions de sélection locales, révélées par une différenciation génétique significative des individus à une petite échelle spatiale (Meistertzheim, 2008). A plus large échelle, les flux génétiques naturels ou liés aux transports d'animaux d'élevage apparaissent très importants et expliquent la faible différenciation observée (Huvet et al., 2000).

Nous verrons que l'adaptation de *Crassostrea gigas* à un milieu soumis à une forte variabilité spatio-temporelle a de profondes implications pour l'étude de la physiologie et de la génétique de *Crassostrea gigas*. Cette variabilité, combinée à la sensibilité de l'huître creuse aux conditions environnementales, entraîne ainsi une forte variabilité spatio-temporelle des mesures phénotypiques chez des individus de même âge et de même génotype. Cette même variance révèle également des corrélations phénotypiques (et parfois génétiques)

significatives entre l'intensité de l'effort de reproduction, la survie, et la croissance somatique.

I.3. L'anatomie de l'huître creuse

L'anatomie de l'huître est caractéristique de celle des mollusques bivalves : son corps est mou, non-segmenté, et protégé par une coquille constituée de 2 valves de forme très irrégulière (V.) (Figure 1). Epousant la forme de chacune de ces valves, le manteau (M.) est une membrane qui entoure le corps de l'animal et assure la croissance coquillière. La région antérieure du corps est constituée d'une capsule céphalique (Cc.), repli du manteau qui protège la bouche (B.) et les palpes labiaux (Pl.). La partie dorsale est occupée par la masse viscérale (Mv.) comprenant les glandes digestives, le stylet cristallin et l'intestin (I.) qui s'enroule jusqu'au muscle adducteur postérieur (Map.) et débouche vers l'extérieur de la cavité palléale. La gonade (G.) se forme autour de cette masse viscérale, et se prolonge par un gonoducte (Gt.) qui aboutit quant à lui de l'autre côté du muscle adducteur, à l'intérieur de la cavité palléale. Entre la masse viscérale et le muscle se trouve la cavité péricardique (Cp.). Les branchies (Br.) s'étendent de la partie dorso-postérieure et remontent jusqu'à la bouche. Elles sont constituées de quatre feuillets finement lamellés et assurent à la fois la respiration et la collecte des particules de nourriture.

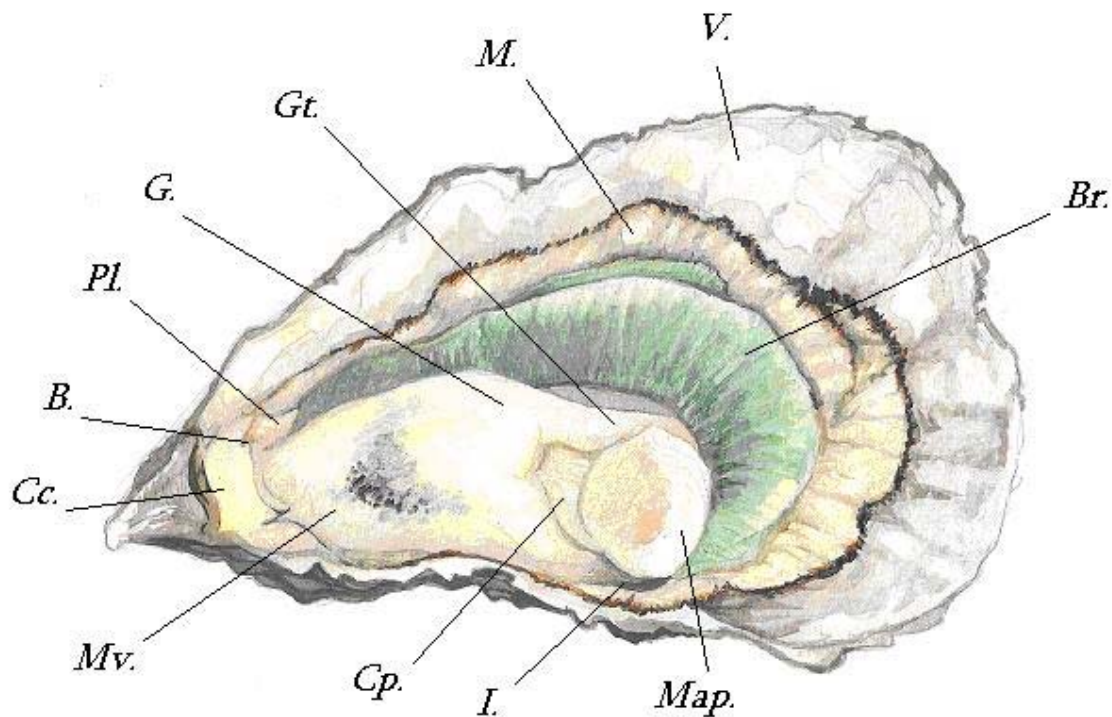


Figure 1 : Anatomie de l’huître creuse *Crassostrea gigas*.

II. La reproduction de l’huître creuse

II.1. La gonade : un organe transitoire et diffus

La gonade de l’huître creuse adulte est un organe qualifié de transitoire et de diffus : transitoire car elle suit un cycle de développement et de résorption annuel, et diffus car elle ne forme pas un organe indépendant, mais se développe dans le tissu conjonctif entourant la masse viscérale à partir de cellules germinales souches (Germinal Stem Cells : GSCs) disséminées en périphérie de la masse viscérale (Fabioux et al., 2004). En zone tempérée, le cycle annuel est composé d’une phase de développement marginal en hiver puis d’une phase de développement intense au printemps au cours de laquelle la gonade devient un organe volumineux. L’émission gamétique (fraie, souvent improprement appelée « ponte ») se produit au cours de l’été dans les régions où les conditions environnementales sont favorables (température de l’eau proche de 20°C). Une phase de résorption des produits sexuels non-

émis commence en automne et se termine avec l'initiation d'un nouveau cycle de développement au cours de l'hiver suivant. L'huître est un animal à croissance indéterminée (Heino et Kaitala, 1999) : sa croissance se poursuit après la date de première maturité et peut durer tout au long de la vie, ce qui implique également que la quantité de tissu gonadique produite à chaque saison suit une relation d'allométrie. Le nombre de gamètes produits par un individu varie ainsi grandement au cours de la vie de l'animal, de quelques dizaine de millions d'ovocytes pour une femelle à première maturité jusqu'à 150 millions au cours de la troisième année de reproduction (Royer et al., 2008).

II.2. La phase larvaire

Chez l'huître creuse, la fécondation est externe et intervient peu après l'émission estivale des gamètes, dans la colonne d'eau. L'embryon donne rapidement naissance à une larve trocophore lécitotrophe² pélagique (Figure 2). Les ovocytes de l'huître creuse comptent parmi les plus petits mesurés chez les invertébrés marins et contiennent peu de réserves nutritives, ce qui oblige la larve à une vie pélagique autonome et longue pour un mollusque. Le stade trocophore s'achève 24 heures après fécondation (à 20°C) avec le développement de la première coquille embryonnaire en forme de « D » et l'apparition du velum qui assure à la fois la locomotion et la captation du phytoplancton, la larve nageuse est alors qualifiée de véligère. Cette phase pélagique dure une vingtaine de jours, selon les conditions de nourriture et de température, pendant lesquels la larve développe une seconde coquille embryonnaire et passe de 70 µm à 350 µm. A la fin de la phase planctonique la larve change son comportement : elle gagne le substrat et développe son pied (stade pédivéligère), cherchant à se fixer avant d'entamer sa métamorphose. La métamorphose et le recrutement sur son substrat définitif s'effectuent simultanément, et la jeune huître acquiert alors les traits physiologiques propres à l'adulte.

² Lécitotrophe : qui ne prend pas de nourriture dans le milieu mais puise dans ses réserves internes (ovocytaires) pour assurer ses besoins métaboliques.

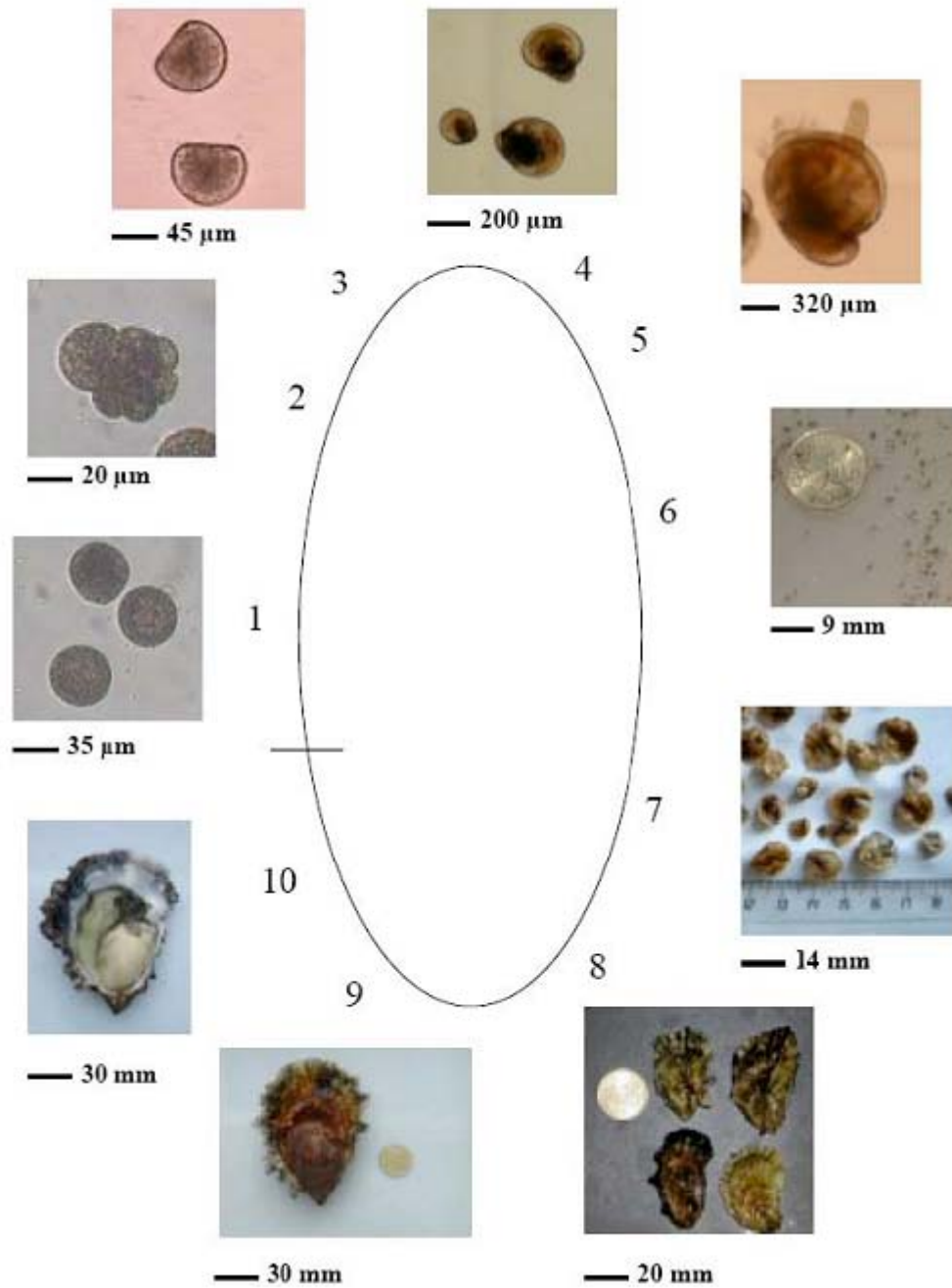


Figure 2 : Cycle biologique de l’huître creuse *Crassostrea gigas* (les temps de développement sont donnés à titre indicatif en prenant pour référence un cycle de production d’écloserie typique) : 1) Ovocytes et spermatozoïdes (Fécondation) ; 2) Embryon stade morula (2 heures) ; 3) Larves D (24 heures) ; 4) Larves véligères (14 jours) ; 5) Larves pédivéligères (18 jours) ; 6) Naissain post-fixation (1 mois) ; 7) Adulte (2 mois) ; 8) Adulte (6 mois) ; 9) Adulte (10 mois) ; 10) Adulte montrant une gonade mature (10 mois) (d’après Degremont, 2003).

III. Le développement gonadique de l'huître creuse : aspects qualitatifs

III.1. Embryogenèse et acquisition des caractères sexuels primaires

La différenciation des cellules de la lignée germinale (précurseurs des futurs gamètes de l'adulte) intervient dès l'embryogenèse (Figure 3). Les cellules germinales primordiales (Primordial Germ Cells : PGCs) se différencient des cellules somatiques lors de la gastrulation, sous l'action de déterminants cytoplasmiques et en fonction de leur environnement proche (Wylie, 2000). Parmi ces déterminants cytoplasmiques, des granules germinaux ont été identifiés chez de nombreuses espèces d'invertébrés (insectes, nématodes, mollusques) et de vertébrés (amphibiens, poissons) (voir pour revue Wylie, 2000). Ces structures qui associent ARN, protéines et mitochondries sont contenues dans le cytoplasme ovocytaire. Des expériences de transplantation ont démontré que l'importation du cytoplasme germinale (contenant les granules germinaux) dans une autre partie de l'embryon induit ainsi la différenciation de cellules normalement somatiques en précurseurs de la lignée sexuelle, prouvant leur implication dans la différenciation des PGCs. Chez l'huître creuse *C. gigas*, les transcrits du gène *Oyvlg* (Oyster *vasa*-like gene) ont été identifiés comme déterminants probables de la différenciation des PGCs (Fabioux et al., 2004).

Au cours du stade larvaire, les cellules précurseurs ainsi formées migrent pour atteindre l'emplacement des deux futures ébauches gonadiques, situées de part et d'autre du tractus digestif de la larve selon un axe antéro-postérieur. Elles donnent naissance aux cellules souches germinales (Germinal Stem Cells : GSCs) qui constituent les ébauches gonadiques chez l'huître venant de subir la métamorphose. Elles sont alors positionnées dans la région péricardique (Fabioux et al. 2004). La maturité sexuelle intervient très tôt chez l'huître creuse, et les GSCs semblent susceptibles de produire une lignée germinale complète atteignant le stade gamétique dès la métamorphose, comme le suggèrent des phénomènes de maturation précoce observés chez des individus de très petite taille (< 3cm, Pouvreau et al., 2006).

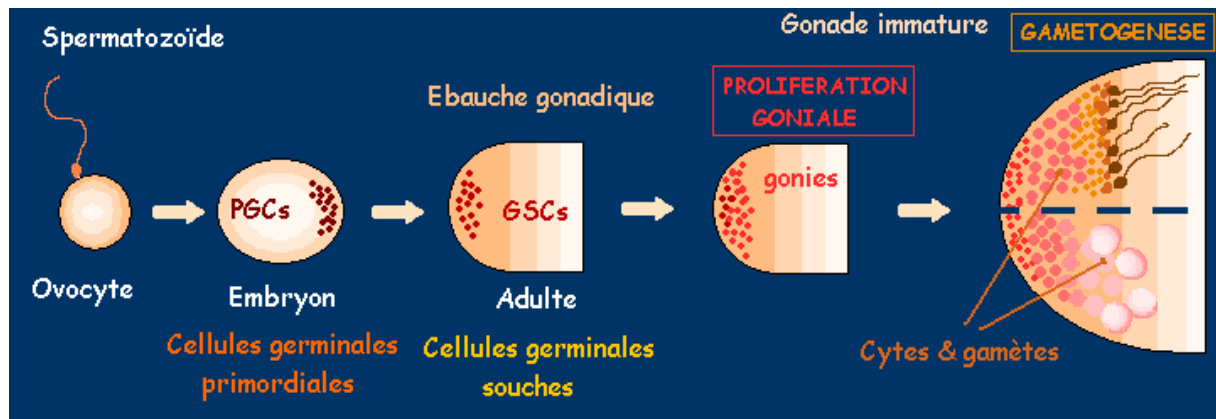


Figure 3 : Localisation et développement des lignées germinales, du gamète à la gonade, d'après Fabioux, 2004.

III.2. Un cycle de développement gonadique annuel

Chez l'huître creuse, une même cohorte de cellules de la lignée germinale mature au cours d'un épisode de gonadogénèse suivant un cycle de développement annuel en milieu tempéré. Le développement gonadique peut être divisée en 4 phases (voir Figure 4).

- La première phase consiste d'abord en une différenciation des GSCs en gonies suivie d'une phase de prolifération mitotique de ces dernières.
- Elle s'achève avec l'initiation d'une seconde phase de différenciation de ces gonies qui entrent en méiose pour donner finalement naissance aux ovocytes, et aux spermatocytes. La maturation des cytes se poursuit également avec l'acquisition des caractéristiques cytologiques propres aux gamètes : spermiogénèse chez les mâles et vitellogénèse chez les femelles.
- Après une phase transitoire de maturité gonadique, la quatrième et dernière phase voit la fraie et la résorption des produits germinaux non-émis avant l'initiation d'un nouveau cycle.

Nous verrons plus tard que le phénomène est continu, que certaines phases sont parfois chevauchantes (notamment chez les individus triploïdes), et que sa dynamique est très influencée par des facteurs environnementaux.

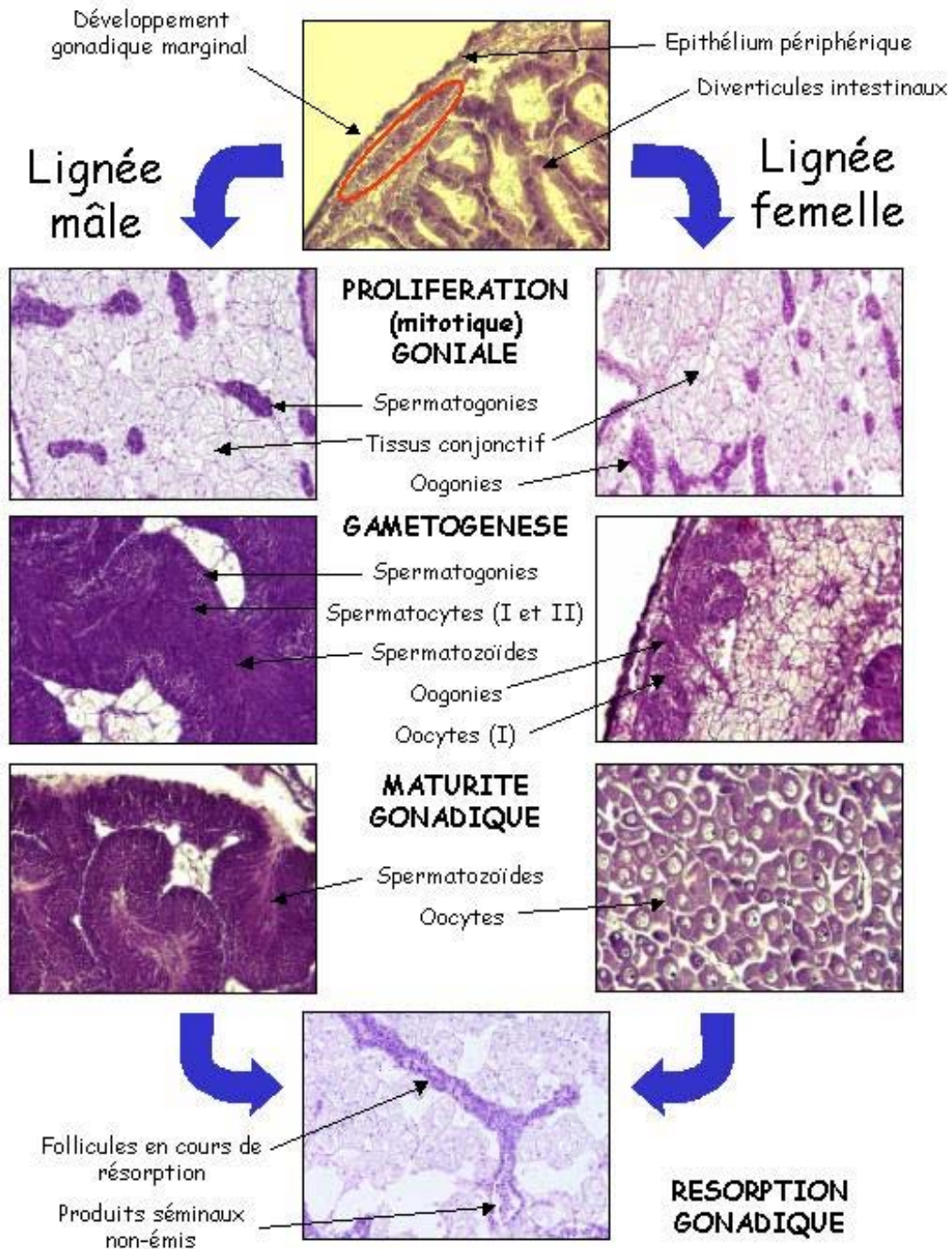


Figure 4 : Planche histologique de la maturation gonadique chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

III.2.a. 1^{ère} phase : la prolifération mitotique

La gonadogenèse s'initie à partir des GSCs présentes dans le tissu conjonctif, à la périphérie de la masse viscérale. Celles-ci se divisent pour donner naissance à une première génération de gonies qui prolifèrent rapidement par multiplication mitotique, induisant la formation des tubules gonadiques qui envahissent le tissu conjonctif de la masse viscérale de façon centripète (Figure 4). Ces tubules gonadiques épars dans la masse viscérale gagneront en volume à l'issue de la gamétogenèse, devenant jointifs et formant une gonade acineuse entourant les organes digestifs. Contrairement aux espèces de vertébrés chez lesquelles le genre sexuel est en général fixé dès l'embryogenèse, chez *C. gigas*, la différenciation du sexe se produit à chaque saison au cours de la gonadogenèse et les GSCs peuvent donner naissance aussi bien à des ovogonies qu'à des spermatogonies. Toutefois, et dès le stade gonial, toutes les cellules d'une même cohorte sont orientées vers un seul genre. Les ovogonies et spermatogonies sont des cellules de petite taille ($\approx 6 \mu\text{m}$) composées d'un gros noyau entouré d'un fin cytoplasme.

III.2.b. 2^{ème} phase : la différenciation des cellules sexuelles et la gamétogenèse

Au début de la seconde phase de développement gonadique, les gonies diploïdes subissent une multiplication de leur matériel chromosomique et deviennent des cytes primaires tétraploïdes ($2n = 2$ chromatides), avant de subir les deux réductions méiotiques qui les transformeront en gamètes haploïdes (Figure 5).

Chez la femelle, ces ovocytes tétraploïdes restent bloqués en prophase 1 de méiose pendant toute la gamétogenèse et subissent une phase de vitellogenèse pour acquérir les caractéristiques cytologiques de l'ovocyte prêt à être fécondé. Ils accumulent ainsi une grande quantité de réserves lipidiques qui assureront la survie larvaire pendant la phase lécitotrophe, ainsi que les protéines et les ARN nécessaires au bon déroulement de l'embryogenèse (Fabioux, 2004). Cette étape de vitellogenèse est donc caractérisée par une forte croissance de l'ovocyte, qui atteint 40 à 50 μm à maturité (Fabioux, 2004). Les 2 réductions méiotiques du matériel chromosomique seront finalement induites après l'émission gamétique par la pénétration du spermatozoïde, le matériel génétique excédentaire étant alors expulsé lors de

l'émission successive de deux globules polaires (Eudeline et al., 2000) (Figure 5).

Chez le mâle, les spermatocytes primaires tétraploïdes sont soumis à 2 réductions méiotiques la gamétogenèse, acquérant le statut de spermatocytes secondaires ($1n = 2$ chromatides) puis de spermatozoïdes ($1n = 1$ chromatide). Ces spermatozoïdes subissent alors la spermiogenèse, caractérisée notamment par la compaction du noyau, et l'acquisition d'un flagelle (Fabioux, 2004) (Figure 5).

C'est au cours cette phase de gamétogenèse que la gonade devient un organe volumineux. A maturité, les follicules sont jointifs et occupent la majeure partie de la masse viscérale (Figure 4). Ils sont remplis de cellules sexuelles libres, et communiquent entre eux par des lumières qui aboutissent dans le gonoducte.

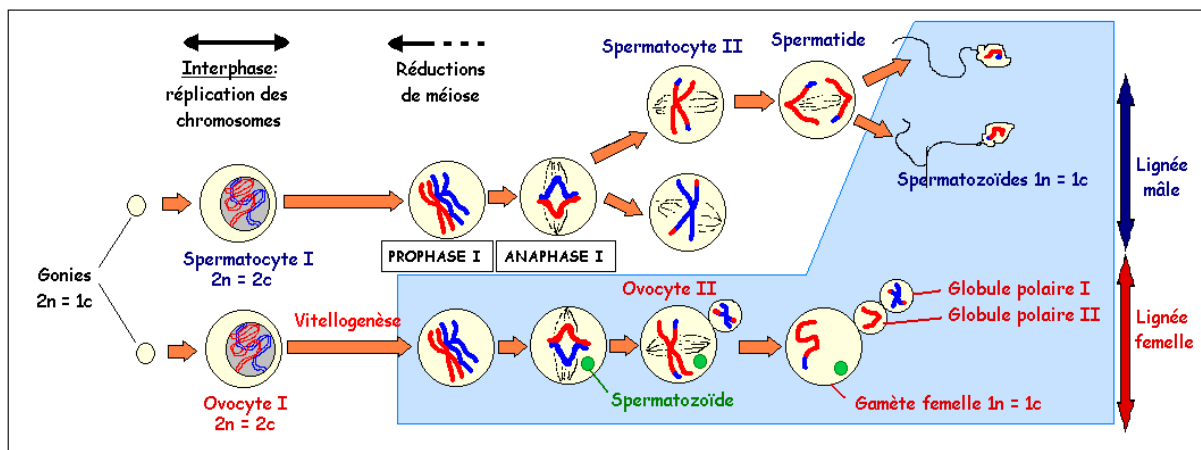


Figure 5 : Réductions méiotiques des lignées mâle et femelle, la zone bleutée indique les étapes qui se déroulent post-émission gamétique (dans l'eau de mer).

III.2.c. 3^{ème} et 4^{ème} phases : la maturité, l'émission gamétique et l'atrésie

Le stade de maturité sexuelle consiste en une phase transitoire après la fin de la gamétogenèse et avant le fraie, au cours de laquelle le tissu gonadique est constitué de gamètes matures et jointifs.

L'émission des cellules sexuelles est prioritairement influencée par l'état de maturité de la gonade, lui-même sous le contrôle de la nourriture et de la température. Il est probable que cette relation découle simplement du fait que seule une gonade proche de la maturité présente des gamètes libres, et des follicules suffisamment développés pour permettre la libération

desdits gamètes par le gonoducte. Dans le milieu naturel, la fraie est induite par un ou plusieurs stimuli environnementaux supplémentaires. Ainsi, les chocs thermiques résultant de l’alternance immersion-émersion lors de la marée montante et les forts coefficients de marée coïncident généralement avec la fraie (His, 1976). Enfin, des expériences de laboratoire ont montré que certains peptides extraits de gonades d’huîtres matures induisaient l’ovulation de leurs congénères matures lorsqu’ils étaient introduits dans le bac d’élevage, suggérant l’existence d’une communication inter-individuelle permettant de synchroniser l’émission gamétique à l’échelle d’un banc, ou d’un bassin (Bernay et al., 2006). La fraie s’accompagne de violents mouvements valvaires, notamment chez les femelles, qui chassent les gamètes s’écoulant du gonoducte dans la cavité palléale (Figure 6).

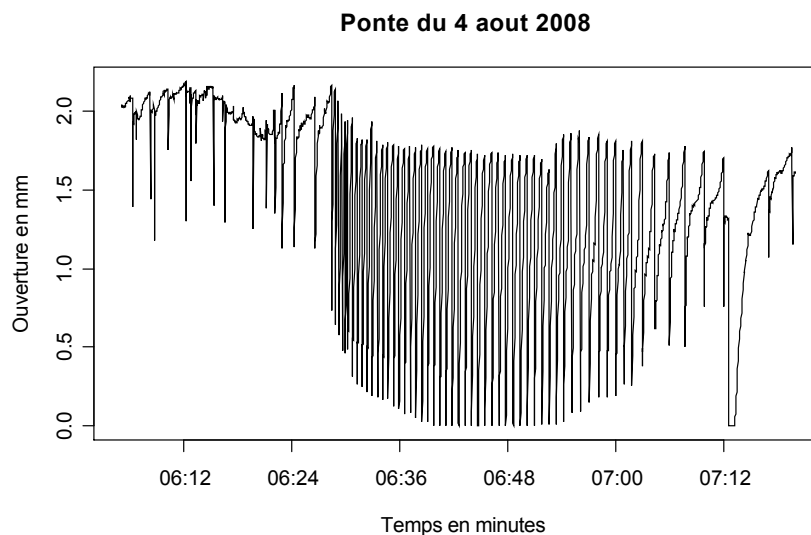


Figure 6 : Enregistrement valvométrique de l’émission gamétique d’une huître creuse, illustrant l’augmentation de la fréquence des battements valvaires (I. Bernard, non publié).

Chez l’huître creuse, l’émission des gamètes est fréquemment partielle et peut donc avoir lieu plusieurs fois au cours d’une même saison de reproduction. La plupart des études histologiques montrent la présence de tissus gonadiques en voie de résorption après la ponte, y compris lorsque celle-ci est massive (Enriquez-Diaz, 2004). La résorption des tissus gonadiques, ou atrésie, a été précisément décrite chez les bivalves pectinidés (*Pecten maximus*, Dorange et Le Pennec, 1989) puis chez *Crassostrea gigas* par Steele et Mulcahy (1999). Elle est caractérisée histologiquement par une infiltration hémocytaire en lieu et place des structures gonadiques (Delaporte et al., 2007), entraînant la dégénérescence des cellules de la lignée sexuelle (Dorange et Le Pennec, 1989) qui conduit finalement à l’élimination totale des tissus reproducteurs (Figure 4). Il est possible qu’une partie des réserves

énergétiques consacrées à la production de tissus gonadiques puisse être re-métabolisée au cours de l'atrésie pour assurer plus tard d'autres fonctions physiologiques (Pouvreau et al., 2006). Une autre hypothèse, non-exclusive, consiste à considérer la résorption gonadique comme un phénomène de « nettoyage » permettant l'initiation d'un nouveau cycle reproducteur dans les meilleures conditions (Lango-Reynoso, 1999).

III.3. Déterminisme sexuel et hermaphrodisme alterné

L'huître creuse présente un déterminisme du genre sexuel particulier, que l'on qualifie d'hermaphrodisme (un individu peut présenter chacun des 2 genres sexuels au cours de son existence) alterné (il ne développe simultanément qu'un seul genre) protandre (la première maturation s'effectue en général par le développement de tissus mâles). Ainsi, une même cohorte d'individus présente une forte proportion de mâles au cours de la première saison de maturation alors que la proportion de femelles augmente au cours du temps (Amemiya, 1929), quoiqu'une femelle à l'année n-1 puisse également développer une lignée mâle l'année n. De rares hermaphrodites simultanés (présentant simultanément des cellules germinales des lignées mâle et femelle) sont également détectés régulièrement au sein des populations (Coe, 1943, Galstoff, 1964).

La probabilité d'une huître creuse à développer une gonade mâle ou femelle dépend soit de son environnement, soit de facteurs génétiques, soit d'une action simultanée de ces deux déterminismes. Le protandrisme (qui désigne un effet de l'âge, donc non-génétique) est décrit dans toute la bibliographie traitant du sujet, et suggère que les facteurs génétiques ne jouent qu'un rôle accessoire. Les mollusques montrent une grande variété de mode de déterminisme sexuel (revue dans Yusa, 2007) et l'hypothèse d'un déterminisme génétique secondaire chez *C. gigas*, plus ou moins complexe, ne peut pas être exclue. Plusieurs publications mentionnent chez *Crassostrea gigas* des différences significatives entre individus présentant une gonade mâle ou femelle pour certaines variables liées à l'acquisition énergétique :

- Deslous-Paoli et Héral (1988) et Soletchnik et al. (1997) observent des taux de réserves glucidiques et lipidiques supérieurs chez les individus développant une lignée germinale femelle au cours de la saison de maturation ;
- Baghurst et Mitchell (2002) mettent également en évidence des taux de croissance supérieurs des individus femelles.

D'autre part, le budget énergétique est positivement corrélé à la probabilité de développer une lignée germinale femelle :

- des huîtres creuses du Pacifique soumises expérimentalement à un régime phytoplanctonique enrichi montrent une plus forte propension à développer une gonade femelle (Enriquez-Diaz, 2004),

- Le Dantec (1968), observe que des huîtres portugaises (*Crassostrea angulata*) placées en conditions favorables à la gamétogenèse (c'est-à-dire une température printanière élevée et nourriture abondante) présentent une sex-ratio nettement déséquilibrée en faveur des femelles.

Ces corrélations positives entre bilan énergétique individuel et probabilité de développer la fonction femelle ont conduit la plupart des auteurs à conclure à un déterminisme sexuel basé sur le niveau de réserves énergétiques, les individus étant mâles par défaut, avec une probabilité de développer leur fonction femelle d'autant plus grande que la nourriture est abondante. Ce déterminisme physiologique peut être fort chez *Crassostrea gigas* puisque l'espèce vit dans des environnements très variables quant à leur productivité primaire, ce qui a pour conséquence une variabilité spatio-temporelle importante du niveau de réserve énergétique.

Un déterminisme secondaire de nature génétique a également été proposé à partir de plusieurs modèles. Haley, (1977, cité par Yusa, 2007) propose un modèle à 3 loci et 2 allèles, un « mâle » et un « femelle » aux effets semi-additifs. Les individus portant de 3 à 6 allèles « mâles » sont des mâles obligatoires, alors que la probabilité de développer une gonade femelle des autres génotypes est inversement corrélée au nombre d'allèles « femelle » portés. Guo et al. (1998) proposent un modèle bi-allélique (M & F) simple avec 2 génotypes sexuels possibles MM (mâle obligatoire) et MF (femelle potentielle). Selon ses auteurs, seuls les individus MF pourraient devenir des femelles, sous le contrôle de circonstances environnementales favorables.

Enfin, les dimorphismes sexuels sus-cités peuvent être interprétés de deux manières différentes: considérant l'hypothèse d'un déterminisme sexuel prioritairement génétique, Baghurst et Mitchell (2002) suggèrent que les individus génétiquement femelles présentent également la plus forte densité énergétique. A l'opposé, d'autres auteurs (Galstoff, 1964, Le Dantec, 1968, Lango-Reynoso, 1999) y voient un déterminisme « physiologique » du genre sexuel, les individus de plus forte densité énergétique ayant alors plus tendance à développer une lignée germinale femelle. Enfin, il faut noter que de récentes études ont fait la preuve d'un déterminisme génétique pour certaines des fonctions physiologiques liées à l'acquisition

énergétique (Huvet et al., 2008a ; Ernande et al., 2004). Il est probable qu'une telle base génétique pour la nutrition et la croissance puisse également impacter un déterminisme physiologique du genre sexuel basé sur le niveau de réserve.

IV. Le développement gonadique : aspects quantitatifs

IV.1. Effort de reproduction et allocation à la reproduction : Définitions

L'effort de reproduction ou effort reproducteur (ER) (Figure 7) est un concept théorique central de l'écologie, la biologie des populations et la physiologie. Il découle du postulat selon lequel un organisme bénéficie d'une quantité d'énergie limitée (R), acquise par la nutrition et allouée aux trois fonctions physiologiques principales que sont la maintenance, la croissance somatique, et la croissance gonadique selon des coefficients déterminés (respectivement w , v , u , avec $w + v + u = 1$). L'investissement (énergétique) dans un trait phénotypique se traduit donc par un « coût », payé par les autres fonctions (Stearns, 1976). Au sens strict, l'effort reproducteur est alors défini comme la portion ($u / [v + w]$) du budget énergétique global dédiée aux processus liés à l'accroissement du succès reproducteur à un instant t (Todd et Havenhand, 1983). Il intègre une large gamme de composants (allant des soins portés par les parents à leur progéniture à la quantité d'énergie consacrée à la production des gamètes). L'allocation à la reproduction désigne la quantité d'énergie consacrée à la reproduction, et intégrée dans le temps, correspondant au produit $Ru \times t$ (Figure 7).

L'intérêt biologique de cette formulation découle de l'interdépendance explicite entre traits phénotypiques : la variation de l'un d'entre eux entraînant *de facto* la variation des autres. Le concept d'effort de reproduction trouve donc ses applications :

- en biologie évolutive, dont un des dogmes centraux prédit que la variation des structures de corrélations entre traits phénotypiques (dont l'effort de reproduction, qui est intrinsèquement lié au succès reproducteur) repose sur un compromis en terme de fitness et renseigne sur les

contraintes évolutive s'exerçant, ou s'étant exercées sur un organisme (voir pour revue Stearns, 1976).

- dans les applications bio-énergétiques de la physiologie qui étudient les variations de l'allocation à ces différents traits (voir Kooijman, 2000 pour une revue). La diminution de l'allocation énergétique pour un trait aboutit dans ce cas à la ré-allocation de cette énergie vers une autre fonction physiologique.

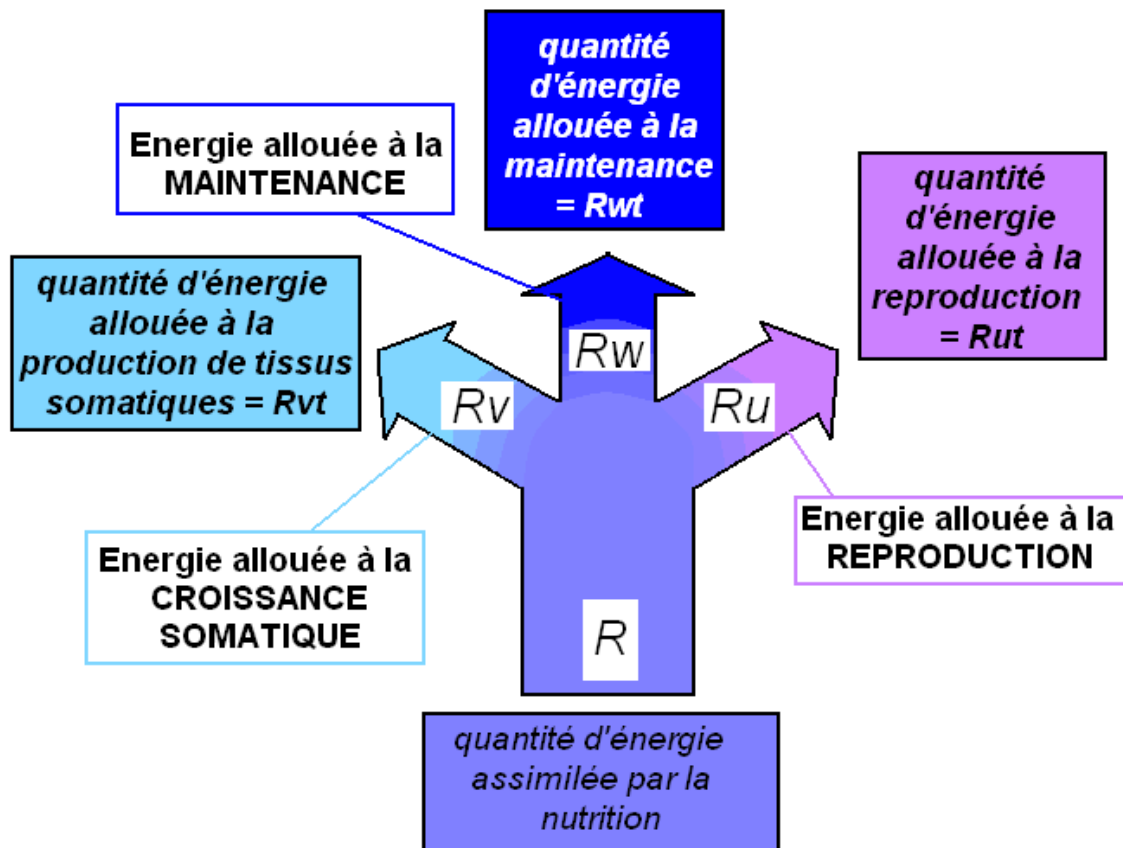


Figure 7 : Fractionnement énergétique aux différents traits de vie.

En pratique, on considère chez les mollusques que les quantités de tissus somatiques et gonadiques produites sont proportionnelles à l'investissement énergétique en croissance somatique et gonadique. L'allocation à la reproduction (R_{ut}) est donc estimée par une mesure du volume ou de la masse de la gonade. L'effort de reproduction est souvent résumé à un rapport gonado-somatique (R_{ut} / R_{vt}), c'est-à-dire un ratio entre la quantité de tissus gonadiques et somatiques produits à un instant t , et sert à estimer la variabilité de l'effort de reproduction entre divers lots expérimentaux. Ainsi, la différence entre les lots 1 ($ER_{Lot 1} = [u_1$

$/ (v_1 + w_1)J$) et $2 (ER_{Lot 2} = [u_2 / (v_2 + w_2)J]$) est estimée par la différence entre les rapports gonado-somatiques des lots 1 et 2 à un temps t :

$$RGS1 - RGS2 = (R_1 \cdot u_1 \cdot t_{gonade1} / R_1 \cdot v_1 \cdot t_{soma1}) - (R_2 \cdot u_2 \cdot t_{gonade2} / R_2 \cdot v_2 \cdot t_{soma2})$$

Avec t_{gonade} = temps écoulé entre le début de la maturation et la date de la mesure d'allocation gonadique et t_{soma} = âge de l'individu (= temps écoulé entre le début de la croissance somatique de l'individu et la date de la mesure d'allocation somatique). Cette assertion repose sur un certain nombre d'*a priori* implicites. Ainsi, les termes de maintenance et d'acquisition énergétique et la période temporelle intégrée par la croissance sont supposés constants entre les lots considérés :

La différence des efforts de reproduction :

$$ER_{Lot 1} - ER_{Lot 2} = [u_1 / (v_1 + w_1)] - [u_2 / (v_2 + w_2)]$$

est égale à la différence des ratio gonado-somatiques :

$$(R_1 \cdot u_1 \cdot t_{gonade1} / R_1 \cdot v_1 \cdot t_{soma1}) - (R_2 \cdot u_2 \cdot t_{gonade2} / R_2 \cdot v_2 \cdot t_{soma2})$$

Si,

$$w_1 = w_2, t_{gonade1} = t_{gonade2} \text{ et } t_{soma1} = t_{soma2}.$$

Il faut noter par ailleurs que le terme d'allocation à la croissance somatique intègre en fait une période de temps plus étendue que le terme de croissance gonadique ($t_{gonade} < t_{soma}$) puisque la croissance est continue (aux phases d'amaigrissement près) tandis que la quantité de tissu gonadique est renouvelée à chaque cycle de gonadogenèse. Supposer que l'occupation gonadique est une mesure de l'effort de reproduction repose donc implicitement sur l'hypothèse que le taux d'allocation à la croissance somatique (v) est constant au cours des saisons de reproduction.

Enfin, le développement cyclique de la gonade de l'huître rend concrètement difficile l'analyse séparée de la dynamique de la maturation et de l'allocation à la reproduction qui sont intrinsèquement liées. Une mesure de la masse gonadique effectuée au printemps – en cours de maturation gonadique – ne peut évidemment pas être considérée comme représentative de l'effort de reproduction annuel de l'individu. La comparaison de la quantité de tissu reproducteur développée par deux lots expérimentaux d'individus à un instant ne peut que donner une indication du différentiel d'investissement énergétique moyen pour ces lots à cet instant donné (proportionnel à la masse de gonade produite à cet instant). Si ces mêmes lots présentent un différentiel dans leur dynamique de maturation ou d'émission gamétique, l'allocation à la reproduction mesurée quelques semaines plus tard pour les mêmes lots pourrait montrer une tendance inverse... Les mesures d'occupation gonadique répétées au cours d'un cycle reproducteur montrent d'ailleurs que le processus de maturation est plus complexe qu'un simple développement continu de tissus reproducteurs : des pontes partielles

sont couramment observées en cours de gamétogenèse, ainsi que des signes de résorption gonadique, y compris dans l'environnement naturel (Enriquez-Diaz, 2004). Ces phénomènes conduisent tous deux à une diminution *de facto* du rapport gonado-somatique, indépendamment de l'investissement énergétique à la reproduction. En raison de cette intrication de la dynamique de maturation et de l'intensité de l'effort de reproduction, une mesure d'allocation gonadique ponctuelle est souvent (implicitement) ramenée à un effort de reproduction. Au cours de nos travaux, nous emploierons des indicateurs qualitatifs de la maturité, conjointement à des estimateurs de la quantité de tissus gonadiques synthétisés afin de discerner les effets respectifs de ces deux composantes de l'allocation gonadique (voir la partie « Méthodes pour la caractérisation du développement gonadique »).

IV.2. Déterminismes environnementaux

L'influence des facteurs environnementaux sur l'effort de reproduction de *Crassostrea gigas* a été très étudiée, dans l'espoir notamment de prédire le recrutement larvaire et d'améliorer la disponibilité en naissain pour l'aquaculture (His, 1976). Ces travaux ont montré un fort déterminisme environnemental pour l'allocation aux fonctions physiologiques de l'huître par l'analyse de séries de croissance dans le milieu naturel combinées à celles de paramètres environnementaux. Ainsi, les températures automnales et printanières influent sur la dynamique de la gonadogenèse (Héral et al., 1986). La salinité serait également susceptible d'impacter tout à la fois la gamétogenèse et le déclenchement de l'émission gamétique (cité dans Marteil, 1976). Enfin, la composition biochimique des géniteurs, la quantité de gamètes produite et la survie larvaire sont très contrôlées par les concentrations en phytoplancton (Deslous-Paoli et al., 1982).

Le développement d'écloseries et de structures d'élevages à terre a permis par la suite de contrôler les paramètres d'élevages et d'étudier expérimentalement différentes modalités de culture et leurs effets sur les fonctions physiologiques. Ces travaux ont à leur tour enrichi la connaissance sur les déterminismes environnementaux s'exerçant en milieu naturel sur l'allocation énergétique aux différentes fonctions chez les mollusques bivalves. Là encore, la littérature sur le sujet est abondante, et nous nous bornerons ici à citer deux études qui illustrent l'effet des deux paramètres environnementaux influençant prioritairement l'allocation à la reproduction :

Chavez-Villalba et al. (2003) décrivent un effet très significatif de la quantité de nourriture

distribuée à des géniteurs d'écloserie sur la quantité d'ovocytes produits. Lors de leurs expérimentations, la privation de nourriture des huîtres pendant la phase de conditionnement aboutit à une production de gamètes presque nulle alors que des individus issus du même lot et nourris durant la même période produisent entre 7 et 45 millions d'ovocytes. Un effet marqué de la quantité de réserves disponible à l'entrée en maturation a été également observé sur la gonadogenèse: les individus provenant de la Baie des Veys ont alors présenté des taux de glycogène plus de deux fois supérieurs à ceux des géniteurs de Marennes-Oléron, et ce taux de réserve important a très probablement contribué à leur production d'ovocytes quatre à cinq fois plus importante.

En 2005, Fabioux et al. soumettent des huîtres creuses à différentes modalités d'élevage sur la base de cycles de photopériode et température reproduisant 1) l'évolution saisonnière de ces paramètres à Marennes-Oléron, 2) la même évolution, mais accélérée deux fois, 3) des conditions hivernales. Leurs observations confirment le contrôle prioritaire de ces facteurs dans l'initiation de la gonadogenèse et le déclenchement des émissions gamétiques. Les huîtres soumises à un cycle accéléré connaissent ainsi deux épisodes de maturation gonadique par an, et émettent deux fois leurs gamètes (voir Figure 8). A l'inverse, les huîtres soumises au conditionnement « hivernal » développent effectivement une gonade mature aussi volumineuse que pour les autres lots ($\approx 60\%$ d'occupation gonadique), en dépit de la température très basse de conditionnement (8°C). Elles présentent une dynamique de gonadogenèse très ralentie, et ne montrent aucun signe d'émission gamétique.

Un consensus a récemment émergé concernant les facteurs affectant de façon prioritaire l'allocation à la reproduction chez *Crassostrea gigas*, en partie grâce à la vision intégrée de la physiologie des mollusques permise par le développement récent des modèles de croissance dynamique (DEB : Dynamic Energy and Mass Budget) (Kooijmann, 2000). Il est admis que les principaux déterminismes environnementaux influençant la croissance somatique et gonadique de l'huître creuse sont :

- 1°) la quantité et la qualité de la nourriture disponible (et ingérée), selon une relation naturelle de conservation de la masse de carbone ingérée et ré-allouée à la croissance,
- 2°) la température qui influe de façon générale sur la dynamique des processus métaboliques.

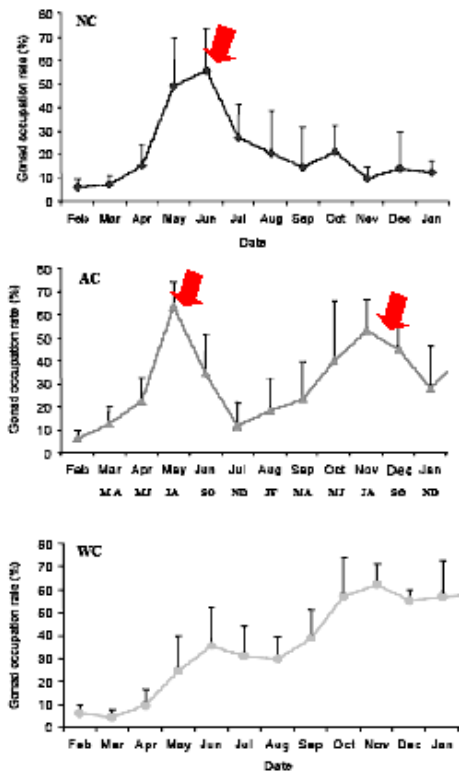


Figure 8 : Evolution de l'occupation gonadique (surface de gonade standardisée sur la surface de la masse viscérale) d'huîtres creuses issues d'un même lot et soumises à 3 modalités de conditionnement contrastées (D'après Fabioux et al., 2005). En haut, cycle « normal » imitant l'évolution annuelle de la photopériode et de la température à Marennes-Oléron. Au milieu, cycle accéléré. En bas, conditions hivernales. Les flèches rouges pointent les émissions gamétiques.

Dans leur gamme courante de variation, ces deux facteurs sont évidemment corrélés de façon positive à l'intensité du développement gonadique. Les modèles DEBs appliqués à l'huître creuse ne considèrent d'ailleurs que ces deux seuls paramètres agissant en interaction comme variables forçantes du système (Pouvreau et al., 2006 ; Ren et Schiel, 2008 ; Bourles et al., sous presse) et décrivent néanmoins de façon réaliste l'investissement en croissance somatique et gonadique. Les autres facteurs environnementaux (salinité, polluants, etc.) sont alors supposés n'avoir un effet sur l'allocation à la reproduction que lorsqu'ils dépassent les limites de tolérance de l'espèce.

IV.3. Covariation des traits physiologiques

L'huître creuse présente un effort reproducteur pouvant atteindre 65% du budget énergétique annuel, et donc très supérieur aux efforts de reproduction estimés chez les autres espèces de bivalves filtreurs (Van der Veer et al., 2006). L'émission gamétique, quand elle se produit, représente subséquemment une perte de masse de chair très importante qui peut atteindre 62% du poids frais (Deslous-Paoli et Héral, 1988). D'autre part, la quantité de tissus gonadiques

produite subit elle-même une forte variabilité spatio-temporelle du fait de l'hétérogénéité des conditions de vie. Du fait de l'inter-dépendance entre traits phénotypiques, il n'est alors pas surprenant que de fortes corrélations phénotypiques apparaissent entre l'intensité du développement gonadique et les moyennes des autres traits.

Tout d'abord, il existe une relation évidente entre les taux de croissance somatiques et gonadiques. Dans la mesure où la disponibilité en nourriture contrôle la croissance gonadique et somatique, la gamétogenèse coïncide avec une augmentation de la masse somatique (voir Royer et al., 2008, pour une corrélation entre la masse de tissus et l'effort reproducteur). A l'inverse, une émission des gamètes incomplète ou absente du fait de conditions de milieu défavorables permet la ré-allocation de cette énergie vers la croissance somatique (Pouvreau et al., 2006). Cette ré-allocation est couramment évoquée comme une des causes principales de la croissance supérieure des huîtres triploïdes (Partie II de l'Introduction).

La période de gamétogenèse coïncide également avec l'apparition de phénomènes de mortalités estivales de masse dans le milieu naturel. L'existence d'une relation entre intensité de l'allocation à la reproduction et survie estivale a été rapidement supposée : une forte allocation à la reproduction étant supposée entraîner un stress résultant de « désordres physiologiques » induits par l'« hypertrophie gonadique » (Mori, 1979). Cette relation a été par la suite étudiée au cours de travaux expérimentaux qui ont mis en évidence :

- une déplétion des réserves énergétiques somatiques, réorientées vers la gonade en période de reproduction (Deslous-Paoli et Heral, 1988 ; Bacca et al., 2005 ; Soletchnik et al., 2006 ; Lambert et al., 2008) ;
- une augmentation de l'activité respiratoire, avant (Moal et al., 2008) et après (Tran et al., 2008) l'émission gamétique ;
- une diminution de l'activité anti-microbienne de l'hémolymphe pendant la gamétogenèse (Li et al., 2009a), ainsi qu'une augmentation de la concentration en granulocytes et hyalinocytes (Delaporte et al., 2007).

Ces résultats ne constituent pas la démonstration d'une relation directe entre développement gonadique et état de santé de l'huître et ne devraient pas être interprétés comme tels. Ils illustrent cependant la covariation des variables physiologiques au cours de la saison, et l'orientation prioritaire du métabolisme vers la croissance gonadique.

IV.4. Déterminismes génétiques

A l'ère de la génomique (Huvet, 2008), alors que de récents travaux ont mis en évidence l'implication de différents gènes dans la régulation de la gonadogenèse de l'huître creuse (Fabioux et al., 2004 ; Boutet et al., 2008 ; Fleury et al., 2008, Naimi, 2009 ; Fleury et al., soumis), peu d'études se sont intéressées au déterminismes génétiques de l'intensité de l'effort de reproduction (c'est-à-dire les déterminants familiaux reliés à un effort reproducteur faible ou fort).

Chez l'huître américaine, un déterminisme génétique pour l'allocation à la reproduction a été suspecté par l'observation de comportements reproducteurs différents chez des huîtres issues de plusieurs populations géographiquement éloignées. Des individus de *Crassostrea virginica* collectés dans différents gisements naturels le long de la côte est des Etats-Unis, présentent des dynamiques de maturation gonadique différente, y compris lorsqu'ils sont élevés dans un même environnement (Loosanoff ; cité dans Barber et al., 1991). L'hypothèse d'un phénomène d'acclimatation physiologique (par opposition à une adaptation génétique) à l'environnement d'origine ne pouvant être exclue, l'auteur préconisait de reconduire la même étude en utilisant des huîtres élevées en laboratoires, et issues de plusieurs générations de croisements successifs à partir de géniteurs issus de sites de recrutement différents.

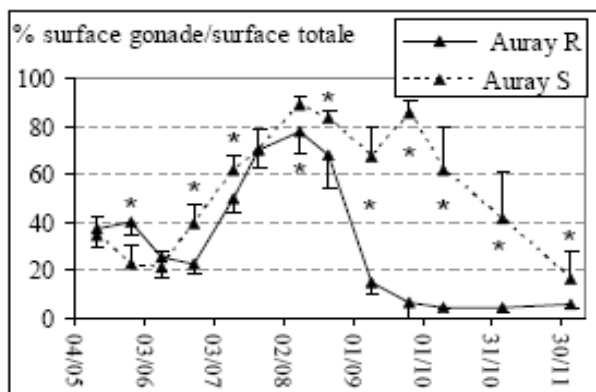
En 1991, Barber et al. ont suivi les conseils de leur prédécesseur, et étudié la maturation gonadique de lignées génétiques résistantes au parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX-syndrom), et issues de parents collectés sur les récifs naturels de Long Island Sound et Delaware Bay. Afin de discriminer les effets d'acclimatation d'éventuelles adaptations génétiques locales, des individus non-sélectionnés issus des mêmes populations ont également servi de témoins pour ces expériences. La conclusion de leurs travaux est étonnante : ils montrent que les lignées sélectionnées ont gardé une mémoire génétique non seulement de l'intensité de l'effort reproducteur, mais également de la dynamique de maturation gonadique de leur population d'origine. Ces résultats valident l'hypothèse de Stauber qui mentionnait dès 1950 l'existence de plusieurs « races » d'huîtres en se basant sur des différentiels physiologiques entre populations isolées géographiquement.

Chez *Crassostrea gigas*, un déterminisme génétique modéré a été démontré pour la moyenne familiale de l'effort reproducteur, ainsi qu'une forte héritabilité pour sa plasticité (Ernande, 2001, Ernande et al., 2004):

- d'une part, la variabilité phénotypique observée pour l'effort de reproduction dans un environnement donné est en partie liée à des différences entre familles,
- d'autre part, toutes les familles d'huîtres ne sont pas égales dans leur capacité à ajuster leur effort de reproduction en fonction de la variabilité environnementale.

Lors de cette étude, la forte interaction des déterminismes génétiques et environnementaux s'est notamment traduite par une corrélation génétique négative entre environnements. Autrement dit, les génotypes qui ont investi le moins d'énergie en reproduction dans un environnement d'élevage ont présenté, au contraire, de forts efforts reproducteurs (supérieurs à celui de la moyenne de la population) dans le second environnement d'élevage testé.

Enfin, une preuve indirecte de l'existence d'une base génétique à l'allocation à la reproduction a été apportée dans le cadre du défi Morest. Ce programme pluridisciplinaire s'intéressait à l'étude des causes des mortalités estivales de l'huître creuse, et incluait notamment un volet génétique comprenant une sélection divergente de lignées (pool de familles) présentant une réponse contrastée pour leur aptitude à la survie estivale (Boudry et al., 2008). Les lignées produites ont ainsi montré en première génération un fort contraste pour leur résistance, mais également un léger différentiel d'occupation gonadique à l'apex de maturité et une dynamique d'émission gamétique très contrastée (Huvet et al., 2008b) (Figure 9). Ce différentiel de dynamique de maturation gonadique a été observé à nouveau après deux générations de croisements intra-lignée, démontrant la persistance d'une base génétique induisant des différences pour l'allocation à la reproduction (Huvet et al., en préparation).



a

b

Figure 9 : Gonadogenèse des Lignées R et S. a) Occupation gonadique mesurée sur les lignées sélectionnées pour leur résistance (R) ou leur sensibilité (S) aux mortalités estivales au cours d'une saison de maturation dans le milieu naturel (Golfe du Morbihan) ; b) photo montrant des individus issus des lignées R post-émission, alors que les individus S présentent simultanément une gonade mature (d'après Samain et al., 2007).

IV.5. Le trade-off Survie / Effort de Reproduction

Chez *Crassostrea gigas*, l'important investissement dans la reproduction entraîne une mobilisation des fonctions vitales vers la gamétogenèse et la ponte et induit un stress chronique qui fragilise les individus et contribue probablement aux mortalités estivales récurrentes observées chez cette espèce (Samain et al., 2007). Cette corrélation phénotypique négative (trade-off phénotypique) entre reproduction et survie traduit un phénomène de compétition pour l'allocation entre ces fonctions : toute chose étant égale par ailleurs, la quantité d'énergie disponible pour assurer la survie estivale lorsque les conditions environnementales se dégradent est inversement proportionnelle à l'effort de reproduction de l'individu. Cette compétition entre fonctions peut avoir une base purement énergétique, ou résulter de l'inhibition d'une fonction indirectement induite par l'augmentation de l'allocation à la seconde : chez l'huître, la présence d'une gonade volumineuse en été pourrait ainsi comprimer « mécaniquement » la cavité péricardique et influencer sur certains paramètres vitaux comme la pression partielle en oxygène dissous dans l'hémolymphe (Tran et al., 2008).

Il existe également une part de variabilité génétique pour ce trade-off qui s'exprime par des corrélations génétiques négatives entre la reproduction et la survie. Concrètement, il a été démontré que les familles présentant les plus forts rapports gonado-somatiques montraient également les plus faibles survies, dans un milieu donné (Ernande, 2001). Ce trade-off génétique ou micro-évolutif (Reiznick, 1985) résulte de contraintes influençant la sélection des caractères dans les populations naturelles : la persistance d'une variabilité génétique pour le trade-off entre survie et effort de reproduction s'explique probablement par le fait que tout changement évolutif d'un de ces traits qui pourrait améliorer la fitness (et à terme, se fixer dans les populations) résulte en une réponse corrélée de l'autre caractère qui diminue la fitness et contrecarre toute amélioration du degré d'adaptation (Reiznick, 1985 ; Ernande, 2001). Par ailleurs, la croissance indéterminée des mollusques bivalves entraîne également un trade-off entre la reproduction en cours, et la reproduction des saisons futures, d'autant que le taux de croissance est également taille-dépendant (Heino et Kaitala, 1999). L'expression de ce trade-off entre survie et reproduction a été documenté chez d'autres organismes (Drosophile : Chippindale, 1993, Virus : De Paepe et Taddei, 2006) et pourrait constituer une réponse évolutive générale à la sélection naturelle, déjà prévue par les approches théoriques (Stearns, 1976).

Par ailleurs, l'expression (physiologique) de ce trade-off est elle-même dépendante de l'environnement : un changement du signe de la corrélation entre reproduction et survie est ainsi observé entre environnement riche / variable ou pauvre / peu variable (Figure 10). Il peut s'agir là d'une réponse plastique adaptative de l'allocation aux différentes fonctions visant à maximiser la fitness dans deux environnements différents : les génotypes capables d'ajuster de manière plastique l'allocation à la reproduction lorsque la ressource est limitante voient donc leur espoir de reproduction réduit pour l'année en cours mais leur survie améliorée (et donc la chance de participer à d'autres saisons de reproduction accrue) (Ernande, 2001). La variabilité des structures de corrélation génétique révèle l'hétérogénéité des contraintes environnementales qui s'exercent sur le développement des populations naturelles et cultivées d'huîtres : il existe non seulement une base génétique à la variabilité de l'effort de reproduction et la survie, mais des individus d'une même famille montrent également des performances variables pour leur fitness selon qu'ils recrutent, ou sont cultivés, en haut ou en bas de l'estran, dans un écosystème productif, ou pauvre, en milieu naturel ou en éclosérie.

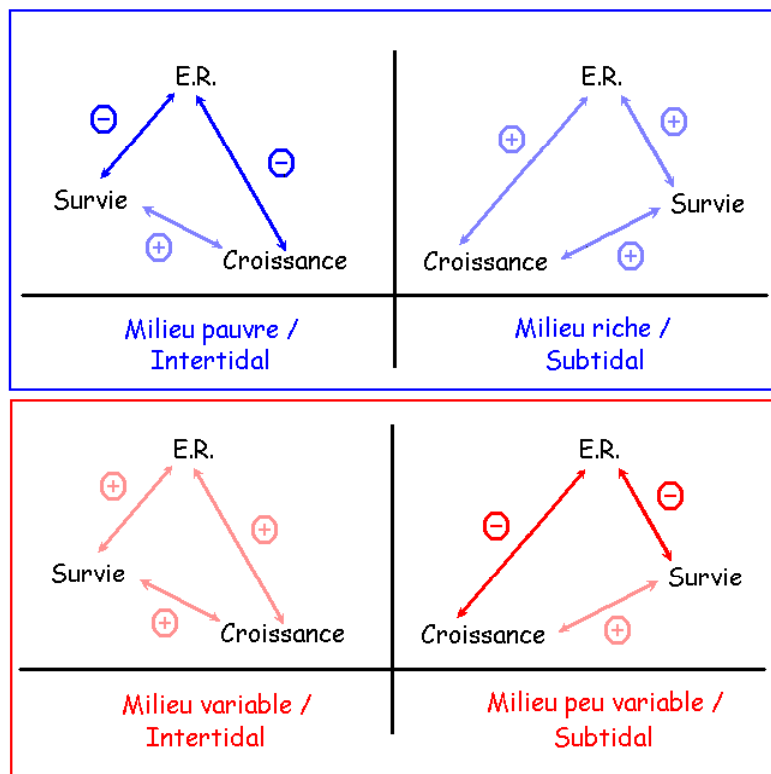


Figure 10 : Evolution des structures de corrélation génétiques entre les environnements, d'après Ernande, 2001.

IV.6. Effort de reproduction et stratégie adaptative de l'espèce

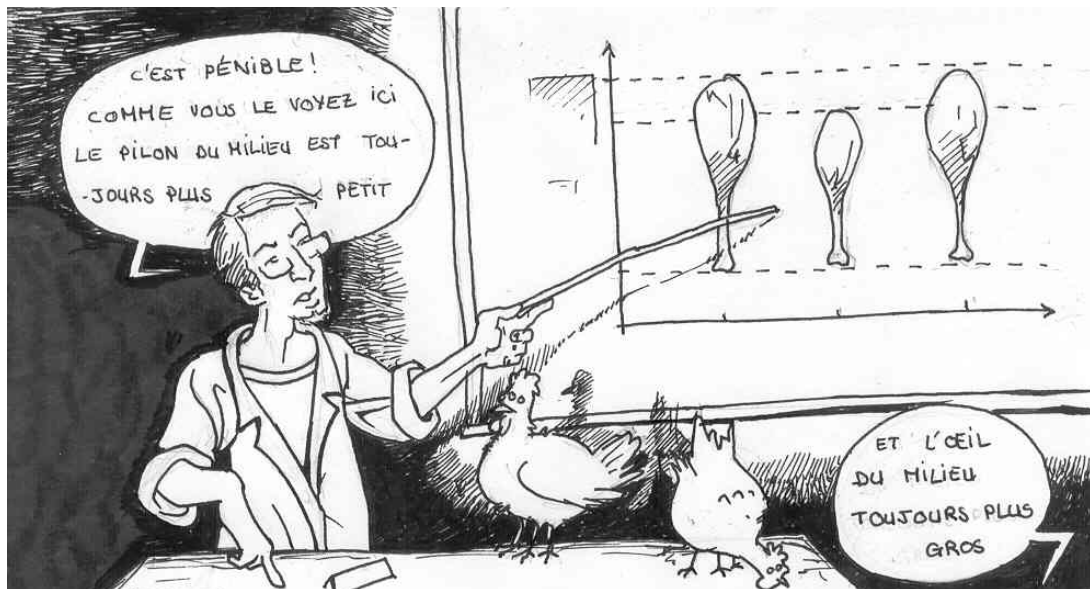
L'importance de l'allocation à la reproduction chez *Crassostrea gigas* génère des trade-offs qui contraignent la réponse phénotypique de l'individu. Elle assure également une forte fécondité à l'espèce qui permet un fort potentiel dispersif encore favorisé par les émissions gamétiques coordonnées à l'échelle d'un banc, et la relativement longue phase larvaire pélagique. Le manque de structuration génétique observé à large échelle dans les populations d'huîtres creuses (Huvet et al., 2000, Meistertzheim, 2008) et chez différentes espèces d'ostréidés (Galindo-Sanchez et al., 2008) par l'utilisation de marqueurs neutres indiquent des états proches de la panmixie, y compris sur de très larges échelles géographiques, et trahissent un fort flux génique entre sous-populations (Huvet et al., 2000). Cette stratégie de dispersion large contraint également la réponse à la sélection de l'espèce, et sa stratégie adaptative à une plus large échelle.

D'abord, le fort potentiel dispersif entraîne un découplage entre l'environnement de sélection des géniteurs, et celui dans lequel se développe leur descendance. Ceci débouche très probablement sur un décalage entre le phénotype de ces derniers, et l'optimum local en terme de fitness (Moran, 1992). Ainsi chez les coraux, certains bancs ne participent pas à la population d'un bassin et voient leurs larves exportées hors des zones favorables au recrutement, tandis que leurs propres effectifs sont alimentés par d'autres bancs (Warner, 1997). L'existence de tels bancs « stériles » peut être également suspectée chez les populations naturalisées de l'huître creuse (I. Bernard, non publié) et pourrait constituer un autre exemple de la persistance de mésadaptation locale entretenue par le flux génique. La variabilité spatio-temporelle rencontrée par les individus sauvages entraîne des succès reproducteurs différents entre génotypes et en fonction des environnements localement rencontrés (Ernande et al., 2004 ; Ernande et al., 2001) (voir paragraphe précédent). L'observation de survies différentielles entre familles et entre environnements d'élevage (Langdon et al., 2003 ; Degremont et al., 2005 ; Evans et Langdon, 2006) et d'une sélection différentielle entre génotypes à des loci allozymiques à très petite échelle spatiale chez diverses espèces de mollusques bivalves (*Crassostrea gigas* : Meistertzheim, 2008, *Pinctada margaritifera* : Arnaud-Haond et al., 2008, *Mytilus edulis* : Koehn et al., 1975) apporte également la preuve de la diversité des stratégies phénotypiques exprimées.

L'interaction de l'hétérogénéité environnementale avec le fort potentiel dispersif contraint très fortement la réponse sélective de l'espèce en contrecarrant l'adaptation locale : le brassage génétique qui intervient à chaque émission gamétique dilue l'adaptation sélectionnée spécifiquement pour un environnement soumis à un régime de variabilité spatio-temporel déterminé en permettant la fécondation croisée d'individus issus d'environnements différents (variation spatiale) et d'âge différent (variation temporelle) (Koehn et al., 1975, Mitton, 1997). La phase larvaire dispersive contribue également à éloigner le site de recrutement du descendant du site de vie de son géniteur. Le cycle complexe (Ernande et al., 2003) et le recrutement sporadique (Warner, 1997) participent également du découplage entre l'environnement « développemental » du géniteur et du descendant.

Le caractère hautement imprévisible, pour le géniteur, des conditions sélectives rencontrées par sa descendance combiné à un important brassage génétique entraîne l'apparition d'une variabilité phénotypique élevée, au détriment de l'adaptation locale (Sultan et Spencer, 2002) en favorisant des stratégies plastiques (Moran, 1992). L'hétérogénéité environnementale combinée aux flux géniques confère un avantage à grande échelle spatio-temporelle à des génotypes plus plastiques, donc plus généralistes, lesquels montrent par définition une forte variabilité pour leurs traits phénotypiques lorsqu'ils sont soumis à une certaine hétérogénéité spatio-temporelle.

L'effort reproducteur élevé de *Crassostrea gigas* constituerait donc une stratégie adaptative visant à maximiser la dispersion et la colonisation de nouveaux habitats, en réponse à l'imprévisibilité des conditions expérimentées localement. Le décalage entre les optimums de fitness sélectionnés à l'échelle de la métapopulation, et ceux sélectionnés localement pour chacune de ses sous-unités (« patch ») traduirait alors le coût adaptatif d'une telle stratégie. La dynamique rapide des populations de *Crassostrea gigas* en Europe semblent accréditer une telle théorie. Les taux de renouvellement (recrutement naturel) très variables, et les mortalités sporadiques affectant une proportion significative des géniteurs dans les populations d'Europe du Sud traduiraient ainsi l'instabilité locale des performances en réponse à la variabilité environnementale. Inversement, l'expansion rapide de l'aire de répartition de l'espèce en Europe du Nord découlerait naturellement de son fort potentiel dispersif.



2^{ème} Partie : Polyploïdie et triploïdie chez *C. gigas*

Avant-propos

Nous le verrons dans ce chapitre, les modifications phénotypiques induites par la triploïdie (et ses conséquences sur la transmission des caractères génétiques) restent encore très mal connues, et sont très dépendantes à la fois du niveau de polyploïdie et de l'organisme considéré. La synthèse bibliographique proposée ici présentera donc d'abord quelques considérations très générales sur les modifications induites par la polyploïdie chez divers modèles animaux et végétaux, avant de faire l'état des connaissances sur les perturbations de la physiologie chez *Crassostrea gigas*. Un dernier chapitre s'intéressera particulièrement aux conséquences génétiques de la polyploïdie sur la transmission des valeurs génétiques des géniteurs diploïdes afin d'introduire certaines notions de génétique quantitative qui seront réutilisées dans les Chapitres II et III des résultats.

I. Généralités sur la polyploïdie

I.1. Polyploïdie, fitness et phénotype

Le terme générique de polyploïdie est employé pour désigner l'état d'un organisme possédant plus de deux jeux haploïdes de chromosomes. La polyploïdie est rencontrée à l'état naturel chez certaines populations de végétaux (Ramsey et Schemske, 1998) ou - plus rarement - d'animaux (Orr, 1990), et le séquençage des génomes a mis en évidence des phénomènes de redondance de gènes chez des organismes diploïdes qui trahissent vraisemblablement des événements de polyploïdisation anciens survenus au cours de l'évolution des espèces (Otto et Whitton, 2000, Panopoulou et Poutska, 2005). L'interprétation évolutive de ces phénomènes reste très discutée (voir Orr, 1990, Otto et Whitton, 2000, Mable 2004 et Comai, 2005): l'existence même de polyploïdes « naturels » suggère que la polyploïdie pourrait conférer un avantage adaptatif à long terme et sous certaines conditions. D'un autre côté, l'apparition de la polyploïdie induit de nombreux bouleversements physiologiques chez les premières générations de polyploïdes (Otto et Whitton, 2000) qui se traduisent très généralement par une baisse de la fitness en populations naturelles (Burton et Husband, 2000, Schranz et Osborn, 2004, Husband, 2004).

L'induction de la polyploïdie altère certains processus biologiques fondamentaux dont l'expression est dépendante du nombre de chromosomes (effet de dosage chromosomique). Ainsi, les mécanismes de divisions cellulaires (mitose et méiose) (Gregory, 2001), l'organisation du génome (Chen, 2007) et le niveau d'expression des gènes (Birchler et al., 2007) montrent tous des perturbations à l'état polyploïde, et celles-ci sont probablement impliquées dans la divergence phénotypique observée entre individus polyploïdes et diploïdes. La polyploïdie « impaire » ($3n$, $5n$, etc.), rarement rencontrée dans le milieu naturel, semble également constituer un facteur aggravant (pour la régulation des effets de dosage chromosomique) si l'on considère le fait que ses effets sur la fitness sont très généralement délétères. La triploïdie est létale chez les mammifères, elle réduit fortement la viabilité des individus chez le poulet (Thorne et al., 1991). Elle a été induite expérimentalement avec succès chez plusieurs espèces de poissons, d'amphibiens et de mollusques (Swarup, 1959 ; Purdom, 1972 ; Allen et Stanley, 1978), mais entraîne très généralement la stérilité des individus concernés. Chez les amphibiens, les reptiles et les

poissons, la triploïdie a parfois été observée en populations naturelles (Allen et Stanley, 1978 ; Zhang et Arai, 1999 ; Otto et Whitton, 2000).

L'induction de la polyploïdie entraîne de nombreuses modifications aux niveaux moléculaire, chromosomique et cellulaire qui à leur tour résultent en une variation du phénotype polyploïde comparé au diploïde (revues dans Otto et Whitton, 2000 ; Comai, 2005). Certains traits phénotypiques présentent ainsi des valeurs transgressives (non comprises dans l'intervalle de variation des valeurs des populations diploïdes) chez les nouveaux polyploïdes (Levin, 1983). A l'échelle évolutive, cette innovation phénotypique permettrait des phénomènes de spéciation rapide sous l'action de la sélection. Des études menées sur des végétaux modèles montrent qu'après l'apparition de la polyploïdie, les lignées « néopolyploïdes » subissent quelques générations d'instabilité physiologique, caractérisées par une forte variabilité phénotypique (Comai et al., 2000 ; Ramsey et Schemske, 2002) au cours desquelles la sélection agit pour ne conserver que les génotypes les plus adaptés (Comai, 2005). S'ils évitent l'extinction, les nouveaux polyploïdes entreraient alors dans un processus de diploïdisation de leur génome au cours duquel la redondance des gènes serait progressivement réduite, à travers l'acquisition éventuelle de nouvelles fonctions – néofonctionnalisation et subfonctionnalisation³ (revue dans Comai, 2005). L'apparition de la polyploïdie au sein d'un groupe résulterait alors en une augmentation du potentiel adaptatif par la diversification à court et à long-terme des trajectoires évolutives possibles.

Dans le contexte de l'amélioration génétique des populations d'élevage, l'induction artificielle de la polyploïdie permet également de générer en une seule manipulation de fortes modifications du phénotype qui peuvent se montrer profitables pour le rendement de production. Le gigantisme de certains organes chez les polyploïdes a été exploité chez les plantes cultivées : certaines variétés tétraploïdes de plantes d'ornement présentent des organes floraux surdéveloppés. De nombreuses patates et betteraves sont triploïdes car elles présentent des tubercules ou des racines plus gros que ceux des diploïdes (Pomme de terre : Marks, 1966 ; Betterave à sucre : Smith et al., 1979 ; Manioc : Sreekumari et al., 1999). De nombreuses céréales cultivées sont des tétraploïdes, généralement produits d'évènements d'hybridation inter-spécifiques (Paterson, 2005). L'induction de la triploïdie permet également la production de fruits sans pépins (citrus : Gmitter et al., 1990, cucurbitacés :

³Néofonctionnalisation : acquisition d'une nouvelle fonction par un gène dupliqué.

Subfonctionnalisation : rétention par des gènes dupliqués de différents composants génétiques d'une fonction commune originale.

McCuiston et Elmstrom, 1993 ; banane : Vandenhout et al., 1995) dont la valeur marchande est ainsi améliorée. Enfin, chez de nombreuses espèces de poissons d'aquaculture et de mollusques, l'investissement reproducteur se fait au détriment de la croissance, et l'induction de la triploïdie permet alors la castration des stocks exploités et une amélioration en conséquence du rendement de production (Beaumont et Fairbrother, 1991).

1.2. La triploïdie chez les espèces d'aquaculture

Parmi les techniques d'amélioration génétique employées en aquaculture, la sélection de lignées pour des caractères d'intérêt, la transgénèse, l'utilisation d'hybrides inter-spécifiques, le testage d'espèces non-autochtones et l'induction de polyploïdie ont été utilisées chez différentes espèces de poissons et de mollusques (Hulata ; 2001, Dunham, 2004). Chez les mollusques toutefois, peu a été fait en termes d'amélioration génétique des performances d'élevage par la sélection (Sheridan, 1997 ; Boudry et al., 2004). Chez ces espèces, l'induction de la triploïdie est la technique la plus employée à ce jour, mais différents pays ont initié des programmes de sélection, ou au moins réalisé les études préliminaires à ceux-ci (voir pour revue Boudry, sous presse).

L'induction de la polyploïdie est particulièrement utilisée en aquaculture pour son fort potentiel d'amélioration ramené à l'effort technique à fournir : elle consiste en effet en une manipulation en une seule étape (contrairement à l'amélioration génétique par la sélection qui met généralement en œuvre plusieurs générations successives et nécessite l'entretien de lignées de géniteurs sélectionnés à plus long terme) qui génère de profondes modifications des traits physiologiques et peut améliorer sensiblement les performances d'élevage.

Chez les poissons d'aquaculture, l'induction de la triploïdie permet de limiter le développement gonadique et les effets délétères de celui-ci sur la croissance et la survie. L'utilisation en pisciculture de salmonidés triploïdes permet ainsi une amélioration de la croissance sur des cycles d'élevages longs, pour lesquels les individus diploïdes pleinement fertiles connaissent un événement de maturation gonadique (Quillet et al., 1988). La triploïdie peut être également être employée comme moyen de castration génétique pour lutter contre l'échappement d'espèces non-autochtones ou éviter la pollution génétique des populations indigènes par hybridation avec des lignées aquacoles (revue dans Hulata, 2001).

Chez les mollusques d'aquaculture, la triploïdisation est la méthode d'amélioration génétique qui a été la plus développée à ce jour. Elle a été testée dès la fin des années 1970 chez les mollusques et a été appliquée à de nombreuses espèces de bivalves, et quelques gastéropodes (Beaumont et Fairbrother, 1991) (Tableau 1). La triploïdisation induit chez toutes ces espèces une réduction du développement gonadique. Selon les espèces et les environnements d'élevage, la triploïdie peut entraîner une amélioration de la croissance somatique et la survie par ré-allocation énergétique de l'énergie consacrée chez les diploïdes à la croissance gonadique. C'est le cas chez la moule *Mytilus edulis* dont les triploïdes montrent des performances de croissance très supérieures à celles des diploïdes après le premier événement de reproduction de ces dernières (Brake et al., 2004). Chez les pétoncles *Argopecten subnudosus* et *Argopecten irradians*, les individus triploïdes présentent un muscle adducteur plus développé, et des niveaux de glycogène supérieurs aux diploïdes (Tabarini, 1984 ; Racotta et al., 2008).

Chez l'huître, la réduction du développement gonadique participe encore plus directement à améliorer la valeur commerciale: alors que les individus diploïdes sont sexuellement matures en période estivale, présentant alors un aspect laiteux et un goût différent, les huîtres triploïdes sont de qualité plus constante au fil des saisons. Enfin, la stérilité partielle induite limite également la dissémination des individus polyploïdes dans le milieu naturel. L'opinion et les pouvoirs publics sont, en Europe et dans un nombre croissant de pays, de plus en plus favorables à la préservation d'une certaine « naturalité » des écosystèmes exploités. La fertilité très réduite des triploïdes permet leur contention génétique en élevage (Piferrer et al., 2007), et apparaît donc comme une condition nécessaire à son utilisation.

Chez l'huître creuse, la part du naissain triploïde dans la production mondiale est en augmentation constante bien qu'il n'existe à notre connaissance aucune donnée publiée permettant de chiffrer cette évolution. En France, l'amélioration des performances d'élevage permise par la triploidie a entraîné une augmentation de la part de naissain triploïde commercialisé par les écloséries, atteignant 78,7% des ventes en 2008 (chiffres : Cultures Marines n° 223, février 2009).

Tableau 1 : Revue des espèces de mollusques chez qui la triploïdie a été induite

Groupe	Espèces	Référence bibliographique
Huîtres	<i>Crassostrea gigas</i> , <i>Crassostrea virginica</i> , <i>Pinctada fucata martensii</i> <i>Crassostrea madrasensis</i> <i>Saccostrea commercialis</i> <i>Ostrea edulis</i>	Beaumont et Fairbrother, 1991 Malia et al., 2006 Kesarcodi-Watson et al., 2001b Hawkins et al., 1994
Pectinidés	<i>Argopecten irradians</i> , <i>Chlamys nobilis</i> , <i>Chlamys varia</i> , <i>Pecten maximus</i> <i>Argopecten ventriculosus</i> <i>Argopecten purpuratus</i> <i>Nodipecten subnodosus</i>	Beaumont et Fairbrother, 1991 Ruiz-verdugo et al., 2000 Lohrmann et Von Brand, 2005 Racotta et al., 2008
Moules	<i>Mytilus edulis</i>	Brake et al., 2004
Palourdes et clams	<i>Mercenaria mercenaria</i> , <i>Mulinia lateralis</i> , <i>Mya arenaria</i> , <i>Ruditapes philipinarum</i> ,	Beaumont et Fairbrother, 1991
Ormeaux	<i>Haliotis discus</i> <i>Haliotis laevigata</i> <i>Haliotis asinina</i> <i>Haliotis rubra</i>	Beaumont et Fairbrother, 1991 Dunstan et al., 2007 Norris et Preston, 2003 Liu et al., 2009

II. La triploïdie chez l’huître creuse

II.1. Méthodes d’induction

Les ovocytes des poissons à fécondation externe et ceux des mollusques achèvent leurs réductions de méiose après leur expulsion dans l’eau de mer (voir Figure 5). L’inhibition de ces réductions par choc thermique, les traitements hyperbares ou chimiques permettent une induction relativement aisée de la polyploïdie chez ces espèces, par la rétention d’un globule polaire contenant un jeu haploïde de chromosomes maternels (10 chromosomes chez l’huître creuse). La triploïdie a d’abord été induite chez différentes espèces de poissons (Epinoche : Swarup, 1959 ; Flet et plie : Purdom, 1972 ; Tilapia : Valenti, 1975). Chez l’huître américaine *Crassostrea virginica*, l’induction de la triploïdie est rapportée dès 1981 (Stanley et al., 1981), et les mêmes méthodes sont appliquées à l’huître creuse *Crassostrea gigas* quelques années plus tard (Allen et Downing, 1986). Chez ces espèces, le blocage de l’expulsion des globules polaires s’effectue généralement par traitement chimique inhibiteur de la méiose (agents cytobloquants) : cytochalasine-B et 6-Diméthylaminopurine (6-DMAP) (Gérard et al., 1999).

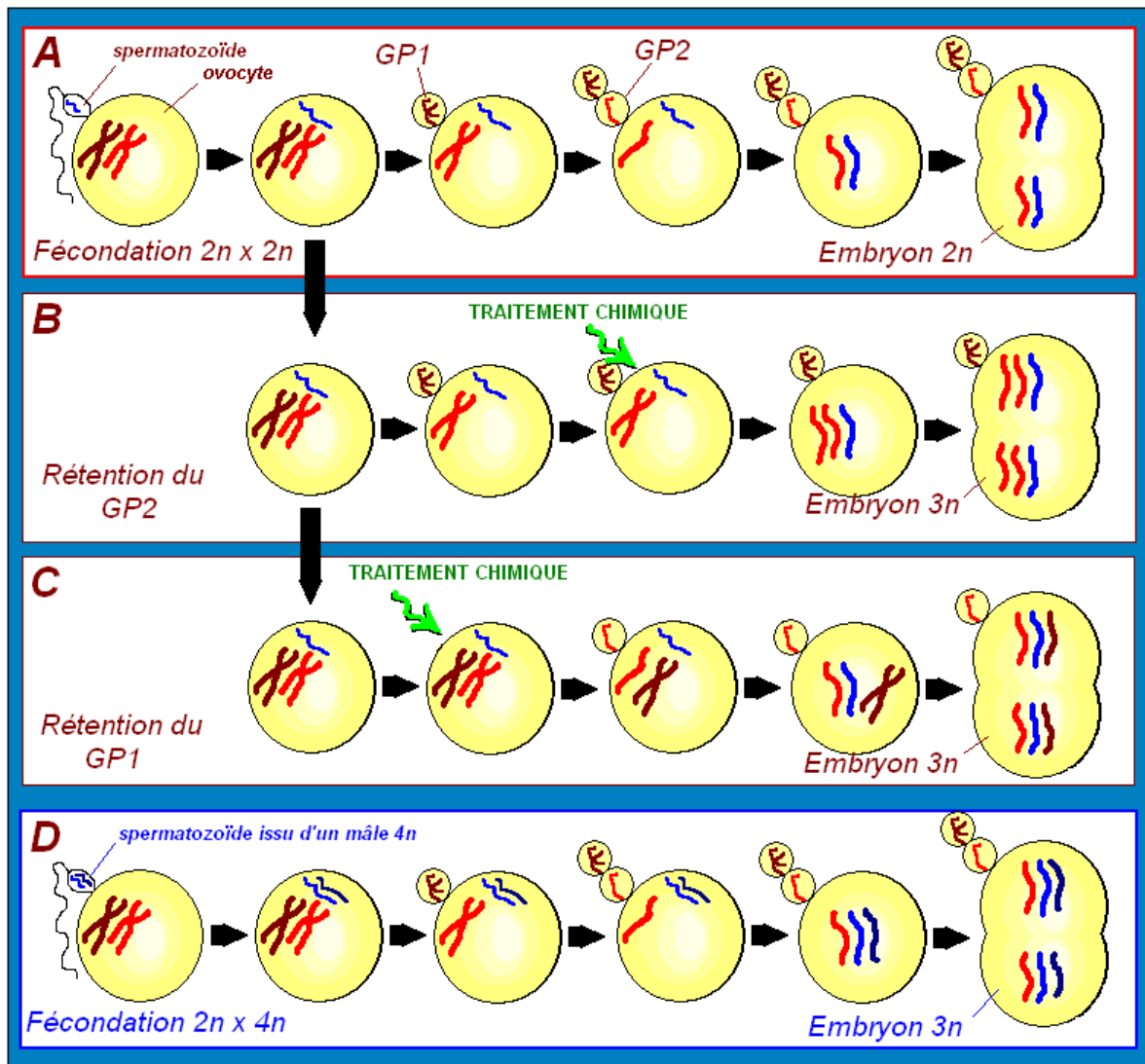


Figure 11 : Schéma de la fécondation et de la ségrégation chromosomique :

- lors d'un croisement $2n \times 2n$ (A),
- lorsque qu'un traitement chimique est appliqué pour l'obtention d'embryons triploïdes par rétention du 2^{ème} GP (B), du 1^{er} GP (C),
- lors d'un croisement $2n \times 4n$ (D).

La rétention du 2^{ème} globule polaire (GP2) (Figure 11.b) est préférée à la rétention du 1^{er} globule polaire (GP1) (Figure 11.c) car elle améliore le succès de triploïdisation et la survie larvaire (Guo et al., 1992). Le traitement est appliqué par adjonction du cytobloquant dans le bécher contenant les ovocytes fécondés en suspension dans l'eau de mer, juste après la fécondation pour une rétention de premier globule polaire, lorsque 50% des GP1 ont été expulsés pour une rétention du 2^{ème} GP (Allen et al., 1989). Dans la mesure où les individus triploïdes obtenus produisent des gamètes de mauvaise qualité (aneuploïdes, voir paragraphe suivant), le maintien de lignées triploïdes par croisements successifs est impossible et oblige à reconduire les manipulations nécessaires à l'induction de la triploïdie pour l'obtention de

chaque génération successive d'individus. La dangerosité des produits cytobloquants, les fortes mortalités qu'ils induisent en phase larvaire (Eudeline, 2004 ; Guo et al., 1996b), et les succès d'induction variables ont encouragé le développement de nouvelles techniques d'induction. Des lignées de géniteurs tétraploïdes ($4n$) ont ainsi été produites : croisés avec des individus diploïdes, ces géniteurs tétraploïdes produisent en effet une descendance complètement triploïde (Figure 11.d) dont la survie larvaire est très supérieure à celle des triploïdes obtenus par induction chimique (Guo et al., 1996b). Cette dernière technique est aujourd'hui la plus employée par les écloséries privées pour la production du naissain triploïde. L'obtention des lignées tétraploïdes s'effectue en induisant la rétention d'un globule polaire (à l'aide des mêmes traitements cytobloquants que ceux employés pour l'induction directe de la triploïdie) lors du croisement d'une femelle triploïde avec un mâle diploïde (Guo et Allen 1994b), ou d'une femelle diploïde avec un mâle tétraploïde (McCombie et al., 2005). Ces individus tétraploïdes sont fertiles, et peuvent donc être reproduits entre eux afin de maintenir les lignées. Dans les paragraphes suivant, nous adopterons la nomenclature proposée par Wang et al. (2002) : les individus triploïdes obtenus par induction chimique et triploïdes obtenus par croisement $4n \times 2n$ seront respectivement appelés $3nCB$ et $3nDT$.

II.2. Modifications des caractères reproducteurs induites par la triploïdie

II.2.a. *Diminution de l'allocation à la reproduction*

Sur un plan quantitatif, l'induction de la triploïdie entraîne une réduction de la quantité de tissu gonadique produite par les huîtres. Allen et Downing (1986) rapportent une occupation gonadique atteignant 34,7% chez les mâles triploïdes et 15% chez les femelles triploïdes contre 79,1% chez les individus diploïdes (respectivement 44% et 19% de l'occupation gonadique des $2n$). Shpigel et al. (1992) estiment l'occupation gonadique des seuls individus triploïdes montrant une gamétogenèse active entre 60 et 80% de celle des diploïdes. Ces mesures d'occupation gonadique chez les triploïdes incluent les tissus auxiliaires, des cellules de la lignée germinales immatures, et matures du fait de l'hétérogénéité de la gamétogenèse de ces individus. La production moyenne de gamètes matures est encore plus réduite chez les

individus triploïdes, comparativement à celle des huîtres diploïdes. La production moyenne d'ovocytes a été estimée à 2% (Guo et Allen, 1994a) et 13,4% (Gong et al., 2004) de la production gamétique des huîtres diploïdes par comptage. Toutefois, lors d'une étude réalisée en Bretagne au cours de l'été caniculaire de 2003, une gonadogenèse exceptionnelle a également été observée (Annexe I) aboutissant à une émission gamétique représentant 30% de la masse de chair pour les individus triploïdes contre 44,4% pour les huîtres diploïdes (67,6 % de la masse de gamètes émis par les 2n). Ces cas d'émissions gamétiques partielles de la part des huîtres triploïdes ont été rapportés dans plusieurs études (Shpigel et al., 1992 ; Allen et Downing 1986 ; Allen et Downing, 1990 ; Gouletquer et al., 1996 ; Annexe I). En dépit de leur effort reproducteur réduit, ces individus semblent en effet capables d'émettre la fraction des cellules de la lignée germinale matures, probablement sous l'impulsion d'un stimulus extérieur. Lorsque l'émission gamétique est partielle ou absente (ce qui semble être le cas le plus courant), les tissus gonadiques non-émis se résorbent avant d'avoir atteint la maturité. La triploïdie induit non-seulement une réduction de la quantité moyenne de tissus gonadiques produite par les huîtres, mais également une augmentation de sa variabilité inter-individuelle. A un instant donné, les individus issus d'un même lot expérimental montrent des stades de maturité gonadique variés, allant d'une stérilité complète à une maturité apparente (Allen et Downing, 1990), alors que des huîtres diploïdes élevées dans les mêmes conditions présentent quant à elles une gamétogenèse beaucoup plus homogène. La production d'ovocytes d'huîtres triploïdes de même âge a ainsi été évaluée entre 0 (stérilité totale) et 21 millions, avec une moyenne à 1,2 millions (Guo et Allen, 1994a).

La variabilité inter-individuelle du caractère, et celle des estimations de l'allocation moyenne d'une publication à l'autre, traduit la forte plasticité de la reproduction chez les individus triploïdes, encore supérieure à celle des diploïdes. Il est probable que cette variabilité inter-individuelle traduise une sensibilité accrue des huîtres triploïdes aux facteurs génétiques, ou environnementaux susceptibles d'influencer l'allocation à la reproduction et aille de pair avec une variabilité spatio-temporelle accrue de l'intensité de la gonadogenèse chez ces individus.

Le développement gonadique significatif et les émissions gamétiques spontanées observées chez les individus triploïdes font de l'huître creuse un cas particulier : aucune publication ne décrit (à ma connaissance) un tel effort de reproduction parmi les espèces de mollusques chez lesquelles la triploïdie a été induite.

II.2.b. *Perturbations de la maturation gonadique*

Chez l'huître creuse comme chez de nombreuses espèces de bivalves (Beaumont et Fairbrother, 1991), de poissons (Devlin et Nagahama, 2002 ; Maxime, 2008) et de plantes (Marks, 1966 ; Ramsey et Schemske, 1998), la triploïdie induit une gamétogenèse anormale qui peut aller jusqu'à une stérilisation complète. Les quelques études histologiques décrivant la gonadogenèse des huîtres triploïdes suggèrent que les premières étapes de maturation des cellules de la lignée germinale se déroulent normalement jusqu'à l'interphase précédant l'entrée en méiose : seule une proportion faible (mais très variable) des gonies atteint alors le stade de cyte primaire, et ce aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Allen et Downing, 1986, voir Annexe I de cette thèse). Cette maturation incomplète se traduit par la persistance de cellules immatures alors que les huîtres diploïdes ont atteint l'apex de leur maturité et pondu (Allen et Downing, 1990). Alors que la gamétogenèse est habituellement homogène et continue chez les diploïdes, des phénomènes de résorption gonadique, de re-maturation ou de changement de sexe (hermaphrodisme) sont observés chez les huîtres triploïdes au cours d'une seule saison de maturation gonadique (Allen et Downing, 1990). La tendance à l'atrésie est particulièrement marquée chez les huîtres triploïdes : des phénomènes de résorption gonadique sont souvent observés chez les individus triploïdes avant tout signe d'émission gamétique (Allen et Downing, 1990, Shpigel et al., 1992). Les perturbations de la gamétogenèse observées chez *Crassostrea gigas* (maturation incomplète du tissu gonadique suivie de phénomènes de résorption) ont également été décrites chez les autres espèces de bivalves triploïdes (*Nodipecten subnodosus*, Maldonado-Amparo et al., 2004 ; *Chlamys nobilis*, Komaru et al., 1988 ; *Mya arenaria*, Allen et al., 1986 ; *Saccostrea commercialis*, Cox et al., 1996) et semblent constituer une conséquence directe de l'induction de la triploïdie.

II.2.c. *Perturbations de la ségrégation chromosomique*

La ségrégation chromosomique lors de la méiose est également altérée chez les huîtres triploïdes. Chez les diploïdes, les chromosomes homologues appariés en bivalents ségréguent symétriquement dans les cellules filles (gamétocytes II) à l'anaphase I. Chez les individus triploïdes, les trivalents sont répartis entre les deux cellules filles à raison d'un chromosome dans l'une et deux chromosomes dans l'autre (Gong et al., 2004), chacun des 10 trivalents

cède un ou deux chromosomes aléatoirement à l'un ou l'autre des gamétocytes II (Figure 12) . Cette ségrégation aléatoire abouti à la formation de gamètes majoritairement aneuploïdes présentant 15 chromosomes (1,5n) en moyenne, avec des distorsions de ségrégation récurrentes (plus ou moins quelques chromosomes) (Guo et Allen, 1994a, Normand, 2005). Des croisements $2n \times 3n$ ont montré que le pouvoir fécondant de ces gamètes n'était pas inférieur à celui de gamètes issus de géniteurs diploïdes, mais qu'ils produisent une descendance composée majoritairement d'individus aneuploïdes totaux⁴ peu viables, accompagnés d'huîtres diploïdes, triploïdes et parfois tétraploïdes (Guo et Allen, 1994a ; Gong et al, 2004). Ce type de ségrégation aléatoire des chromosomes en méiose a également été observé chez les végétaux (Ramsey et Schemske, 1998) et les poissons triploïdes (Linhart et al., 2006) (Figure 13).

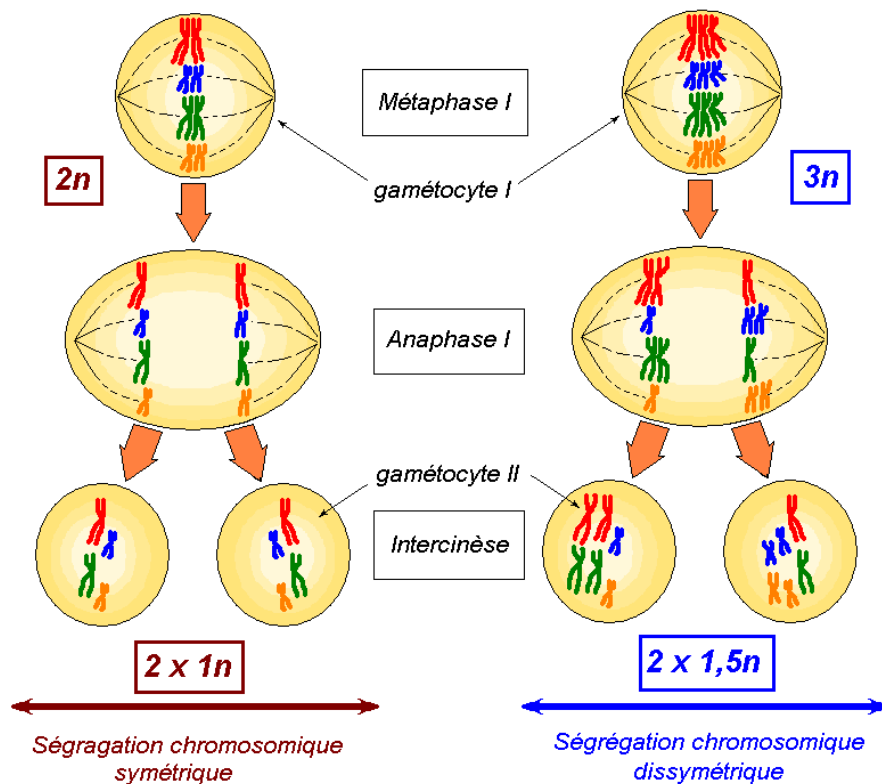


Figure 12 : Schéma de la ségrégation de 4 chromosomes (les chromosomes homologues sont représentés de la même couleur) lors de la première division de méiose : à gauche, ségrégation chromosomique symétrique chez un individu diploïde, à droite, ségrégation chromosomique dissymétrique chez un individu triploïde.

⁴ Aneuploïde total : l'aneuploïdie désigne l'état chromosomique d'une cellule ou d'un groupe de cellules dont le nombre de chromosomes n'est pas un multiple entier du nombre de chromosomes du jeu haploïde de l'espèce (ex : $1,5n$), par opposition à l'euploïdie (nombre entier : $1n, 2n, 3n$ etc.). On parle d'aneuploïdie totale lorsque toutes les cellules de l'individu descendent d'un zygote aneuploïde et sont donc aneuploïdes, tandis que l'aneuploïdie partielle désigne des cellules aneuploïdes isolées chez un individu majoritairement euploïde.

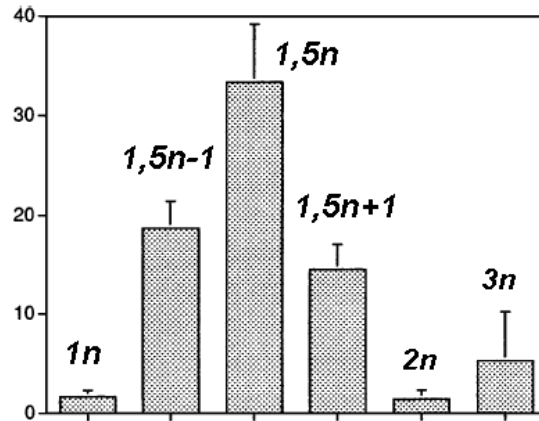


Figure 13 : Fréquences des cytotypes polliniques euploïdes (1n, 2n et 3n), et aneuploïdes (1,5n, 1,5n - 1 et 1,5n + 1) (tiré de Ramsey et Schemske, 1998).

II.2.d. Triploïdie et déterminisme du sexe

Chez *Crassostrea gigas*, la triploïdie semble entraîner une augmentation du nombre d'hermaphrodites observés dans les lots expérimentaux (Allen et Downing, 1990 ; Nell, 2002, Annexe I) mais aucune étude ne rapporte à notre connaissance un changement significatif de la proportion de mâles comparée à celle des femelles. La triploïdie est pourtant connue pour induire des changements importants des sexe-ratio observées chez diverses espèces où le déterminisme du genre sexuel est génétiquement contrôlé :

- Chez les bivalves *Mya arenaria* et *Argopecten ventricosus* l'induction de la triploïdie augmente la fréquence d'apparition des femelles (Allen et al., 1986 ; Ruiz-Verdugo et al., 2000),
- Chez la moule *Mytilus edulis*, elle entraîne la production de lots présentant 100% d'individus de sexe masculin,
- Chez le poulet, elle n'est viable que chez les individus présentant un génotype « inter-sex » (ZZW) ou mâle (ZZZ), qui sont au demeurant stériles. La mortalité qu'elle induit chez les « femelles » (ZWW) entraîne un biais évident de la sexe-ratio entre individus diploïdes et triploïdes (Thorne et al., 1991),

L'absence d'effet de la triploïdie sur la sexe-ratio des huîtres creuses pourrait traduire l'absence ou la faiblesse du déterminisme génétique du sexe chez cette espèce. Le nombre restreint d'études ne permet toutefois pas de conclure de manière définitive sur le sujet.

II.2.e. Stérilité partielle et triploïdie

A l'heure actuelle, les processus biologiques induits par la triploïdisation et provoquant le blocage partiel de la lignée germinale chez l'huître restent méconnus. Une hypothèse couramment invoquée pour expliquer la stérilité des triploïdes tient au caractère non-balancé de leur génome qui induit des difficultés lors de la formation des synapses en prophase I de la méiose (Crane et Sleeper, 1989). L'association aléatoire des chromosomes en univalents, bivalents, ou trivalents perturbe également la ségrégation chromosomique à l'anaphase I (Allen et Downing, 1986). Ces irrégularités dans la méiose entraîneraient alors la dégénérescence des cellules de la lignée germinale sous le contrôle de mécanismes de régulation internes (pachyten checkpoint) (Li et al., 2009b). Les mécanismes de régulation contrôlant l'appariement des chromosomes au stade précédant l'entrée en méiose participeraient ainsi à réduire le nombre de cellules de la lignée germinales subissant les dernières phases de la gamétogenèse chez les mollusques triploïdes.

Comme le font remarquer Allen et Downing (1990), les difficultés liées à une ségrégation chromosomique irrégulière ne peuvent toutefois pas être incriminées pour expliquer la réduction de la production d'ovocytes des triploïdes femelles puisque les réductions de méiose des ovocytes n'interviennent qu'après leur émission dans l'eau de mer. Ensuite, le blocage partiel des lignées germinales semble se produire chez ces espèces entre le stade gonial et gaméocyte I, soit dès l'interphase précédant l'entrée en méiose alors que les mécanismes de contrôle de la ségrégation chromosomique interviennent après.

L'étude chez les triploïdes de l'expression génétique d'*Oyster vasa-like*, gène impliqué dans les premières étapes de la gamétogenèse chez l'huître creuse diploïde (Fabioux et al., 2004 ; Raguènes 2006) montre également des résultats confondants. Alors que le développement gonadique de ces individus triploïdes est connu pour être réduit, le niveau moyen de transcrit mesuré apparaît significativement supérieur à celui des diploïdes. Cette sur-expression pourrait signifier que la perturbation de la gonadogenèse intervient chez les triploïdes après les étapes associées à l'activation de ce gène, ou que le niveau de transcrit d'*Oyvlg* mesuré n'est pas directement proportionnel à la quantité de tissus gonadiques développés (Figure 14).

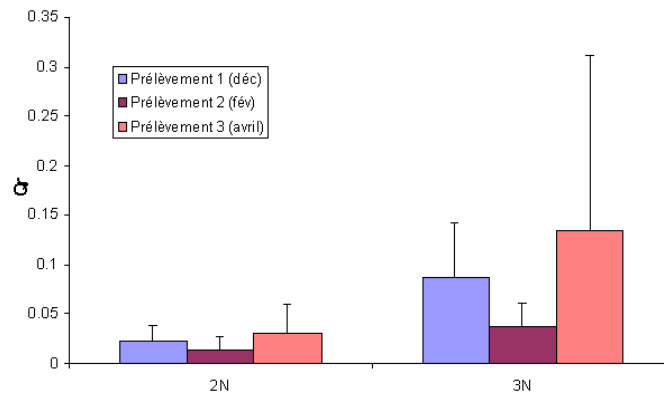


Figure 14 : Moyennes des quantités relatives de transcrits Oyvlg mesurés par PCR-quantitative pour des huîtres diploïdes (à gauche) et triploïdes (à droite) (tiré de Raguènes, 2006)

II.3. Modifications des performances de croissance et de survie induites par la triploïdie

II.3.a. Amélioration de la croissance

La triploïdie entraîne une augmentation de la croissance chez l’huître creuse, parfois dès le stade larvaire. Eudeline (2004) rapporte ainsi une taille supérieure pour des larves triploïdes obtenues par croisement 2n x 4n qui atteignent 347 μm à la fixation, contre 320 μm pour les lots diploïdes et triploïdes obtenus par rétention d’un globule polaire. A J1 post-fécondation, Guo et al. (1996) rapportent des tailles larvaires très supérieures pour les lots 3nDT obtenus à partir d’ovocytes tétraploïdes (eux-mêmes plus gros que les ovocytes diploïdes). A J8, lors de la même étude, la taille moyenne des larves triploïdes 3nDT (133-148 μm) était supérieure à celle des lots 2n (116 μm), 4n (113 μm) et 3nCB (114 μm). Les mêmes observations ont été réalisées chez l’huître *Saccostrea madrasensis* (Mallia et al., 2006). Au contraire, une publication fait état d’une absence notable d’effet de la triploïdie ou de la méthode d’induction (rétention de globule polaire I et II, traitement à la cytochalasine B ou au 6-DMAP) sur la croissance larvaire, (Gérard et al., 1999) lors d’une étude à grande échelle portant sur la comparaison de 14 expérimentations successives d’induction de la triploïdie. Il faut remarquer que chez *Crassostrea gigas*, la survie larvaire est généralement très variable et qu’elle influence fortement la croissance d’un lot d’élevage à travers la densité et la disponibilité en nourriture (Robert et Trintignac, 1997). La forte variabilité de la survie

larvaire rapportée entre lots triploïdes obtenus par différentes méthodes d'induction et lots diploïdes contribue très probablement à rendre difficilement comparable les performances de croissance larvaire d'une expérimentation à l'autre, d'autant que les densités d'élevages sont rarement considérées dans les études citées ici. Dans ce contexte, les observations ponctuelles d'une croissance larvaire améliorée chez les triploïdes ne devraient sans doute pas être interprétées comme la démonstration d'un effet direct de la triploïdie.

Chez *Crassostrea gigas*, la triploïdie induit avant tout une amélioration de la croissance très significative après la métamorphose (Allen et Downing, 1986 ; Shpigel et al., 1992 ; Gouletquer et al., 1996) rapportée dès le cinquième mois d'élevage (Hawkins et al., 2000), plus généralement après un an (Bouquet, 2000 ; Nell, 2002). Cet avantage s'exprime différemment selon les conditions d'élevage : alors que le taux de croissance des huîtres creuses triploïdes est seulement légèrement supérieur à celui des huîtres diploïdes en Tasmanie (Nell, 2002), il est en moyenne quatre fois plus important en Californie (Allen et Downing, 1986). Une autre étude rapporte les performances d'un même lot d'huîtres triploïdes dans plusieurs environnements : celui-ci présente ainsi un poids total supérieur de 16 % au témoin diploïde à la fin du deuxième automne lorsqu'il est élevé sur un site de Normandie, supérieur de 20 % dans un site du littoral charentais, mais identique au cours d'une saison d'élevage en claire (Gérard et al., 1993). L'avantage à la croissance des triploïdes s'exprime généralement après l'émission gamétique des diploïdes : alors que les huîtres diploïdes peuvent perdre jusqu'à 75 % de leur poids total de chair lors de l'émission gamétique (Deslous-Paoli et Héral, 1988), les huîtres triploïdes, qui développent moins de gamètes matures que les diploïdes n'émettent pas ou peu de produits séminaux et perdent donc moins de poids lors de la fraie. (Figure 15) (Gouletquer et al., 1993). Ce phénomène peut être interprété comme un mécanisme propre aux triploïdes de ré-allocation énergétique de la reproduction vers la croissance, et explique probablement les tailles supérieures observées chez les triploïdes de nombreuses espèces de bivalves (*Ostrea edulis* : Hawkins et al., 1994 ; *Mulinia lateralis* : Guo et Allen, 1994c ; *Mytilus edulis* : Brake et al., 2004 ; *Saccostrea glomerata* : Hand et al., 2004), et chez les salmonidés d'élevage (Quillet et al., 1988).

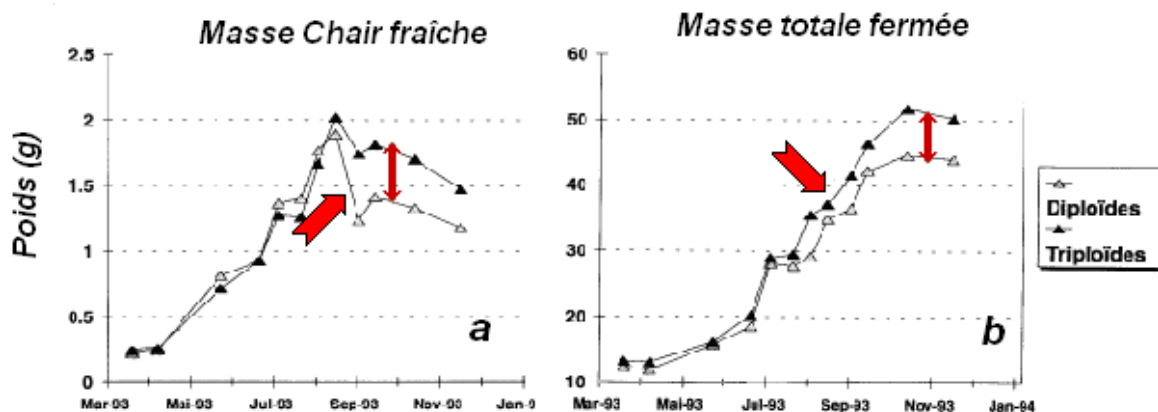


Figure 15 : Suivis comparés de croissance entre des huîtres diploïdes et triploïdes élevées en milieu naturel : a) évolution annuelle de la masse de chair sèche⁵ (en g) d’huîtres creuses diploïdes et triploïdes (la flèche rouge simple pointe l’émission gamétique); b) évolution annuelle de la masse totale fermée⁶ (en g). L’avantage à la croissance des triploïdes est symbolisé par la double flèche rouge (d’après Gérard et al., 1993).

II.3.b. Amélioration de la survie

Pour la survie larvaire, il faut discerner les effets induits par la méthode d’induction au sens strict, et les effets intrinsèquement induits par la triploïdisation. Ainsi, l’induction chimique de la triploïdie entraîne de fortes mortalités dans les heures qui suivent le traitement (plus de 95% au premier jour d’élevage) (Eudeline, 2004 ; Guo et al., 1996) alors que la survie larvaire moyenne des individus 3nDT semble identique à celle des diploïdes. Une étude comparative des performances larvaires d’individus diploïdes, triploïdes issus de croisement 4n x 2n, et triploïdes obtenus par induction chimique rapporte des survies post-fixation de (respectivement) 1,66%, 3,38% et 0,003% (Guo et al., 1996b). Le différentiel de survie entre 2n et 3nDT peut difficilement être considéré comme significatif dans la mesure où la survie larvaire des individus diploïdes de *Crassostrea gigas* est elle-même très variable. Les fortes mortalités observées pour les lots 3nCB sont quant à elles très répétables et résultent directement de la forte toxicité des molécules cytobloquantes employées pour l’induction (Eudeline, 2004 ; Guo et al., 1996b). Après les mortalités des premiers jours, il semble que la survie larvaire des lots 3nCB soit similaire à celle des diploïdes (Eudeline, 2004).

La survie des huîtres creuses triploïdes adultes est en général un peu meilleure que celle des individus diploïdes : lors de caractérisations réalisées en France dans le cadre du programme

⁵ La masse de chair sèche est mesurée par la pesée de la totalité des tissus mous (par opposition à la coquille) de l’animal, après séchage à 60°C pendant 48 h.

⁶ La masse totale fermée est mesurée par la pesée de l’animal entier avant ouverture.

d'étude du syndrome de mortalité estivale, elle était supérieure à celle d'un pool de familles diploïdes non-sélectionnées (respectivement 94.9 % de survie contre 87.6 %, valeurs moyennées pour un été de suivi, 3 sites de testage) (Boudry et al., 2008). A l'inverse, Cheney et al. (2000) font état d'une plus grande sensibilité de ces mêmes individus triploïdes lors d'épisodes de mortalité estivale aux U.S.A. Lors d'une campagne de comparaison multi-sites réalisée au Mexique (Ascencio Michel, 2008), les huîtres triploïdes ont montré, tout comme les individus diploïdes, des taux de mortalités très variables entre les stations. La dynamique de mortalité de ces lots triploïdes était parfaitement synchronisée avec celle des diploïdes, et dans la plupart des stations (5 cas sur 6), ils montraient également une résistance légèrement supérieure (+ 2% en moyenne). Là encore, la forte hétérogénéité des taux de survie moyens rapportés entre les études (de 30 à 67 % pour une période d'élevage de 8 mois) traduit l'influence prépondérante des conditions environnementales sur la survie des huîtres.

II.3.c. Croissance supérieure, hétérosis et gigantisme polyploïde

Plusieurs explications ont été avancées pour expliquer l'amélioration du taux de croissance des huîtres triploïdes. Tout d'abord, l'augmentation du nombre de chromosomes augmente également le nombre d'allèle à chaque locus et pourrait donc entraîner un effet d'hétérosis. Certaines publications rapportent effectivement une corrélation entre la méthode d'induction, l'hétérozygotie multi-locus des individus et leur taux de croissance (Hawkins et al., 1994 ; Hawkins et al., 2000, Wang et al., 2002) : les triploïdes obtenus par rétention du premier globule polaire (3nCB-MI) montrant ainsi une hétérozygotie et des performances accrues par rapport aux triploïdes obtenus par rétention du second globule polaire (3nCB-MII), et des individus diploïdes apparentés. Le fait de savoir si cette corrélation entre hétérozygotie des lots et croissance 1) impliquait une relation de causalité 2) pouvait être impliquée dans la croissance supérieure des triploïdes a été longuement débattu pour plusieurs raisons. D'une part, les triploïdes MI montrent généralement une survie extrêmement réduite par rapport aux triploïdes MII (Hawkins et al., 2000), qui n'a pas été prise en compte pour qualifier les performances de ces individus. D'autre part, d'autres travaux n'ont détecté aucune corrélation entre l'hétérozygotie multi-locus et la croissance chez des individus triploïdes MI et MII (Nell, 2002), ou entre l'hétérozygotie et le budget énergétique chez des individus diploïdes et triploïdes (Mason et al., 1988). Enfin, l'hétérozygotie comme l'induction de la triploïdie génèrent par essence des réponses non-additives sur les traits phénotypiques étudiés (en

l'occurrence, une augmentation du taux de croissance), et la discrimination des effets de l'une et de l'autre nécessite des plans d'expérimentations particuliers qui n'ont jamais été appliqués à notre connaissance aux mollusques triploïdes. Chez d'autres modèles où ce type d'études a été mené, les résultats ne semblent pas non plus accréditer la thèse d'un effet d'hétérozygotie intrinsèquement induit par la polyplôïdie puisque les séries de ploïdie du planaire *Schmidtea polychroa* (D'Souza et al., 2008) montrent plutôt une corrélation négative entre fitness et niveau de ploïdie et que les individus tétraploïdes de *Zea mays* montrent quant à eux une taille significativement plus réduite que les diploïdes (Riddle et al., 2006).

La seconde hypothèse communément évoquée pour expliquer l'amélioration de la croissance constatée chez les individus triploïdes tient à l'augmentation de la quantité de matériel chromosomique, qui pourrait résulter en un accroissement du volume nucléaire et cytoplasmique pour conserver le rapport nucléo-cytoplasmique (Guo et al., 1996b, Wang et al., 2002). L'augmentation de la taille des cellules devrait alors finalement déboucher sur un « gigantisme polyplôïde » de l'organisme dans son entier. Cette corrélation entre la quantité de matériel chromosomique et le volume cellulaire a été observée pour les érythrocytes chez de nombreuses espèces animales (Gregory, 2001), et notamment chez les salmonidés polyplôïdes (Small et Benfey, 2005). Les ovocytes des huîtres creuses tétraploïdes sont également connus pour être plus gros que ceux des diploïdes (Guo et al., 1996b). Notons toutefois que chez les animaux polyplôïdes, l'hypertrophie des cellules est généralement compensée par une réduction de leur nombre (hypoplasie) et n'entraîne pas d'augmentation de la croissance (Otto et Whitton, 2000). Chez le pétoncle *Argopecten ventricosus*, et les huîtres *Crassostrea gigas* et *Saccostrea glomerata* triploïdes, certaines observations rapportent une hypertrophie du muscle adducteur (Gardner et al., 1996 ; Palacios et al., 2004). Comme le font remarquer les auteurs, il n'est pas sûr que cette hypertrophie résulte d'une augmentation du volume cellulaire directement entraînée par la triploïdie. Elle pourrait également découler de la réduction du développement gonadique chez ces individus triploïdes puisque le muscle constitue un tissu de stockage des réserves énergétiques, mobilisées précisément pour la gonadogenèse. Chez les huîtres creuses triploïdes et tétraploïdes, certaines cellules libres (gamètes), ou circulantes (hémocytes) pourraient également être plus grosses que chez les individus diploïdes. A notre connaissance, il n'existe aucune étude publiée documentant une éventuelle augmentation généralisée du volume des cellules somatiques chez les huîtres creuses triploïdes, ou une réduction de la densité cellulaire.

Remarquons enfin que les hypothèses d'hétérosis et de gigantisme polyplôïde impliquent que les individus triploïdes tireraient un meilleur parti en terme de croissance de l'énergie acquise

par la nutrition. Cette dernière assertion n'a à notre connaissance jamais été vérifiée expérimentalement : les études menées en écophysiologie chez des individus triploïdes de *Mya arenaria* (Mason et al., 1988), de *Crassostrea gigas* (Haure et al., 2003, Berthollet-Marolle, 2007), ou de *Saccostrea commercialis* (Kesarcodey-Watson 2001a et b), n'ont montré aucun différentiel de bilan énergétique susceptible d'expliquer la croissance supérieure des individus triploïdes.

II.3.d. Stérilité partielle et ré-allocation énergétique

La dernière hypothèse proposée pour expliquer l'avantage de croissance des huîtres triploïdes comparées aux diploïdes tient en une différence d'allocation aux composantes du budget énergétique (croissance somatique, gonadique, et maintenance) plutôt qu'à une augmentation globale du budget énergétique par hétérozygotie, ou gigantisme polyploïde (Kesarcodey-Watson, 2001a). Selon cette hypothèse, la diminution de l'allocation à la reproduction devrait s'accompagner d'une ré-allocation de l'énergie vers la croissance somatique et la survie chez les huîtres triploïdes, dont les performances seraient alors inversement corrélées au développement gonadique, à l'issue d'un événement de reproduction des diploïdes. Ceci est très largement accrédité par les données expérimentales qui font état de l'expression de l'avantage des triploïdes à l'issue d'un événement de reproduction des diploïdes, et ce mécanisme constitue probablement la raison principale de la croissance supérieure de ces individus $3n$ (Allen et Downing, 1990 ; Kesarcodey-Watson, 2001a, Garnier-Géré et al., 2002). On pourra distinguer deux modalités aux conséquences différentes pour ce phénomène (Figure 16) (pour une explication détaillée du formalisme employé, voir Partie I de l'Introduction) :

- Soit l'effort de reproduction des huîtres triploïdes est intrinsèquement plus faible que celui des individus diploïdes ($u_{3n} < u_{2n}$), ce qui entraîne de facto l'augmentation des efforts de croissance somatique et de maintenance ($[v_{3n} + w_{3n}] > [v_{2n} + w_{2n}]$, car $u + v + w = I$) (Figure 16.b).
- Soit l'effort de reproduction des huîtres triploïdes est identique à celui des individus diploïdes, mais des phénomènes d'atrésie des tissus gonadiques permettent la remobilisation de l'énergie allouée à la croissance gonadique et sa ré-allocation à la croissance somatique et à la maintenance (Figure 16.c). Les efforts de reproduction, croissance somatique, et maintenance sont donc identiques entre huîtres diploïdes et

triploïdes ($u_{3n} = u_{2n}$, $v_{3n} = v_{2n}$ et $w_{3n} = w_{2n}$), mais le déclenchement de l'atrésie permet de convertir à nouveau l'énergie allouée en croissance gonadique ($R \cdot u_{3n}$) en énergie disponible pour les autres fonctions selon un coefficient d'efficacité r ($r < 1$) (Kooijman, 2000). Ainsi, chez les individus 2n et 3n hors période d'atrésie : Allocation à la maintenance + Allocation à la croissance somatique = $R \cdot w + R \cdot v$, alors que chez les individus 3n en période d'atrésie : Allocation à la maintenance + Allocation à la croissance somatique = $R \cdot w + R \cdot v + w \cdot [r \cdot (R \cdot u)] + v \cdot [r \cdot (R \cdot u)]$

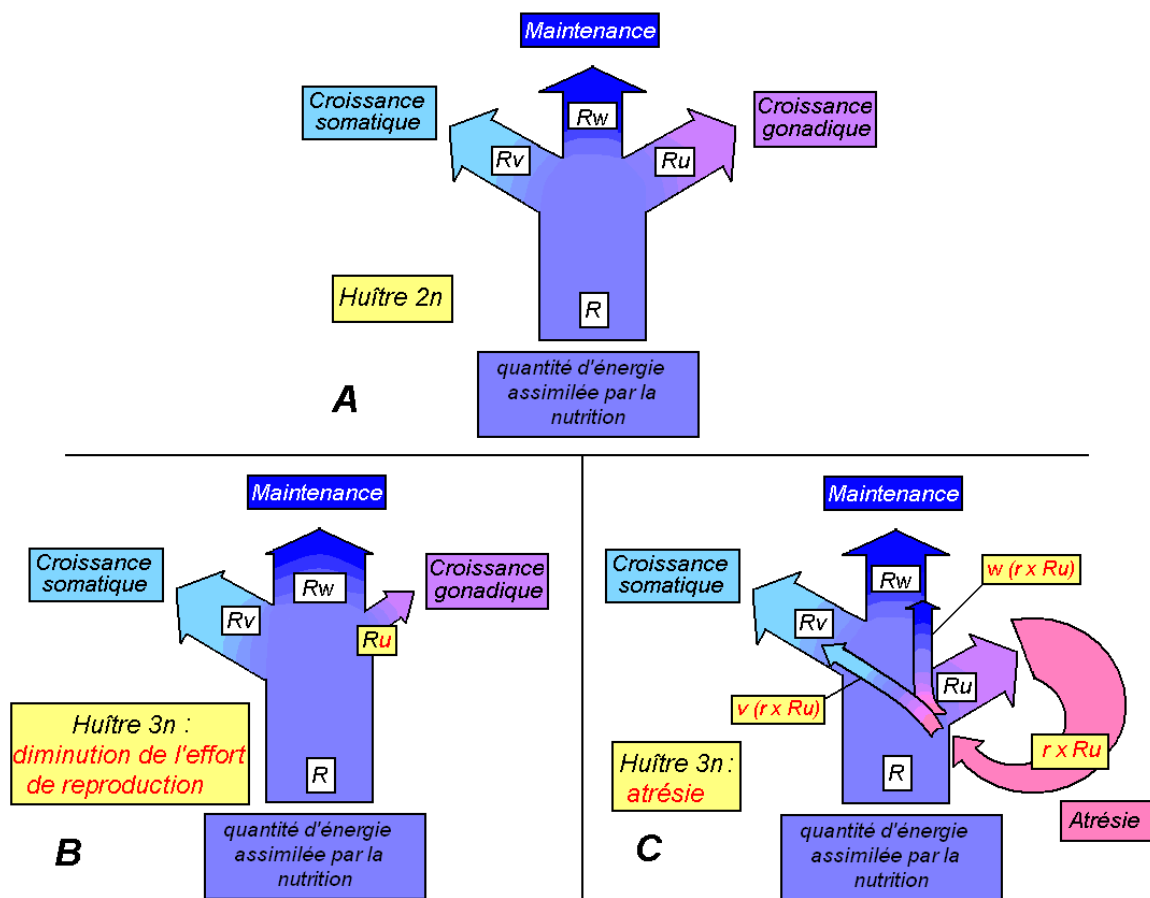


Figure 16 : Allocation différentielle de l'énergie entre les fonctions physiologiques : A) chez un individu diploïde ; B) chez un individu triploïde en considérant l'hypothèse d'une diminution de l'effort reproducteur telle que $u_{3n} < u_{2n}$ et $[v_{3n} + w_{3n}] > [v_{2n} + w_{2n}]$; C) chez un individu triploïde en considérant l'hypothèse d'une re-mobilisation de l'énergie allouée à la reproduction par atrésie telle que : allocation à la croissance somatique = $Rv + v \cdot (r \cdot Ru)$ et allocation à la maintenance = $Rw + w \cdot (r \cdot Ru)$ pendant l'atrésie.

II.4. Interaction de la triploïdie avec la transmission des valeurs génétiques parentales : le point de vue de la génétique quantitative

La triploïdie induit également de profondes modifications de l'expression des traits phénotypiques quantitatifs génétiquement déterminés qui pourraient être reliées aux perturbations observées pour l'expression des gènes (Chen, 2007) et qui semblent, là encore, très dépendantes de l'espèce et du trait considérés. Les quelques études qui s'intéressent aux interactions entre polyploïdie et la transmission des valeurs génétiques parentales rapportent les effets suivants :

La polyploïdie peut montrer un effet très significatif sur les valeurs phénotypiques moyennes de la descendance, indépendamment des valeurs génétiques familiales ('odd-ploidy effect') (Riddle et al., 2006). Chez le planaire *Schmidtea polychroa*, le nombre de copies du génome haploïde de l'espèce (de 1 à 5 en populations naturelles) est ainsi inversement proportionnel à la fitness (D'Souza et al., 2008).

La polyploïdie peut également interagir avec la valeur génétique, en montrant un effet d'additivité des valeurs parentales du géniteur qui contribue le plus au génotype de la descendance polyploïde. Ainsi, chez les salmonidés triploïdes, la femelle contribue pour 2/3 au génome contre 1/3 pour le mâle et la part de la variance des traits phénotypiques attribuable à un effet génétique maternel semble globalement augmentée (et la part paternelle diminuée) (Blanc et al., 2005 ; Jonhson et al., 2007).

L'interaction entre le niveau de ploïdie et la valeur génétique peut également entraîner une rupture de la corrélation génétique entre individus diploïdes et triploïdes (Figure 12). Un changement de rang de classement des familles a ainsi été observé entre saumons diploïdes et triploïdes (Withler et al., 1995) pour des traits tels que la smoltification, la survie, et le poids, et chez la truite arc-en-ciel pour des traits liés à la croissance (poids, taux de croissance et indice de condition) (Blanc et al., 2001). Chez le maïs, certains traits phénotypiques liés à la croissance montrent à la fois une réponse moyenne commune à l'induction de la polyploïdie, et un effet de la ploïdie dépendant de la lignée (Riddle et al., 2006).

Sur un plan théorique, la polyploïdie devrait également induire l'augmentation de la part non-additive du composant génétique de la variance phénotypique. Des modèles de décomposition de variance similaires à ceux utilisés en génétique quantitative pour le calcul des paramètres

génétiques chez les diploïdes (Lynch et Walsh, 1998) ont été établis chez les tétraploïdes (Gallais, 1989) comme chez les triploïdes (Wu, 1995). Logiquement, l'augmentation du nombre de chromosomes chez les polyploïdes multiplierait le nombre d'interactions possibles entre les composants génétiques de la variance, et pourrait favoriser l'expression de l'overdominance, augmenter le nombre potentiel d'interactions entre gènes et entre les génomes nucléaires et cytoplasmiques (Etterson et al., 2007).

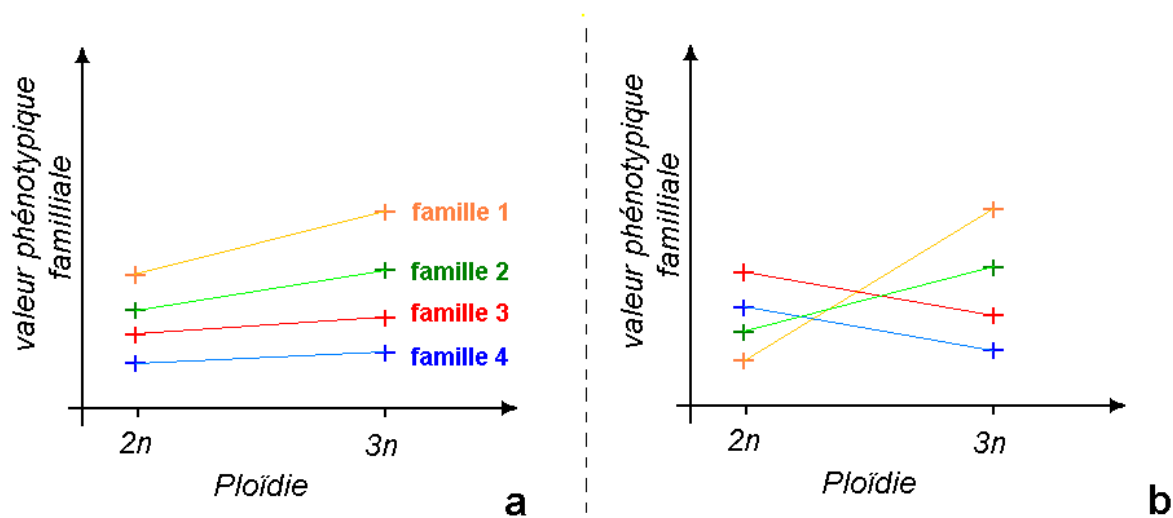


Figure 17 : Covariation des valeurs génétiques chez des individus apparentés diploïdes et triploïdes a) en l'absence d'interaction génétique x ploïdie et b) dans le cas d'une absence de corrélation génétique (interaction génétique x ploïdie).

Les phénomènes d'interaction de les effets de la triploïdie avec les valeurs génétiques des diploïdes font l'objet d'une attention particulière puisqu'ils ont été mis en évidence chez des espèces agricoles qui font l'objet de recherche en amélioration génétique. Comme le font remarquer les auteurs, un changement de rang systématiquement observé entre les performances des individus diploïdes et triploïdes pourrait considérablement freiner l'amélioration génétique des polyploïdes par la sélection (Blanc et al., 2005). Dans ce cas en effet, la sélection des familles diploïdes performantes ne permettrait pas de s'assurer du gain de sélection dans leur descendance triploïde, et nécessiterait alors un testage direct des performances de cette dernière. De plus, les triploïdes sont majoritairement stériles et ceci interdit bien sûr les croisements successifs pour le maintien et la production de lignées triploïdes présentant des caractères souhaitables pour la production.

Problématique & Approches expérimentales



1^{ère} Partie :

Problématique de l'étude
& Approches expérimentales

I. Problématique de l'étude

Les travaux que nous présentons ci-après se sont intéressés à la quantification et à la qualification du développement gonadique des huîtres creuses triploïdes. Les précédentes études publiées font en effet état d'une augmentation de la variabilité de la quantité de tissus gonadiques développés par ces individus, mais peu d'estimateurs quantitatifs de l'allocation à la reproduction sont disponibles à ce jour. D'autre part, la triploïdie est également connue pour affecter la dynamique de maturation gonadique chez *Crassostrea gigas*, et le déterminisme du sexe chez d'autres espèces de mollusques, mais les mécanismes biologiques impliqués dans ces variations restent relativement méconnus.

Une attention particulière a été consacrée à l'étude des déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction chez les individus diploïdes comme triploïdes. Bien que, chez l'huître creuse diploïde, la variation de l'effort de reproduction conditionne une part significative des performances physiologiques, peu d'études sont consacrées à l'étude de la base génétique impliquée dans cette variation. Par ailleurs, la seule publication traitant de ce sujet fait également état d'une interaction significative de la composante familiale et de l'environnement d'élevage (Ernande et al., 2004) et les estimateurs des paramètres génétiques sont connus pour être variables chez *C. gigas* (Sheridan, 1997). Ces données nous ont incité à approfondir l'analyse des déterminismes génétiques du développement gonadique chez *C. gigas*. Chez les huîtres triploïdes, l'application de plans d'expérimentation inspirés par la génétique quantitative nous a permis de décomposer la variation de l'allocation à la reproduction observée dans ses différentes composantes. La transmission des valeurs génétiques des parents diploïdes à la descendance triploïde a été spécialement étudiée puisqu'elle conditionne grandement la faisabilité d'une amélioration des huîtres triploïdes par sélection génétique. Les corrélations entre croissance et reproduction chez ces individus ont été particulièrement étudiées puisque la réduction de la reproduction pourrait participer à la divergence phénotypique globale observée entre triploïdes et diploïdes. Remarquons également ici que les (rares) études de génétique quantitative publiées à ce jour et menées chez différents organismes polyploïdes ont pour la plupart révélé d'intéressants effets de la polyploïdie sur l'expression des valeurs phénotypiques. Ces résultats prennent également leur sens dans le débat concernant le rôle de la polyploïdie dans l'évolution des espèces et confèrent un intérêt fondamental à ce genre d'études, indépendamment de toute considération pratique liée à l'amélioration génétique de l'huître pour son exploitation économique.

II. Approches expérimentales employées

Avant propos

Cette section décrit brièvement les expérimentations menées au cours de cette thèse. Les questions soulevés dans le chapitre précédent sont reprises. Les méthodologies employées et les approches expérimentales développées pour essayer d'y répondre sont expliquées ici. Ceci nous a paru nécessaire puisque les travaux menés sont présentés sous forme d'articles indépendants les uns des autres, et que le lien entre la problématique générale de la thèse et les résultats de ces travaux n'est pas toujours pleinement explicité. Les techniques et protocoles employés sont plus précisément décrits dans les paragraphes suivants.

II.1. Etude de l'effort reproducteur et de la croissance chez *Crassostrea gigas* : comparaison d'huîtres diploïdes et triploïdes issues d'induction chimique ou de croisement $4n \times 2n$ et cultivées en conditions d'élevage intensif

Le premier travail mené lors de cette thèse s'est donc intéressé à la qualification et la quantification du développement gonadique d'individus triploïdes, comparé à celui des diploïdes. Une première génération d'individus diploïdes ($2n$), triploïdes obtenus par croisement $2n \times 4n$ ($3nDT$), et triploïdes obtenus par induction chimique ($3nCB$) a été produite, et élevée dans des conditions très favorables à la croissance afin de pouvoir étudier la reproduction dès la première année d'étude. L'effort de reproduction a été estimé chez ces individus au début de leur première maturation (à l'âge de 5 mois), afin que l'occupation gonadique mesurée reflète le plus directement possible la part d'énergie consacrée à la reproduction chez les huîtres triploïdes, en l'absence de phénomènes de résorption ou de re-maturation gonadique. L'effort d'échantillonnage important (300 individus par groupe) a également permis une analyse détaillée de la dynamique de maturation gonadique chez les

triploïdes et du déterminisme du genre sexuel chez les diploïdes et les triploïdes. Ces résultats sont présentés dans le Chapitre I des Résultats.

II.2. Etude des bases génétiques de la variation de l'allocation à la reproduction et à la croissance chez de jeunes huîtres creuses diploïdes et triploïdes élevées en mélange de familles

Le second travail mené au cours de cette thèse a consisté en une étude de la relation entre l'allocation à la reproduction, la croissance, et l'origine familiale des individus. Les huîtres étudiées ici sont les mêmes que dans le chapitre précédent. Ces 3 lots 2n, 3nCB et 3nDT étudiés étaient issus des 6 même femelles, et de 16 géniteurs mâles diploïdes pour les lots 2n et 3nCB ou de 16 mâles tétraploïdes pour le lot 3nDT. Ils étaient chacun potentiellement composés de 96 familles, élevées en mélange. Cette approche a été employée ici afin de réduire l'hétérogénéité des conditions d'élevage susceptible d'influencer les performances phénotypiques mesurées mais également de permettre l'élevage simultanée de 288 familles de pleins-frères. L'assignation de parenté a été donc réalisée *a posteriori* en utilisant des marqueurs moléculaires (microsatellites). Des modèles individuels de décomposition de la variance (modèles linéaires généralisés) ont ensuite été employés pour étudier le déterminisme génétique de la croissance et l'allocation à la reproduction. Les effets de la triploïdie et de la méthode d'induction sur la transmission des valeurs parentales ont été tout particulièrement analysés. Ces résultats sont présentés dans le Chapitre II des Résultats.

II.3. Réponse d'huîtres creuses diploïdes et triploïdes à une sélection directionnelle effectuée sur l'intensité du développement gonadique de leurs géniteurs diploïdes : allocation à la reproduction et croissance

Une approche expérimentale différente de la précédente a été finalement employée, à nouveau dans le but d'étudier les déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction et la croissance chez les huîtres creuses diploïdes et triploïdes. La relation entre l'allocation à la reproduction et le degré d'apparentement des individus a été analysée chez des lignées expérimentalement sélectionnées pour présenter des efforts de reproduction contrastés. Plus précisément, nous avons généré des pools de géniteurs choisis pour l'intensité de leur développement gonadique et nous les avons croisés afin de produire 3 lignées divergentes pour l'allocation à la reproduction. La triploïdie a été induite chez la moitié des individus. La réponse à la sélection pour la croissance et l'allocation à la reproduction a été étudiée par mesure de l'occupation gonadique, et pesées de ces individus, au cours de leur première année. Des indicateurs qualitatifs de la gamétogenèse utilisés en parallèle de la mesure d'allocation gonadique ont également permis de tester certaines hypothèses formulées sur les effets de la triploïdie sur l'expression des valeurs génétiques. Ces résultats sont présentés dans le Chapitre III des Résultats.



2^{ème} Partie

Méthodes

I. Méthodes pour la caractérisation du développement gonadique

Nos travaux nécessitaient une caractérisation fine de la gamétogenèse des huîtres, et des indicateurs quantitatifs de l'allocation à la reproduction ont été utilisés en parallèle avec des indicateurs qualitatifs de maturité gonadique, et du genre sexuel développé.

I.1. Mesure de l'occupation gonadique

La mesure de l'occupation gonadique a été choisie comme estimateur du développement gonadique parmi plusieurs méthodes. Les techniques ELISA (Royer et al., 2008) et de comptage gamétique par cytométrie en flux (Ernande, 2001) ne répondaient pas à nos attentes, puisqu'elles ne mesurent que la quantité de gamètes matures. Nous désirions au contraire un estimateur le plus direct possible de l'allocation énergétique totale à la reproduction, incluant la production de tissu gonadique en phase précoce de maturation. Les techniques d'imagerie récemment développées (Davenel et al., 2006) auraient pu permettre une quantification directe du volume de tissus reproducteurs mais elles sont onéreuses, les appareils disponibles sont encore peu nombreux, et le signal aurait pu être affecté par la gonadogenèse perturbée des huîtres triploïdes. L'occupation gonadique mesurée a finalement été choisie car elle permet une estimation du volume de la gonade et car les lames microscopiques préparées permettent également d'apprécier la qualité de la gonadogenèse.

I.1.a. Prélèvement des tissus

La méthode présentée ici est décrite par Enriquez-Diaz (2004) et Royer et al. (2008). Le prélèvement des tissus se fait sur des individus ouverts par la section franche du muscle adducteur qui préserve l'intégrité de la masse viscérale. Une section des tissus est réalisée, perpendiculairement à l'axe longitudinal de la masse viscérale (une « tranche » d'huître...) à l'aide d'une lame affûtée. La coupe est localisée au milieu de la masse viscérale (Figure 18).

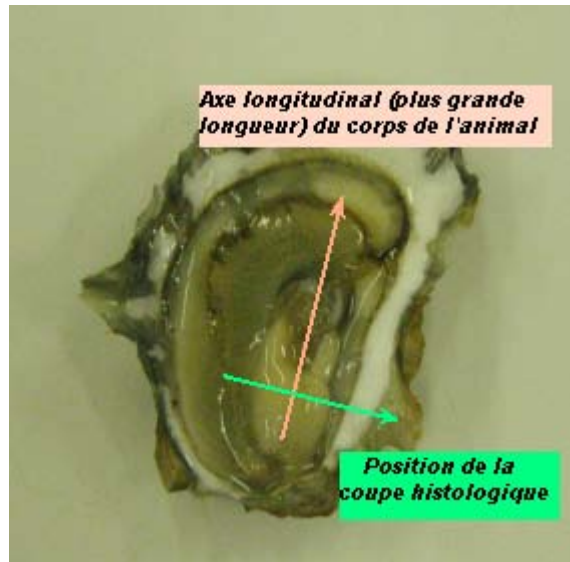


Figure 18 : positionnement de la coupe histologique pour l'étude de l'effort de reproduction

La section de masse viscérale est placée dans une cassette d'histologie, et conservée dans un fixateur d'histologie Davidson (voir formule ci-dessous). Pour se débarrasser du formol toxique, on change habituellement le bain de fixateur pour une solution alcoolique (éthanol 70°) au bout de quelques jours (48 heures minimum).

Davidson (formule V / V) : 1500ml d'eau de mer, 500ml de glycérol, 1000ml de formol, 1500ml d'éthanol et 250ml d'acide acétique

1.1.b. Protocole d'histologie

Les tissus placés dans les cassettes d'histologie sont imprégnés de paraffine dans un automate à inclusion qui déshydrate les tissus par plusieurs lavages à l'éthanol et au xylène avant de les imbiber de paraffine liquifiée. Les tissus imprégnés de paraffine doivent ensuite être inclus dans un bloc de paraffine, que l'on moulera autour des tissus sur le banc d'inclusion. Le socle du moule est constitué par la cassette d'histologie annotée afin de conserver la référence de l'individu. Une fois solidifié, le bloc de paraffine est débité en prisme autour du fragment de tissus.

Les blocs de paraffine contenant les tissus sont coupés à l'aide d'un microtome. Ils sont d'abord dégrossis jusqu'à ce que la coupe passe par la totalité de la section de masse

viscérale, puis coupés à 5 μm , et les coupes sont déposées sur une lame de microscope. L'ensemble est laissé à sécher à l'air pendant 24 heures au moins, avant de subir la coloration.

Afin d'obtenir une coloration contrastée des tissus reproducteurs, on utilise une coloration hématoxyline-éosine (voir Tableau 2). Les tissus sont déparaffinés par des bains successifs de xylène, puis déshydratés dans l'alcool avant d'être plongés dans les colorants, et rincés par des bains d'alcool, puis xylène. Une goutte de résine soluble dans le xylène est alors apposée sur les tissus afin d'y placer une lamelle d'observation, l'évaporation du solvant assurant le durcissement de la résine et la fixation de la lamelle. L'ensemble lame + tissus colorés + lamelle est finalement laissé à sécher 48 heures sous hotte avant observation microscopique, pour s'assurer de l'élimination complète du xylène.

Tableau 2 : Coloration des tissus pour l'histologie

Bains de coloration	Temps de baignation (minutes)
Xylène :	15
Xylène :	15
Ethanol 100°:	15
Ethanol 100°:	15
Eau courante :	5
Hématoxyline :	1,5
Eau courante :	5
Eosine :	4,5
Ethanol 100°:	1
Ethanol 100°:	1
Ethanol 100°:	1
Xylène :	1
Xylène :	1

1.1.c. Numérisation et mesure de l'occupation gonadique

Pour chaque individu, une coupe complète de la masse viscérale est numérisée par un système de caméra numérique connectée à un ordinateur et montée sur une loupe binoculaire. La coupe doit être la plus intègre possible, le grossissement, la mise au point de la loupe, et le réglage des paramètres du logiciel d'acquisition sont ajustés afin que l'image présente la meilleure définition possible. L'échelle n'a pas d'importance pour la mesure de l'occupation gonadique.

La mesure de l'occupation gonadique est effectuée à l'aide du logiciel Imaq Vision Builder. L'image en couleur est d'abord transformée en image en niveau de gris. Une sélection

automatique de l'ensemble de la surface de la masse viscérale puis des tissus gonadiques est réalisée par contour manuel (Figure 19), la surface de l'image sélectionnée (correspondant à une zone de gris homogène) étant réglée finement pour chaque image à l'aide de l'option « Thresold » (seuils de sélection : seuil haut = noirs ; seuil bas = blancs) (Figure 19). Les surfaces de la masse viscérale, et de la surface occupée par les tissus gonadiques en pixels sont alors exportées vers Excel. La mesure de l'occupation gonadique (OG) s'effectue en faisant le rapport entre la surface gonadique (SG) de l'individu et la surface totale de la masse viscérale (STMV), tel que :

$$OG = SG \times 100 / STMV$$

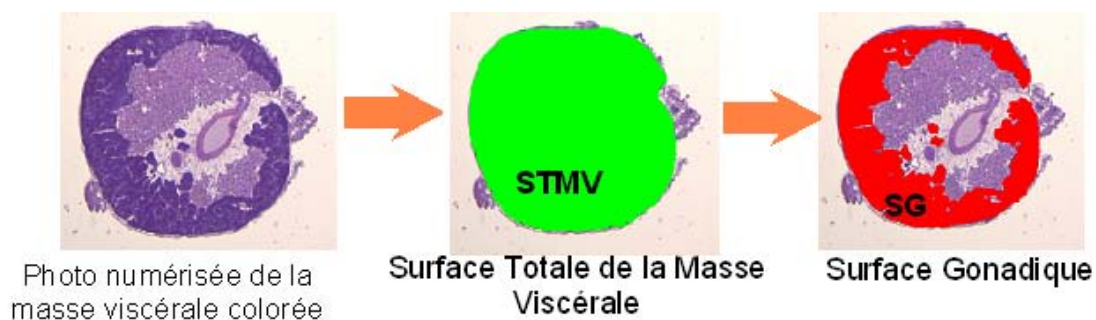


Figure 19 : Mesure de l'occupation gonadique (pourcentage) d'un individu.

I.2. Caractérisation du genre sexuel

Le genre sexuel peut adopter 6 modalités : mâle, femelle, hermaphrodite simultané, hermaphrodite asynchrone mâle puis femelle, hermaphrodite asynchrone femelle puis mâle, ou indifférencié. La nuance entre hermaphroditisme simultané et asynchrone peut sembler ténue, ou difficile à apprécier à l'observation microscopique, mais elle permet de tester certaines hypothèses biologiques (liées au déterminisme du sexe chez l'huître) et est en cela informative.

Un hermaphrodite simultané est un individu qui développe simultanément des lignées germinales mâles et femelles à un stade de maturité comparable. Chez ces individus, le développement des cellules de la lignées germinales a été « géographiquement » orienté vers le genre soit mâle, soit femelle, selon l'endroit où il s'est déroulé. La proportion des cellules de la lignée sexuelle des deux genres n'est pas forcément égale. Les deux lignées montrent

des tissus gonadiques au même stade de maturité attestant du développement simultané, et ininterrompu jusqu'à la date du prélèvement des tissus.

L'hermaphrodite asynchrone est un individu qui a initié sa saison de maturation selon un premier genre sexuel, avant d'arrêter ce premier épisode de maturation et d'en initier un second sous le deuxième genre. On pourra apprécier l'importance relative du développement des tissus des deux genres par la surface couverte respectivement par les tissus des 2 cohortes. Les cellules germinales des deux cohortes ne sont là encore pas forcément présentes dans les tissus en proportions égales et sont rarement au même stade de maturité. En général, on note des signes de régression des tissus gonadiques de la première cohorte par la présence de lumières au centre des tubules gonadiques, qui présentent alors des gamètes ou des cellules de la lignée germinales en cours d'atrésie. La seconde cohorte de maturation se développe de façon centripète dans le tubule, jusqu'à ce que des cellules gamétiques en cours de maturation remplacent la première cohorte dégradée (Figure 20). On remarquera que la tendance à la protandrie de l'hermaphrodisme de l'huître ne détermine pas l'ordre d'apparition des 2 sexes en cas d'hermaphrodisme asynchrone : chez les hermaphrodites, le genre sexuel de la première cohorte à s'être développée au cours de la saison peut être mâle ou femelle.

Les individus mâles et femelles sont les individus qui présentent strictement toutes leurs cellules germinales dans un même genre sexuel, depuis le stade primordial jusqu'au dernier stade de développement atteint lors de l'échantillonnage (voir également la Figure 4).

Les individus indifférenciés sexuellement sont des individus dont les tissus gonadiques ne peuvent pas être caractérisés par l'observation microscopique comme appartenant à l'un ou l'autre des genres sexuels. Il s'agit d'individus stériles, ou d'huîtres en période dite de « repos reproducteur » échantillonnées après la régression des tissus gonadiques du précédent épisode de reproduction et avant le développement de tissus reproducteurs du prochain.

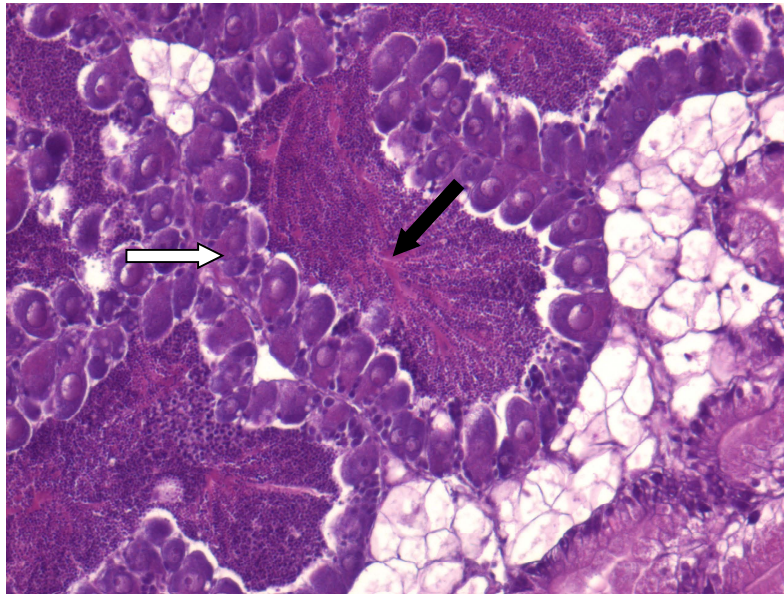


Figure 20 : Hermaphrodite asynchrone observé chez les huîtres triploïdes, montrant des spermatozoïdes matures, probablement en cours de résorption au centre des follicules (flèche noire), alors qu’une seconde cohorte de cellules de la lignée germinale femelle est en cours de maturation en périphérie de ces mêmes follicules (flèche blanche).

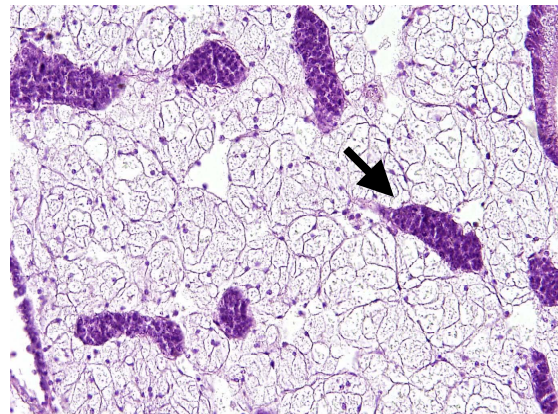
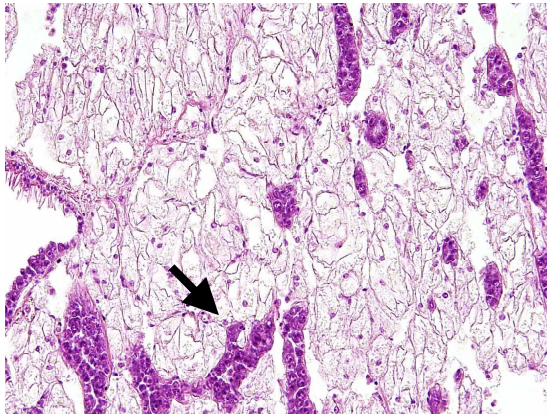
I.3. Caractérisation des stades de maturation gonadique

L’appréciation de la dynamique de la maturation repose sur une échelle de principes exclusifs mutuellement, adaptée des échelles de maturités présentées dans la littérature (Tableau 3) (Mann, 1979 ; Lango-Reynoso et al., 2000). Précisément, les critères de détermination présentés dans la littérature renvoient implicitement au degré de maturité de l’ensemble des tissus de la masse gonadique, alors que l’échelle que nous présentons ici caractérise le degré de maturité d’une seule cohorte de cellules de la lignée germinale. L’utilisation d’une telle échelle a été rendue nécessaire par la maturation gonadique très hétérogène observée chez les individus triploïdes qui présentent parfois simultanément plusieurs cohortes à des stades de maturité différents les uns des autres. Pour les individus présentant plusieurs cohortes de cellules germinales, la caractérisation de la maturation a alors consisté à attribuer un stade de maturité pour chacune des cohortes développées.

Tableau 3 : Description de l'échelle de maturité employée (début)

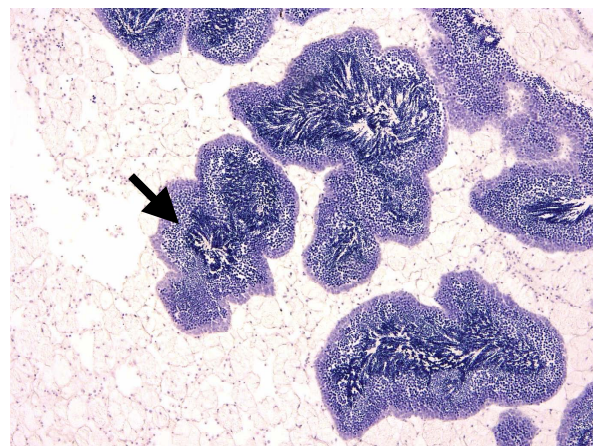
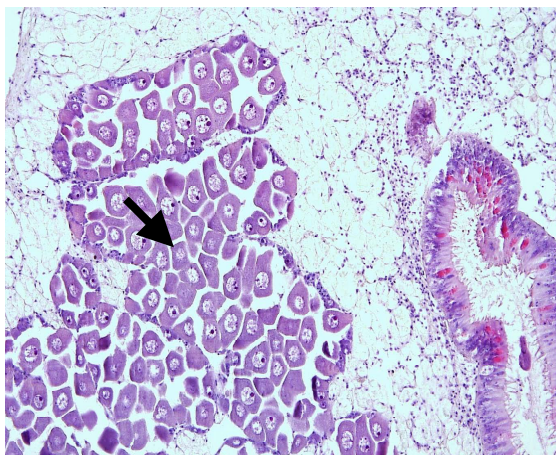
Le **stade 0** : « repos sexuel » est le stade précoce de développement gonadique. Les tubules gonadiques ne présentent pas d'activité mitotique visible, aucun genre sexuel ne peut être attribué aux cellules par l'observation microscopique seule.

Le **stade 1** de « prolifération goniale » décrit l'extension des tubules gonadiques sous la prolifération mitotique des gonies. On peut alors attribuer un sexe à la cohorte de cellules de la lignée germinale. On ne note pas encore à ce stade la présence de spermatozoïdes ou d'ovocytes matures, mais les premiers cytes apparaissent au centre des tubules gonadiques en fin de stade 1.



Photos histologiques de gonades d'individus au stade 1 de maturation : à gauche femelle, à droite mâle. La flèche pointe les tubules gonadiques, montrant des gonies en cours de multiplication.

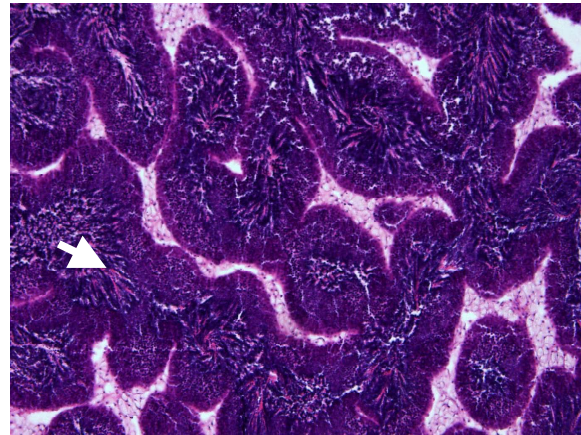
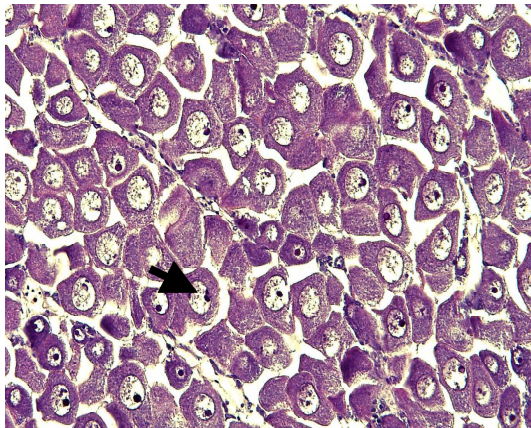
Le **stade 2** décrit la phase de maturation proprement dite, soit l'ovogenèse pour les lignées femelles et la spermiogenèse pour les mâles. Le critère de détermination microscopique est la présence simultanée de gonies en périphérie du tubule gonadique et d'ovocytes ou de spermatozoïdes matures en son centre. Les premières ont évidemment tendance à occuper d'autant moins de place dans les tubules gonadiques que la gamétogenèse est avancée.



Photos histologiques de gonades d'individus au stade 2 de maturité : à gauche femelle, à droite mâle. La flèche pointe les jeunes cytes en cours de maturation.

Tableau 3 : Description de l'échelle de maturité employée (fin)

Le **stade 3** caractérise des tissus gonadiques pleinement matures, souvent filants près du gonoducte et donc décondensés à cet endroit. Les cellules en cours de maturations sont rares à ce stade, et les gamètes matures très majoritaires occupent alors la totalité des tubules. Le tissu conjonctif périphérique apparaît extrêmement réduit.



Photos histologiques de gonades d'individus au stade 3 de maturité : à gauche femelle, à droite mâle. La flèche pointe des ovocytes matures chez la femelle, des spermatozoïdes chez le mâle.

Le **stade 4** est un stade de régression gonadique. Lors d'un cycle de reproduction, il intervient généralement après une émission gonadique et concerne l'atrésie et la disparition des derniers gamètes non-émis ainsi que des tissus gonadiques résiduels. Les tubules gonadiques post-ponte présentent une lumière au centre des tubules qui caractérise leur affaissement par la disparition des gamètes matures centraux. Les cellules sexuelles restantes apparaissent parfois accompagnées d'hémocytes, souvent dégradés (pourtour irrégulier), le cytoplasme très sombre chez les ovocytes.

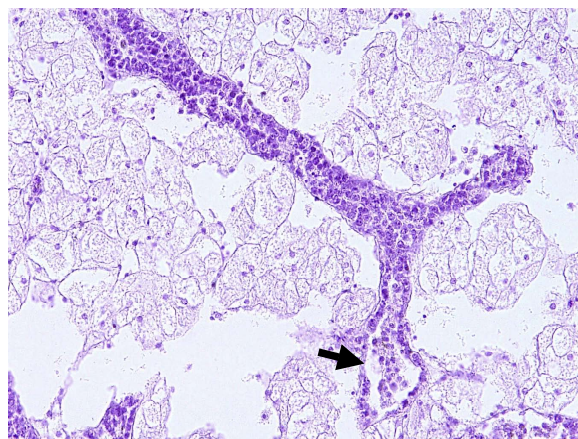


Photo histologique de gonade d'individus au stade 4 de maturité. La flèche pointe la lumière sans le tubule gonadique affaibli, et les cellules de la lignée germinale en cours de résorption en son centre.

II. Analyse de la ploïdie par cytométrie en flux

La détermination de la ploïdie des individus étudiés constituait une condition nécessaire à nos expérimentations puisque les lots triploïdes étudiés comprenaient une majorité d'individus triploïdes, mélangés avec des individus diploïdes et mosaïques. La ploïdie moyenne des lots a donc été systématiquement suivie au cours de l'élevage par cytométrie en flux. Dans les cas où le lot présentait une proportion d'individus non-triploïdes susceptible d'induire un biais dans nos expérimentations, une mesure individuelle de la ploïdie des huitres échantillonnées a été réalisée. La technique utilisée ici pour la cytométrie consiste à mesurer la fluorescence émise par une solution de noyaux libres colorés au DAPI (fluorochrome spécifique de l'ADN: 4, 6-Diaminido-2-phénylindol). Cette émission est proportionnelle à la quantité de matériel chromosomique contenue dans les noyaux cellulaires, et donc à la ploïdie des individus (Benfey and Solar, 1986). La disponibilité d'une quantité de tissu branchial suffisante (contenant les 2000 noyaux nécessaires à l'analyse standardisée) constitue la principale contrainte de la technique : si le prélèvement peut être réalisé sous anesthésie pour les adultes, il est habituellement destructif pour des individus de petite taille.

II.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons diffère quelque peu selon l'âge des individus, mais les réactifs, et la procédure d'analyse restent identiques. Les protocoles d'analyse ne sont pas publiés, ils ont été mis au point pour les adultes par T. Sharbel et pour les larves par F. Cornette.

Echantillonnage chez les individus adultes

Environ 1 mm² de feuillet branchial est prélevé à l'aide d'une pince fine sur les individus anesthésiés. On ajoute au prélèvement 1 mL de tampon de lyse cellulaire (Tableau 4) auquel a été ajouté le fluorochrome DAPI. La suspension de noyaux libres de cytoplasme est ensuite filtrée sur maille de 30 µm et complétée par 1 mL de tampon d'extraction + DAPI.

Echantillonnage chez les larves

100 larves en suspension dans l'eau de mer sont prélevées, et déposées dans un éppendorf pour microcentrifugation. Les larves concentrées au fond du tube sont récupérées à la micropipette et broyées pendant une minute dans 0,5 mL du tampon d'extraction d'ADN+DAPI, à l'aide d'un piston pellet. L'échantillon est ensuite filtré sur filtre Partec de 30 µm, avant d'être complété par 1,5 mL de Tampon + DAPI. Les échantillons ainsi préparés sont mis à incuber une demi heure à 4°C et à l'obscurité.

Préparation des témoins externes et internes

150 µL de solution standard de microbilles (Size Standard, Coulter) sont introduits dans chaque tube à analyse afin de servir de témoin interne. Un échantillon provenant d'un individu diploïde subit parallèlement le même traitement, et fournit un autre témoin lors du passage dans le cytomètre.

Tableau 4 : Solutions employées pour la cytométrie en flux

Tampon d'extraction pour la cytométrie en flux		
Produit	Pour 100mL de tampon	Pour 1 litre de tampon
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,107 g	1,07 g
NaCl	0,5 g	5 g
Tris (Trizma base)	1,211 g	12,11 g
Solution DAPI (C _{stock} = 0.2 mg / mL)	1 mL (C _{finale} = 2 µg/mL)	10 mL
Triton X100	0,1 mL soit 0,0939 g	10 mL soit 0,939 g
H ₂ O bi-distillée	100 mL	1000 mL
HCl	Ajuster le pH à 7	

Témoin interne:

14 mL de tampon d'extraction et une goutte de solution standard de billes.

II.2. Protocole d'analyse

Le cytomètre est étalonné à l'aide d'une solution référence de 2 mL d'eau bi-distillée + 150 µL de solution standard de microbilles. Le gain est réglé afin d'obtenir un pic unique de fluorescence à 300 nm, qui servira de référence lors de l'analyse des résultats, et qui correspond également au pic de fluorescence du témoin interne par échantillon.

L'analyse en cytométrie en flux permet la caractérisation de la ploïdie des cellules de l'échantillon selon deux critères : la quantité moyenne d'acide nucléique par cellule (estimateur du nombre de chromosomes), indiquée par le ratio de ploïdie, et la variabilité de celui-ci, donnée par le CV (Figure 21).

L'analyse en cytométrie traduit les données de fluorescence en effectif par classe de ploïdie. La population cellulaire globale est représentée par une gaussienne (ou plusieurs, s'il y a plusieurs classes de ploïdie différenciées) dont la médiane correspond à la ploïdie moyenne de l'échantillon. Le CV, ou Coefficient de Variation, est un indicateur de la dispersion de la ploïdie de l'échantillon autour de cette valeur médiane: il est d'autant plus fort que la base du pic est large. Le logiciel d'acquisition du cytomètre (Partec) le calcule selon la formule suivante: $CV = 100 \times (\text{écart-type} / \text{moyenne})$.

La valeur médiane du pic tend à se déplacer le long de l'axe des abscisses avec l'échauffement de la lampe. Plutôt que d'utiliser cette valeur brute dans les analyses, on lui préférera le ratio entre la moyenne de fluorescence émise par les noyaux de l'échantillon et la moyenne de la fluorescence émise par le témoin interne de microbilles, le rapport de ces variables étant constant qu'elles que soient les conditions expérimentales. Cette grandeur, appelée Ratio de Ploïdie (RP), est proportionnelle à la quantité de matériel chromosomique des cellules: les cellules diploïdes montrent ainsi un pic à 100 nm (ratio 0,3 par rapport au témoin interne), et les triploïdes un pic à 150 nm (ratio 0,45).

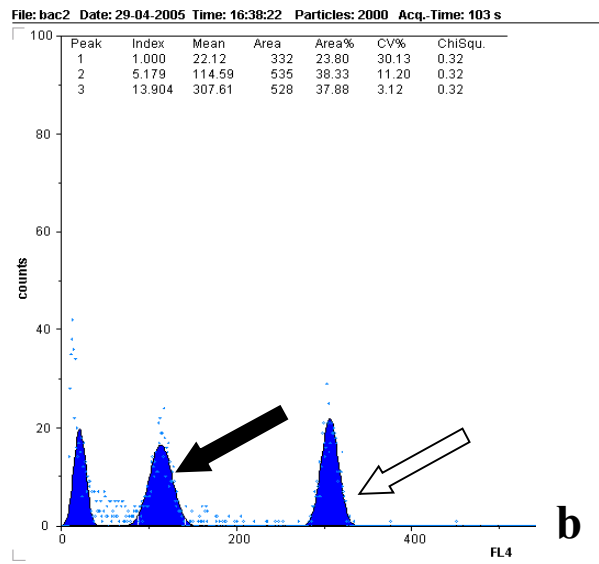
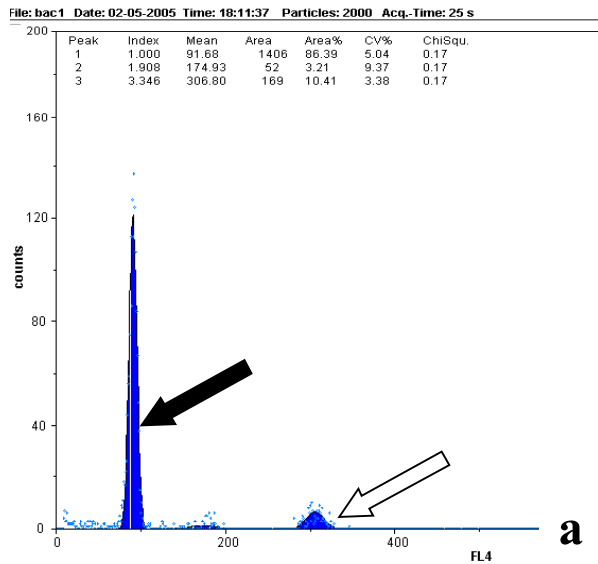


Figure 21: Graphiques des analyses en cytométrie en flux (élevages larvaires):

- 21.a : Effectifs par classe de ploïdie dans une population cellulaire diploïde (larves du croisement témoin, jour 11). La flèche noire pointe le pic diploïde, la flèche blanche, le témoin interne.
- 21.b : Effectifs par classe de ploïdie dans une population cellulaire aneuploïde. La flèche noire pointe le pic aneuploïde, la flèche blanche, le témoin interne.

III. Génotypage et assignation de parenté

L'approche « familles en mélange », présentée dans le Chapitre II des Résultats, a nécessité de déterminer l'appartenance familiale d'huîtres élevées en mélange de familles, par génotypage *a posteriori* des individus échantillonnés et assignation de parenté. Il s'agissait essentiellement de relier les données phénotypiques (collectées parallèlement) à un degré d'apparentement entre individus. La méthode employée ici consistait à établir le génotype de l'individu pour plusieurs loci microsatellites, et à lui assigner le couple de parents le plus probable connaissant les génotypes parentaux aux mêmes loci. Les protocoles ont été établis et présentés par N. Taris (Taris, 2005 ; Taris, 2006).

III.1. Préparation des échantillons

III.1.a. *Extraction de l'ADN*

Pour l'extraction d'ADN, environ 10 mg de feuillet branchial est prélevé chez un individu, et conservé à -18°C dans l'éthanol à 70° . Les extractions d'ADN ont été réalisées avec un kit d'extraction du commerce (Kit Proméga – Wizard DNA Clean Up).

Brièvement, l'extraction commence par une phase de lyse cellulaire pendant laquelle le fragment branchial est incubé (bain-marie 65°C , au moins 3 heures) dans $400\ \mu\text{L}$ de tampon CTAB + $10\ \mu\text{L}$ de protéinase K à $10\ \text{mg/mL}$, et très régulièrement vortexé.

Tampon d'extraction CTAB : $20\ \text{mL}$ Tris-HCl $1\ \text{M}$ pH 8.0 ; $16.36\ \text{g}$ NaCl ; $8\ \text{mL}$ EDTA $0.5\ \text{M}$; $4\ \text{g}$ CTAB ; qsp $200\ \text{mL}$ eau bidistillée.

Les échantillons sont ensuite traités par l'adjonction de $400\ \mu\text{L}$ de chloroforme isoamylalcool, agités pendant 2 minutes, et centrifugés 5 minutes. Un volume de $200\ \mu\text{L}$ du surnageant clair contenant l'ADN est alors prélevé. $1\ \text{mL}$ de résine thiocyanate est alors ajouté au surnageant, la solution est homogénéisée par pipettage-refoulement et filtrée sur les colonnes d'extraction. L'ADN est retenu sur la colonne, la résine et le surnageant sont jetés. Les colonnes sont ensuite rincées à l'isopropanol $80\ \%$ et centrifugées 2 minutes. Elles sont finalement placées sur un éppendorf neuf, et rincées avec $50\ \mu\text{L}$ de tampon TE, préalablement chauffé à 65°C .

III.1.b. Dosage par spectrophotométrie et ajustement des concentrations pour l'amplification

La concentration d'ADN (proportionnelle à la densité optique) et la pureté de l'extrait (correspondant au rapport de l'absorbance lumineuse 260/280) renseignent sur la qualité de l'extraction. Le témoin (« blanc ») est constitué de 100µL de TE, et les échantillons sont dilués au 5/100 (5 µL d'échantillon pour 95 µL de TE). Les concentrations d'ADN couramment obtenues après extraction varient entre 200 et 1200 µg/mL, avec un rapport 260/280 compris entre 1,65 et 1,80. Une dilution est alors requise pour ramener la concentration entre 5 et 10 µg/mL d'ADN (valeurs hautes⁷ pour la lecture sur le séquenceur) avant l'amplification en PCR, et les échantillons sont déposés sur plaque 96 puits et conservés à -18°C.

III.2. Protocole de PCR

L'amplification des microsatellites s'effectue par PCR en multiplex, c'est-à-dire que différents microsatellites sont amplifiés simultanément, et marqués chacun par un fluorochrome donné. On réalise donc une seule PCR par individu, pour une amplification de 3 microsatellites. Pour l'amplification en multiplex, un kit pour PCR multiplex du commerce (QIAGEN Multiplex PCR kit) a été utilisé. La formule du Mix de réactif employé est donnée dans le Tableau 5, la programmation du thermocycleur est présentée en Figure 22. Les microsatellites employés, la composition de multiplexes employés et la séquence des amorces est présentée en page suivante (Figure 23). Les 3 multiplex employés sont :

Multiplex 1: Cg108, Cg49 (Magoulas et al., 1998), L10 (Huvet et al., 2000),

Multiplex 2: ucdCg148, ucdCg129, ucdCg177 (Li et al., 2003),

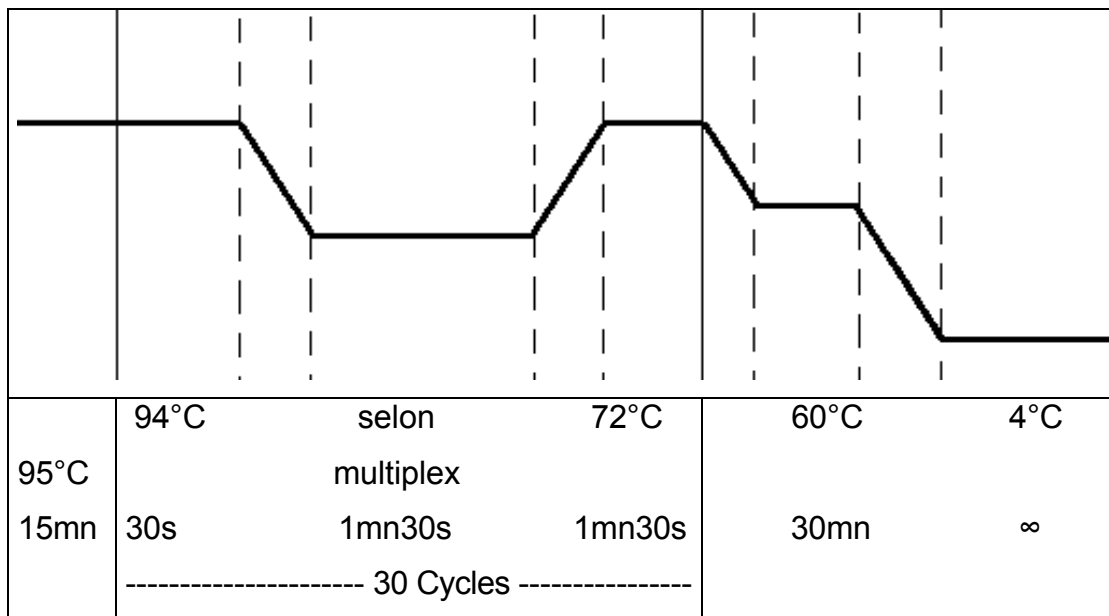
Multiplex 3: ucdCg166, ucdCg198, ucdCg200 (Li et al., 2003).

⁷ Selon la qualité de l'extraction, les concentrations optimales pour la lecture du génotype individuel varient très fortement. Le passage au séquenceur de quelques échantillons choisis sur la plaque de dépôt permet d'ajuster les concentrations avant l'amplification par PCR d'un grand nombre d'individus (et l'utilisation d'un gros volume de réactifs onéreux).

Tableau 5 : Mix de réactifs pour PCR

Réactif	Volume par échantillon
Master Mix	5 µL
Sol Q	1 µL
H ₂ O bidistillée	2 µL
ADN	1 µL
Mix amorces microsatellites [12.5µM]	1 µL
total :	10 µL finaux par puit

Remarque : Les volumes sont volontairement divisés par 5 par rapport au protocole proposé par Qiagen©, sans que cela ne réduise la qualité de l'amplification.

**Figure 22 : Programmation du thermocycleur****Multiplex 1**

Locus	T°lig.	Sens	Amorces utilisées	Fluorochrôme
CG 49	55°C	F	CATCAGGGGTAAATTAAGTAAGC	Ned
		R	CCACAGACGATTCATATATCCTG	
CG 108		F	ATATGTAATGATTACGAACT	Fam
		R	GTATGAGATTTGGTTCCACC	
L 10		F	GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC	Hex
		R	CATGTTTTCCCTTGACTGATCC	

Multiplex 2

Locus	T°lig.	Sens	Amorces utilisées	Fluorochrôme
CG 166	58°C	F	CATCGGAATAAATCGGGTAA	Fam
		R	TTCCTTTGTGCTGTCTTACAGG	
CG 198		F	GAAAGACACGACCGGAGAGA	Hex
		R	CTGATGATGTCCCACACCTG	
CG 200		F	AAAGTTGCTTTGCTGTCGTC	Ned
		R	CGCTAACGTGCTTCATTCAA	

Figure 23 : Constitution des multiplex et séquences des amorces (début).

Multiplex 3				
Locus	T°lig.	Sens	Amorces utilisées	Fluorochrôme
CG 129	57°C	F	CGAATTTTTTCGGACATCGTT	Ned
		R	GTGGTATGCCTGCATCATGT	
CG 148		F	TGTTGGTTGGTTGGTAGGTTG	Fam
		R	TGTCAAACGTCGAGAATTGG	
CG 177		F	GCTTCCGGGAATTAACCAT	Hex
		R	TCAAGAAAAAGTCGACGGGTA	

Figure 23 : constitution des multiplex et séquences des amorces (fin).

III.3. Génotypage

Avant le passage au séquenceur, 1 µL du produit d'amplification est déposé sur plaque de 96 puits et dénaturé dans 9 µL de Formamide. Un marqueur de taille (Genscan ROX, Applied biosystem) est ajouté (0,3 µL). La dénaturation s'effectue pendant 5 minutes à 95°C, et les échantillons sont ensuite brutalement refroidis pour éviter la ligation. Le séquenceur utilisé ici est un séquenceur à capillaires (16 capillaires de 36 cm) de type ABI Prism 3100 (Applied biosystem). Les échantillons subissent une électrophorèse sur polymère avant de passer individuellement devant la cellule. Pour chaque échantillon, un électrophorégramme montrant les différents pics correspondants aux allèles de tailles différentes, est obtenu avec le logiciel d'acquisition Genemapper (Applied biosystem) (Figure 24). Le génotype de chaque individu est lu manuellement, et reporté sous forme de base de donnée Excel. Les options de reconnaissance automatiques des tailles alléliques (« bin panel ») offertes par le logiciel n'ont pas été utilisées ici car elles génèrent un nombre d'erreurs élevé qui rendait nécessaire une relecture « manuelle » des électrophorégrammes.

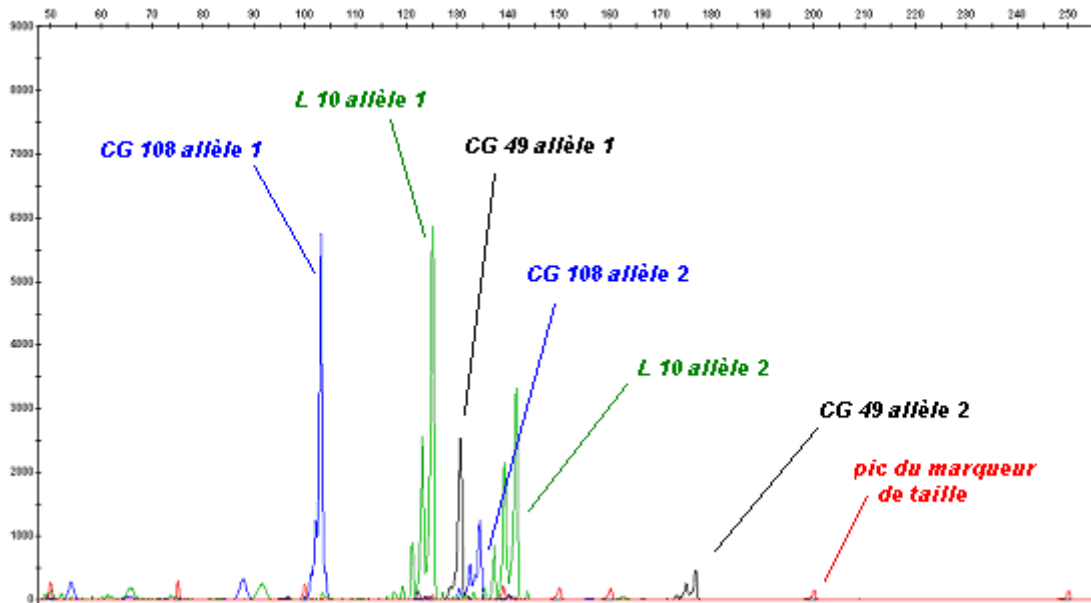


Figure 24 : Exemple d'électrophorégramme chez un individu diploïde, multiplex 1. Les médianes des pics majoritaires correspondent aux tailles des allèles. Les allèles d'un même microsatellite (marqués avec le même fluorochrome) apparaissent de la même couleur.

III.4. Assignation de parenté

III.4.a. Sélection des géniteurs

La méthode d'assignation de parenté utilisée consiste en une estimation de la distance génétique entre les génotypes multiloci des géniteurs, et celui du descendant considéré. Brièvement, les modèles assignent à un descendant donné la paire de géniteur la plus probable et un géniteur est d'autant plus probable qu'il possède des allèles d'une taille proche de celles du descendant considéré, au locus considéré. Afin d'améliorer la puissance d'assignation, nous avons utilisé comme géniteurs un lot d'huîtres issues de captage naturel afin de maximiser sa diversité génétique. Les individus ont été biopsés, génotypés, et nous avons choisi pour le croisement des géniteurs 1) présentant la plus forte hétérozygotie possible pour les microsatellites au Multiplex 1, 2) présentant les tailles alléliques les plus différentes possibles, suivant en cela les conseils dispensés dans les études précédentes (Taris, 2005). La même procédure a été appliquée pour la sélection des géniteurs tétraploïdes. Les génotypes des géniteurs sélectionnés sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Génotypes des géniteurs choisis pour les loci microsatellites utilisés (début).

	CG 108				L 10				CG 49			
	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4
Male 2n 1	119	144			152	152			142	157		
Male 2n 2	129	131			137	131			155	135		
Male 2n 3	125	145			154	154			130	157		
Male 2n 4	143	181			137	184			129	159		
Male 2n 5	140	157			152	165			130	144		
Male 2n 6	128	138			133	135			178	186		
Male 2n 7	124	136			125	135			128	148		
Male 2n 8	133	130			123	125			130	136		
Male 2n 9	145	145			160	202			128	161		
Male 2n 10	127	127			127	185			165	144		
Male 2n 11	125	134			127	185			144	165		
Male 2n 12	129	140			127	143			157	159		
Male 2n 13	125	136			135	154			175	177		
Male 2n 14	122	148			151	167			132	138		
Male 2n 15	152	162			131	131			144	157		
Male 2n 16	136	150			167	177			146	151		
Femelle 2n 1	104	145			156	167			130	147		
Femelle 2n 2	134	138			112	180			148	161		
Femelle 2n 3	134	140			141	163			143	157		
Femelle 2n 4	123	145			151	154			130	136		
Femelle 2n 5	116	138			146	165			146	159		
Femelle 2n 6	119	140			117	171			130	146		
Male 4n 1	120	132	133	165	115	123	154		147	151	196	
Male 4n 2	133	148	156	165	123	137	156		132	144	151	
Male 4n 3	133	142	148	165	123	154	156		147	151	167	
Male 4n 4	132	143	148	165	115	137	156		147	151	167	
Male 4n 5	120	132	133	142	115	125	156	173	132	147	151	
Male 4n 6	133	142	148		115	125	156		147	196		
Male 4n 7	116	132	133	148	123	137	156		147	151		
Male 4n 8	120	133	165		123	137	154	156	132	139	151	
Male 4n 9	120	133	148		125	154	156		132	147	196	
Male 4n 10	120	133	142	148	123	154	156		144	151	196	
Male 4n 11	133	148	156		115	125	154	156	147	132	196	
Male 4n 12	122	143	148	156	139	154	156		134	151	196	
Male 4n 13	133	142	165		123	125	137	154	132	139	151	
Male 4n 14	142	148	156		115	137	154		132	139	151	
Male 4n 15	132	133	148	165	115	123	125		132	147	151	196
Male 4n 16	133	142	156		123	154	156		132	147	151	

Tableau 6 : Génotypes des géniteurs choisis pour les loci microsatellites utilisés (fin).

	CG 148				CG 177				CG 129			
	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4
Male 4n 1	226	230	232		228	236	283		233	254	261	
Male 4n 2	225	225	230		228	239	266	283	233	259	261	
Male 4n 3	226	230	232		257	260	266		244	259	261	
Male 4n 4	225	226	230		239	257	266		233	244	261	
Male 4n 5	209	224	226	237	228	236	257	266	244	261		
Male 4n 6	232	237	243		228	239	266	283	244	262		
Male 4n 7	224	225	230	237	228	239	260	266	217	233	244	259
Male 4n 8	209	225	226		228	283			233	251	254	259
Male 4n 9	226	230	232	243	228	237	239	260	259	261		
Male 4n 10	225	226	230	232	228	257	283		217	233	253	
Male 4n 11	25	230	232		228	239	257	283	217	233	244	261
Male 4n 12	225	243			228	260	283		233	253	259	261
Male 4n 13	224	225	230	232	228	257	266	283	217	233	261	
Male 4n 14	210	225	226		228	260	266	283	217	259	261	
Male 4n 15	210	226	230	232	228	236	283		246	261		
Male 4n 16	225	226	232		228	239			233	259	261	

	CG 166				CG 198				CG 200			
	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4	Allèle 1	Allèle 2	Allèle 3	Allèle 4
Male 4n 1	229	237			246	249	252		245	262	265	
Male 4n 2	213				239	246	252		254	262	265	
Male 4n 3	213	219			233	239	252		245	254		
Male 4n 4	213	219			233	239	246		245	254	265	
Male 4n 5	213				239	246			245	251	265	
Male 4n 6	213	229			233	239			245	254	265	
Male 4n 7	213	219			239	246	252		254	265		
Male 4n 8	237				239	246	252		245	262		
Male 4n 9	210	217	237		239	249	252		254	256	265	
Male 4n 10	213	229	237		239				245	251	254	262
Male 4n 11	213	219	237		233	239	246		245	254	265	
Male 4n 12	237				239	246	252		245	262		
Male 4n 13	213	219			233	239	246		245	251		
Male 4n 14	219	237			239	246			245	254		
Male 4n 15	213	219	237		233	239	246		245	251	254	
Male 4n 16	210	237			230	239	246		245	254		

III.4.b. Assignation parentale pour les individus diploïdes

Chez les individus diploïdes, les géniteurs et les descendants ont été génotypés pour les 3 microsatellites (CG 108, CG 49, L10) du premier multiplex (Figure 23). L'assignation de parenté a été effectuée à l'aide du logiciel PAPA (« Package for the Analysis of Parental Allocation », Duchesne et al., 2002). Le logiciel PAPA est un programme d'allocation parentale et de simulation, basé sur une méthode de test de la vraisemblance qu'un couple de parents produise le génotype lu chez le descendant à plusieurs loci. Le niveau d'erreur et leur structure de transmission à la descendance est également ajustable. Dans la mesure où certains des microsatellites utilisés lors de cette étude montraient des tailles impaires, et des répétitions de motifs trinuécléotides, une transformation des tailles alléliques lues a été effectuée afin de satisfaire aux conditions de codage imposées par PAPA. Les données lues ont été ainsi réduites à l'arrondi inférieur et multipliées par deux.

III.4.c. Assignation parentale pour les individus triploïdes

Aucun des logiciels cités dans la littérature n'est adapté à ma connaissance à l'assignation de parenté chez les individus triploïdes, et il n'existe que peu de modèles théoriques publiés intégrant les contraintes liées à la polyploidie pour le calcul des distances génétiques à l'aide de marqueurs codominants (Bruvo et al., 2004, Esselink et al., 2004). L'application de ces modèles à notre travail aurait nécessité un fastidieux travail d'adaptation et de programmation informatique. L'assignation chez les huîtres triploïdes a donc été réalisée en grande partie manuellement par reconnaissance des allèles parentaux dans les génotypes de la descendance, en s'inspirant des méthodes de calcul utilisées par les logiciels pour l'assignation de la paire de parents la plus probable (Herbinger et al., 1997 ; van de Castele et al., 2001). Chez les triploïdes issus d'induction chimique, la femelle contribue deux fois au génome de la descendance et les génotypes triploïdes lus dans la descendance pour un locus donné présentent donc deux allèles maternels. Le génotype triploïde des descendants a donc été « diploïdisé » en retirant arbitrairement l'un des allèles maternels identifiés lors de l'assignation maternelle, et le génotype diploïde obtenu a pu être codé pour PAPA afin de vérifier l'allocation maternelle et d'automatiser l'allocation paternelle.

Pour les triploïdes issus du croisement $2n \times 4n$, les 3 multiplex ont été employés afin de disposer d'un pouvoir d'assignation maximum, et les génotypes à 9 loci établis ont

effectivement permis d'assigner manuellement les femelles. L'assignation des mâles tétraploïdes n'a pas été permise du fait du grand nombre d'allèles communs et de la contribution double au génome de la descendance qui se combinaient pour générer des combinaisons redondantes.

Résultats

Chapitre I.

Etude de l'effort reproducteur et de la croissance chez *Crassostrea gigas* : comparaison d'huîtres diploïdes et triploïdes issues d'induction chimique, ou du croisement $4n \times 2n$ et cultivées en conditions d'élevage intensif

Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas* : comparison of intensively reared 5-month-old diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction

En collaboration avec Bruno Ernande, Joël Haure, Helen McCombie et Pierre Boudry
Article accepté dans Aquatic Biology le 11 octobre 2009.

Résumé

L'effort de reproduction et la croissance ont été étudiés pour trois groupes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* : un premier lot diploïde et deux lots triploïdes obtenus par induction chimique lors de la fécondation (« 3nCB »), ou par croisement entre un parent tétraploïde et un parent diploïde (« 3nDT »). Les huîtres ont été élevées en conditions d'élevage intensif en nurserie et échantillonnées à l'âge de 5 mois. L'effort de reproduction a été estimé par mesure de l'occupation gonadique, et le stade de maturité gonadique a été déterminé par examen microscopique. La comparaison du développement gonadique a montré un effort de reproduction réduit chez les deux groupes de triploïdes, comparativement aux huîtres diploïdes. L'effort de reproduction mesuré chez ces deux groupes d'individus était supérieur aux estimations précédentes publiées, avec une occupation gonadique moyenne de 47 % de celle des huîtres diploïdes à la date d'échantillonnage. Les corrélations significatives observées entre le genre sexuel et la croissance dans les 3 groupes, et entre le genre sexuel et l'occupation gonadique chez les huîtres diploïdes suggèrent l'existence d'un lien entre le déterminisme du sexe et les traits liés à l'acquisition énergétique chez *C. gigas*.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, gamétogenèse, huître, triploïdie.

Abstract

Early reproductive effort and growth were studied in three groups of Pacific oysters *Crassostrea gigas*: one diploid, and two triploid groups resulting from either chemical induction ('3nCB') or crosses between tetraploid and diploid parents ('3nDT'). Oysters were reared under intensive nursery conditions and sampled when five months old. Reproductive effort was estimated by cross-sectional area measurements of the visceral mass, and maturation stage was assessed by qualitative histology. As expected, comparison of the reproductive patterns of these three groups revealed a lower reproductive effort in triploid individuals relative to diploid ones. However, reproductive effort in triploid oysters was higher than expected in both 3nCB and 3nDT groups, as the gonadic occupation was 47 % of that in diploids at the sampling date. A significant relationship was observed between gender and body mass within each group and for gonadic occupation in the diploid group, suggesting that there is a link between sex and fitness-related traits in *C. gigas*.

Keywords: *Crassostrea gigas*; gametogenesis; oyster; triploidy.

I. Introduction

Polyploidization, the acquisition of more than two sets of chromosomes, is recognized as a significant factor in the evolution of eukaryotes (Otto & Whitton 2000). Polyploidy impacts genotype and phenotype at different levels (Comai 2005). In the long term, additional chromosome sets provide opportunities for genome evolution, such as neofunctionalization and silencing, as well as organizational modifications such as inter-genomic chromosomal exchanges or saltational re-organization (see Wendell 2000 for review). Polyploidization also induces direct changes by perturbing cellular architecture, as increasing the DNA content of a cell usually increases its volume (Melaragno et al. 1993). The augmentation of genetic material and gene copies obviously has implications that change heterozygosity and lead to additive (Johnson et al. 2007) and non-additive (Auger et al. 2005) effects on gene expression and resulting phenotypic traits, probably due to disruptions of regulatory pathways and epigenetic instability (Auger et al. 2005). By these means, polyploidy has played an important role in plant evolution (Soltis & Soltis 1999, Otto & Whitton 2000, Paterson 2005), though it appears to have occurred more rarely in animal evolution (Orr 1990, but see Mable 2004).

Triploidy is a special case of ploidy status because its genomic imbalance leads to very low fertility, such that it is often associated with “sterility” and has been proposed as a method to confine non-native cultivated species (Hulata 2001) or reduce the impact of escapes (Piferrer et al. 2007). In fact, triploidy does not always result in an evolutionary dead-end, especially when accompanied by clonal reproduction as in some plants. Chromosome doubling at meiosis may restore fertility and promote the fixation of fully fertile autotetraploid individuals (Husband 2004).

Economically beneficial characteristics of polyploidy have led triploidy to be used in a wide range of farmed plants and aquatic animals to improve their production, and notably in bivalve molluscs (Beaumont & Fairbrother 1991, Nell 2002), where artificial induction is made possible by characteristics of meiosis timing in their female gametes. Methods inhibiting polar body expulsion using cytochalasin B or 6-DMAP (Gérard et al. 1999) were developed for triploid induction first of all and allowed diploid-triploid comparisons to be made (e.g., for oysters, see Allen & Downing 1986, Kesarcody-Watson et al. 2001a, Mallia et al. 2006, for mussels, see Brake et al., 2004, for clams see Guo & Allen 1994c, for scallops see Taberini 1984, Allen et al. 1986, Racotta et al. 2008). More recently the production of tetraploid oysters (Guo & Allen 1994b, Eudeline et al. 2000, McCombie et al. 2005a) has led

to a large increase in the aquaculture of triploid oysters produced by mating tetraploid with diploid parents (Guo et al. 1996b). Although the relative performances of diploids and triploids vary according to environmental conditions (Shpigel et al. 1992), triploid oysters often show faster growth (e.g. Allen & Downing 1986, Nell & Perkins 2005), better survival (Boudry et al. 2008), and a strong - but variable - diminution of gonad development when compared with their diploid counterparts (Allen & Downing 1990, Annexe I de cette thèse) (for a review of various enhancements of oyster yield offered by triploidization, see Nell 2002). The effect of triploidy on reproductive effort is of particular interest because it leads to a more constant flesh quality through the year, whereas gametogenesis strongly reduces the marketability of diploid oysters during their reproductive period (Allen & Downing 1990). Interestingly, the availability of tetraploid oysters has also offered new perspectives in terms of (1) selective breeding strategies (McCombie et al. 2005ab) and (2) comparison between triploid individuals obtained by different methods (Eudeline 2004).

Their minimal reproductive effort means that triploid individuals are considered as worthwhile models for ecophysiological investigations (Hoonkoop 2003), as well as ecotoxicological (Amiard et al. 2005, Marie et al. 2006) or immunological (Gagnaire et al. 2006) studies. This is notably the case in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, a species in which reproduction strongly influences the annual energy budget (Deslous-Paoli & Héral 1988; Pouvreau et al. 2006).

But despite the advantages they offer, triploid Pacific oysters are in fact only partially sterile (Allen & Downing 1990, Normand et al. 2008). Their allocation to reproduction is not low enough to consider them as non-reproductive (*i.e.* “zero gametogenesis controls”) and may be detrimental to their saleability for human consumption and risky for their use in genetic confinement. Numerous hypotheses have been suggested to explain the difference in growth and survival between diploid and triploid bivalves, including polyploid gigantism (Guo & Allen 1994c), heterozygosity (Stanley et al. 1984, Hawkins et al. 2000), gene dosage (Zouros et al. 1996) and, of course, “sterility” (Allen & Downing 1986) which would allow energy re-allocation from gonadic development to somatic growth. However, probably due to the relative technical difficulty of quantifying reproductive allocation in oysters, this factor has seldom been recorded when comparing growth performance between diploid and triploid oysters (e.g. Garnier-Géré et al. 2002). Moreover, classical methods employed to measure gametogenesis in diploids tend to underestimate the amount of energy devoted to reproduction in triploids, due to intrinsic characteristics of these individuals like retardation of

gametogenesis and incomplete maturation of germ cells (Normand et al. 2008). Finally, resource allocation-based life history traits such as growth, survival and reproduction are correlated in *Crassostrea gigas* (Ernande 2001), and triploidy affects most if not all of these traits, making comparisons between diploid and triploid individuals for any one of these traits difficult to interpret. As a result, despite the large number of studies dedicated to the characterization of the physiological performances of triploid Pacific oysters, some basic knowledge concerning the quantification of their energetic allocation to reproduction, sex determinism, and the relation between growth and reproduction is still lacking.

In the present study, reproduction and growth were compared between diploid and two different types of triploid oyster, using five-month-old oysters reared in intensive nursery conditions. These triploids were produced either by polar body II (PBII) retention or by crossing diploid females and tetraploid males. An examination of these different types of triploid oysters was judged necessary because of their fundamental differences, which could influence their growth and reproductive characteristics, e.g. chemical induction by PB inhibition leads to triploidy from the addition of two chromosome sets from the mother and one from the father, while the progeny of a diploid \times tetraploid cross will have one set from the mother and two from the father. The use of triploid individuals from PB retention is a practical manner by which to compare performances of diploids and triploids from the same breeders (i.e. avoiding potential effects due to genetic determinism rather than an effect of triploidy on the phenotypic traits studied), but the physiology of chemically induced triploid oysters may although be disturbed by chemical treatment independently from triploidy (Gouletquer et al., 1996). Chemical production of triploid oysters has declined in the last decade, with the growing use of tetraploid genitors and public unpopularity of the use of chemicals on foodstuffs (Guo & Allen 1994b). Diploid \times tetraploid crosses also provide higher yields of triploid oysters, which has led to an overall expansion of triploid oysters in the shellfish industry and thus in the environment.

We focused on young individuals so as to minimize potential bias from the expected differential energy storage dynamics between diploid and triploid oysters. Reproduction was assessed using qualitative and semi-quantitative histological measures, and growth was evaluated by the weight of individuals at the end of the experiment (at 5 months of age). Our aim was to quantify the reproductive difference between individuals of the three groups in relation with their sex and body weight.

II. Material and methods

II.1. Production of the biological material and rearing conditions

In April 2006, following a maturation period under standard conditions (Fabioux et al. 2005) in the Ifremer experimental hatchery (La Tremblade, Charente Maritime, France), 12 diploid female oysters, 16 diploid males and 16 tetraploid males were randomly chosen to be crossed to produce three groups of individuals for study. Genitors were strip-spawned individually and concentrations of gametes estimated using Thoma or Malassez slides coupled to an image processing system (Samba Technologies, Marcoussis, France). This procedure allowed us to balance the gametic contribution between genitors.

Oocytes from each of the 12 females were then divided in two pools and fertilized at a ratio of 100 spermatozoa per oocyte by pooled sperm of either the 16 tetraploid or the 16 diploid males. The crosses with tetraploid males produced a first triploid group (named '3nDT' as in Wang et al. 1999). Embryos resulting from crosses with diploid males were subsequently divided in two groups of equal size. One was treated with cytochalasin B to induce the retention of the 2nd polar body, thus producing a second triploid group by chemical induction (named '3nCB' as in Wang et al. 1999) following the method described in (Gérard et al. 1999), while the other was allowed to develop normally and produced a diploid group (2n). The 2n and 3nCB groups were thus bred from exactly the same genitors, and the 3nDT group from the same females but different (tetraploid) males. This crossing design allowed us to minimize genetic differences between triploid individuals and diploid controls by using the same breeders as much as possible to produce the three groups.

Embryos from different females and groups were reared separately in 36 30-litre larval rearing tanks until day 2 post-fertilization when we selected the progenies of the 6 females presenting the highest triploidization success in the 3nCB group. Progenies from these same 6 females were then also chosen in the other groups (2n and 3nDT). Within each group, the progenies of these 6 females were then mixed together and the pooled progenies reared in 3 150-litre tanks until metamorphosis and settlement. Larval rearing and settlement procedure were conducted as described by Ernande et al. (2003). The newly settled spat were grown in a micronursery for one month up to 2 mm length and were then transferred to the Ifremer

experimental nursery in Bouin (Vendée, France) where they were reared in 50-cm diameter mesh-bottomed tubs in a single concrete tank with a seawater upwelling system (Bacher & Baud 1992). *Skeletonema costatum* was fed to oysters *ad libitum* ($0.5 \cdot 10^9$ cells/L). Survival was monitored over the whole rearing period. Finally, 320 randomly chosen 5-month-old oysters were sampled from each group.

II.2. Triploidy determination

Induction success was verified by flow cytometry using DAPI staining of the total DNA content of the nucleus (Chaiton & Allen 1985, in Nell 2002). In two-day old larvae, ploidy verification tests were performed on pools of 100 individuals (estimated after counting on a squared slide), whereas analyses were performed individually for spat. Ploidy level was checked twice during the rearing period and a final time on the sampling day, by testing more than 100 randomly chosen individuals each time.

II.3. Body mass

Soft flesh weight of all the individuals sampled for this study was weighed to 0.01 g precision. Flesh was superficially dried by swabbing with soft absorbent paper.

II.4. Histology

Qualitative and quantitative measures of reproductive effort were acquired following the method described in Enriquez-Diaz (2004). Briefly, the whole visceral mass of each oyster was separated from peripheral tissues (*i.e.* mainly the gills, mantle and adductor muscle), individually labelled, and fixed in Davidson's fluid. A transverse cross section was then realized precisely through the middle of the visceral mass, dehydrated in an ascending alcohol series, wax embedded, sliced at 5 μm , and put on a standard histological slide. The resulting slides were finally coloured using hematoxylin-eosin solutions.

II.5. Qualitative analysis of reproductive stage

Reproductive stage was determined following a qualitative classification (5 stages: 0 to 4) adapted from Mann (1979) and Lango-Reynoso (1999) (Table 7). For triploid asynchronous hermaphrodites that presented several cohorts of germ cells, 2 different cases were met:

- One gender was clearly dominant and exhibited maturing germ cells, whereas the cohort of germ cells of the opposite gender was marginal and often atretic. In this case the reproductive stage was then determined for the dominant cohort only.
- Cohorts of male or female germ cells seemed to be maturing simultaneously, therefore indicating a case of apparently “true” hermaphroditism. As this condition was very seldom found during our study (3 out of 898 individuals determined for sex), we decided to exclude these individuals from the dataset to simplify the analyses.

The slides were first examined for gender determination and classification of reproductive stages. Depending on the presence or absence of male and/or female germline cells, individuals were classified as either male, female, hermaphrodite (asynchronous) or sexually undifferentiated.

Table 7: Classification of reproductive stages based on Mann (1979) and Lango-Reynoso (1999).

Stage	Histological description
0 (resting stage)	No trace of sexual development; follicles are non-existent or elongated and consist of undifferentiated germinal epithelium.
1 (early growth stage)	Follicles are small and isolated with numerous spermatogonia or oogonia.
2 (late growth stage)	Follicles are actively developing with primary gametocytes and some free (secondary) spermatozoa and oocytes.
3 (mature)	Near ripe or ripe follicles, densely packed with maturing gametes; presence of mature gametes.
4 (spawning and reabsorption stages)	Follicles distended, numerous gametes remain.

II.6. Quantitative analysis of reproductive effort

As the second step of our evaluation of reproduction, the slides were scanned with a digital camera attached to a microscope and treated using image analysis software (Imaq Vision Builder, National Instruments Corp.). Reproductive effort was estimated by gonadic occupation (GO), measured as the ratio between the gonad area (GA) and the whole visceral mass area (WVMA) following the relationship presented in Enriquez-Diaz (2004) as:

$$GO (\%) = GA \times 100 / WVMA$$

II.7. Statistical analysis

The effects of the ploidy level (2n vs. 3n) and of the triploidy induction method (3nDT vs. 3nCB) on the frequencies of sex classes and maturity stages were analysed using generalized linear models (proc GENMOD with contrast statement, SAS), considering the induction method effect as nested within the ploidy effect (Littel et al. 2002). The comparison between groups for gender classes or maturity stages was realized using model adjustments for multinomial distributions, whereas class by class comparisons were performed considering binomial distributions.

Linear models (proc GLM, SAS) were also used to analyze normally distributed data on reproductive effort ($\log(GO+1)$) and final soft flesh weight (FW) (Littel et al. 2002). In both cases, differences between ploidy groups and sexual dimorphisms were tested by between-group analysis of variances with the experimental group, gender, and their interaction as fixed effects (Littel et al. 2002). To further investigate sexual dimorphism, we then performed ANOVAs (proc GLM, SAS) with a gender effect within each ploidy group. Significance levels of the differences between different factor levels (ploidy group and gender) from the ANOVAs were tested by pair using the LSmeans option (proc GLM, SAS) (Littel et al. 2002). The sexually undifferentiated individuals were excluded from this particular analysis as they could not be classed as belonging to any gender class.

We intentionally decided to avoid using fresh mass as an explanatory covariate for reproductive effort because this trait integrates the gonadic as well as the somatic weight.

III. Results

III.1. Proportion of triploid individuals in the two triploid groups

Across the 12 parental females used in our crossing scheme, cytochalasin B induction led to 40 to 100 % triploidy depending on half-sib family. We selected and mixed together the 6 best female progenies, in which triploidy induction was higher than 95%, to make the 3nCB group. At the spat stage (5 month after fertilization), triploidy rate in the 3nCB (n = 110) and 3nDT (n = 115) groups was 95.5 and 97.4 % respectively. The remaining oysters consisted of 3.6 and 1.7 % diploids in the 3nCB and 3nDT group respectively. Additionally, one mosaic individual was observed in each of these groups.

III.2. Sexual maturity

The classification of individuals by their reproductive stage (Table 7) showed a highly significant difference in the frequency distribution of individuals across different stages between diploid and triploid oysters (2n vs. 3n for all reproductive stages: $\chi^2 = 260.8$, $P\chi^2 < 0.0001$; Table 8). Between the two groups of triploid oysters, the difference was more limited but significant (3nCB vs. 3nDT for all reproductive stages: $\chi^2 = 4.7$, $P\chi^2 = 0.03$; Table 8). More precisely, triploids seemed to present a relative delay in their gonadogenesis dynamics compared to diploids (Table 8). Indeed, a few individuals of the triploid groups showed no development of gonadic tissues at all (stage 0: 7.1 % and 2.4 % for group 3nCB and 3nDT respectively) whereas all diploid individuals had initiated gonadic maturation (stage 0: 0 %). By 5 months of intensive rearing, most of the oysters of the triploid groups were at precocious stages of gonadic development and frequencies of individuals at stages 1 and 2 were significantly superior to than in the corresponding diploid sample (2n vs. 3n: stage 1, $\chi^2 = 15.88$, $P\chi^2 < 0.0001$ and stage 2, $\chi^2 = 237.43$, $P\chi^2 < 0.0001$) (Table 8). In contrast, diploid spat was mainly reproductively mature, with 80.9 % of individuals at stage 3. Only a few individuals from the triploid groups (4.2 % for the 3nCB group and only 0.4 % – one individual – for the 3nDT group) achieved complete maturation of their gonadic tissues (2n

vs. 3n: stage 3, $\chi^2 = 111.27$, $P\chi^2 > 0.001$) (Table 8). There was little apparent difference between the 3nCB and 3nDT groups, except for the occurrence of stage 2, which was clearly higher in the 3nDT group (3nCB vs. 3nDT: stage 2, $\chi^2 = 15.19$, $P\chi^2 < 0.0001$) (Table 8).

Table 8: χ^2 tests performed on maturity stages and gender classes

	Groups			2n vs. 3n Chi ² contrast (p value)	3nCB vs. 3nDT Chi ² contrast (p value)
	2n N (%)	3nCB N (%)	3nDT N (%)		
Stage 0	0 (0)	17 (7.1)	6 (2.4)		5.59 $p = 0.01$
Stage 1	2 (0.7)	35 (14.6)	22 (8.7)	15.88 $(p < 0.0001)$	4.09 (0.04)
Stage 2	52 (18.4)	178 (74.2)	223 (88.1)	237.43 $(p < 0.0001)$	15.19 $(p < 0.0001)$
Stage 3	229 (80.9)	10 (4.2)	1 (0.4)	111.27 $(p < 0.0001)$	5.17 (0.02)
Stage 4	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)		
For all stages	283	240	253	260.7 $(p < 0.0001)$	4.7 $(p = 0.03)$
Males	234 (82.7)	180 (80.4)	182 (73.7)	3.21 (0.07)	0.59 $(p = 0.09)$
Females	44 (15.5)	20 (8.9)	41 (16.6)	1.59 (0.21)	5.96 (0.01)
Hermaphrodites	5 (1.8)	24 (10.7)	24 (9.7)	14.98 (0.01)	0.04 (0.70)
For all classes	283	224	247	4.82 (0.03)	2.27 (0.13)

III.3. Sex determinism

Percentages of individuals belonging to the different gender classes showed a significant difference between ploidy levels (2n vs. 3n for all gender classes: $\chi^2 = 4.82$, $P\chi^2 = 0.03$) mainly due to the higher occurrence of hermaphrodites in triploid groups. In contrast, triploidy induction method did not appear to have a significant influence on the frequency of individuals in different gender classes (3nCB vs. 3nDT: $\chi^2 = 2.27$, $P\chi^2 = 0.13$) (see Table 8). Sex ratio was clearly unbalanced overall as male was the dominant gender for all ploidy groups (82.7, 80.4 and 73.7 % in group 2n, 3nCB and 3nDT respectively). Hermaphrodites were significantly more abundant in both 3nDT and 3nCB groups than in the diploid group (10.7 % and 9.7 % for groups 3nCB and 3nDT, respectively, vs. 1.8 % for group 2n; 2n vs. 3n: $\chi^2 = 14.88$, $P\chi^2 = 0.0001$) (Table 8).

Females appeared to be scarcer in the 3nCB group than in the 3nDT group (16.6 % vs. 8.9 % for group 3nCB and 3nDT respectively; 3nCB vs. 3nDT: $\chi^2 = 5.96$, $P\chi^2 = 0.01$) but there was no difference between diploid and triploid groups (2n vs. 3n: $\chi^2 = 1.59$, $P\chi^2 = 0.21$) (Table 8).

III.4. Effects of ploidy level, triploidy induction method and gender on reproductive effort

The two triploid groups showed an average gonadic occupation (GO) 2.1 times lower than their diploid relatives (Figure 25) (Table 9). Mean GO was 25.2 ± 11.8 , 11.8 ± 7.8 and 11.8 ± 7 % in groups 2n, 3nCB and 3nDT respectively (Figure 25) (Table 9). Between-group ANOVAs showed neither a significant effect of group ($F_{2,4} = 4.07$, $P_f = 0.1$) nor of gender class ($F_{2,4} = 0.07$, $P_f = 0.93$) on gonadic occupation, but a significant effect of the interaction between these two factors ($F_{4,704} = 4.65$, $P_f = 0.001$; Table 10). Pairwise comparisons between groups showed significant differentiation of the 2n group from each of the 3n groups separately (2n – 3nCB: $P < 0.0001$; 2n – 3nDT: $P < 0.0001$), but no differences in gonadic occupation between the two triploid groups. Pairwise comparisons were then performed within groups to discriminate the effects of the different genders.

Within the diploid group, no significant effect of gender was observed on gonadic occupation ($F_{2,256} = 2.13$; $P_f = 0.12$), although a slight but significant ($P_r = 0.04$) difference in reproductive effort was found between females and males (Table 10). Female diploid oysters exhibited a mean reproductive effort 1.4 times higher than males (32.6 % vs. 23.8 %) (Figure 25) (Table 9).

When considering the 3nCB group, no significant effect of gender was found either in the overall ANOVA ($F_{2,209} = 0.06$; $P_f = 0.94$) or using pairwise comparisons. In the 3nDT group, however, gender did have a highly significant effect on reproductive effort ($F_{2,239} = 9.25$; $P_f < 0.001$) (Table 10). Within-group comparisons showed a significantly higher gonadic occupation in 3nDT males and hermaphrodites compared with 3nDT females (respectively 12.8 % and 12.5 % vs 7.5 %) (Figure 25 and Table 9). Unlike diploid females, triploid females did not seem to present a higher gonadic occupation than other sexually differentiated individuals of their group in either case.

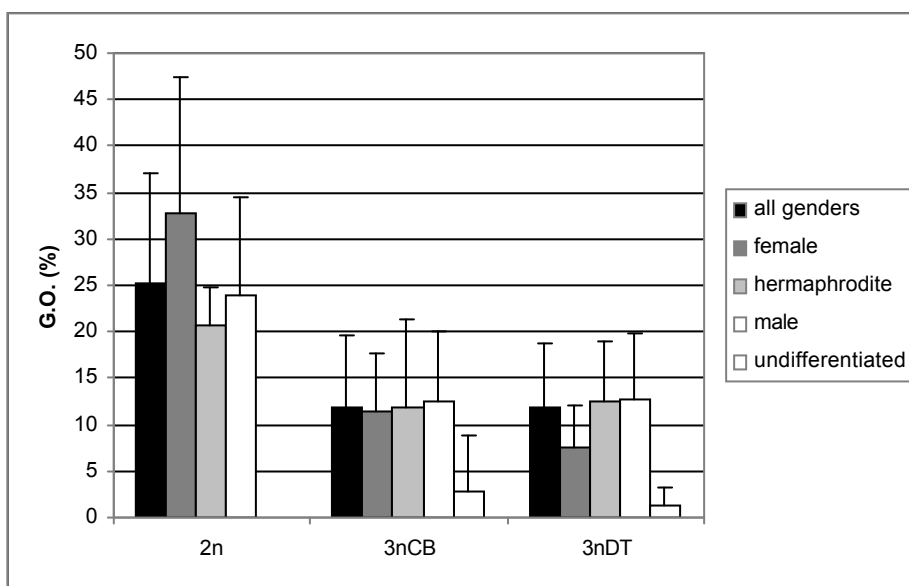


Figure 25: Mean Gonadic Occupation (% of visceral mass area) by gender and by group, vertical bars represent the standard deviations.

Table 9: Mean and standard deviation of gonadic occupation by group and gender.

Gonadic Occupation by gender and group	Gender	N	Mean G.O. (%)	Standard deviation
2n	All Genders	259	25.2	11.8
	Hermaphrodite	4	20.6	4.2
	Female	42	32.6	14.7
	Male	213	23.8	10.7
	Undifferentiated	13	2.7	6.2
3nCB	All Genders	226	11.8	7.8
	Hermaphrodite	22	11.8	9.4
	Female	18	11.4	6.3
	Male	173	12.6	7.4
	Undifferentiated	13	2.7	6.2
3nDT	All Genders	246	11.8	7.0
	Hermaphrodite	24	12.5	6.3
	Female	40	7.5	4.5
	Male	178	12.8	7.1
	Undifferentiated	4	1.3	2.0

Table 10: Results of analysis of variance on reproductive effort, and pairwise comparisons between factor levels (GO: gonadic occupation; Herma.: hermaphrodite).

Between group ANOVA: $\log(\text{GO}+1) = \text{GENDER} + \text{GROUP} + \text{GROUP} \times \text{GENDER}$

Analysis of variance				LS means – estimates and probabilities associated with pairwise comparisons			
Results for fixed effects				Group	Log(GO+1)	2n	3nCB
Source	DF	F	Pr> F	2n	3.14		
Group	2	4.07	0.1	3nCB	2.38	< .0001	
Gender	2	0.07	0.93	3nDT	2.31	< .0001	0.507
Group *	4	4.65	0.001				
Gender							
Residuals	704						

Within group ANOVA: $\log(\text{GO}+1) = \text{GENDER}$

Analysis of variance					LS means – estimates and probabilities associated with pairwise comparisons			
2n	Source	DF	F	Pr> F	Gender	Log(GO+1)	Female	Herma.
	Gender	2/256	2.13	0.12	Female	3.31		
					Herma.	3.06	0.523	
					Male	3.05	0.040	0.979
3n	Source	DF	F	Pr> F	Gender	Log(GO+1)	Female	Herma.
CB	Gender	2/209	0.06	0.94	Female	2.39		
					Herma.	2.34	0.841	
					Male	2.40	0.958	0.735
3n	Source	DF	F	Pr> F	Gender	Log(GO+1)	Female	Herma.
DT	Gender	2/239	9.25	0.0001	Female	2.01		
					Herma.	2.48	0.003	
					Male	2.45	< .0001	0.884

III.5. Effects of ploidy level, triploidy induction method and gender on final weight

Triploid oysters presented higher soft flesh weight than diploids at the sampling date (Figure 26) (Table 11): 3nCB individuals were the heaviest (mean weight 0.49 ± 0.29 g), followed by 3nDT individuals (mean weight 0.37 ± 0.25 g) and then 2n individuals (mean weight 0.25 ± 0.16 g). Weight was significantly affected by ploidy group ($F_{2,4} = 83$, $P_f = 0.04$), gender ($F_{2,4} = 12$, $P_f = 0.02$) and their interaction ($F_{4,743} = 4.21$, $P_f = 0.002$; Table 12). Comparisons of soft flesh weight by group and gender showed the same trend for all three groups (Figure 26) (Table 11): females were the largest individuals, followed by hermaphrodites, and males. Females were indeed significantly heavier than males ($P_r > 0.0001$; Table 12) in all three groups, and significantly heavier than hermaphrodites in the 3nDT group. Hermaphrodites presented intermediate mean weight between males and females, and were only significantly different from males in the 3nCB group (Figure 26 and Table 11).

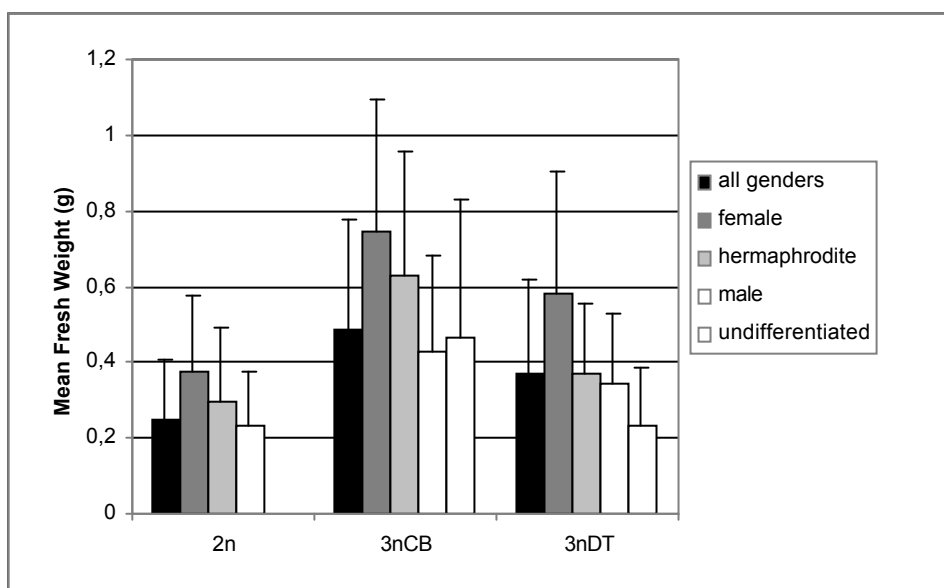


Figure 26: Mean Final Weight (g) by gender and by group, vertical bars represent the standard deviations.

Table 11: Mean and standard deviation of final weight by group and gender.

Final Weight by gender and by group	Gender	N	Mean Weight (g)	Standard deviation
2n	All Genders	282	0.25	0.16
	Hermaphrodite	5	0.29	0.19
	Female	44	0.38	0.20
	Male	233	0.23	0.14
3nCB	All Genders	231	0.49	0.29
	Hermaphrodite	24	0.63	0.33
	Female	19	0.74	0.35
	Male	174	0.43	0.25
	Undifferentiated	14	0.46	0.37
3nDT	All Genders	253	0.37	0.25
	Hermaphrodite	24	0.37	0.18
	Female	41	0.58	0.32
	Male	182	0.34	0.18
	Undifferentiated	6	0.23	0.15

Table 12: Results of analysis of variance on body weight, and pairwise comparisons between factor levels (BW: body weight; Herma.: hermaphrodite).

Between group ANOVA BW = GENDER + GROUP + GROUP x GENDER

Analysis of variance				LS means – estimates and probabilities associated with pairwise comparisons			
Results for fixed effects				Group	BW (g)	2n	3nCB
Source	DF	F	Pr> F	2n	0.30		
Group	2	8	0.04				
Gender	2	12	0.02	3nCB	0.61	< .0001	
Group *	4	4.21	0.002				
Gender				3nDT	0.43	0.001	< .0001
Residuals	743						

Within group ANOVA BW = GENDER

Analysis of variance					LS means – estimates and probabilities associated with pairwise comparisons			
2n	Source	DF	F	Pr> F	Gender	BW	Female	Herma.
	Gender	2/279	16.05	< .0001	Female	0.38		
					Herma.	0.29	0.266	
					Male	0.23	< .0001	0.376
3n	Source	DF	F	Pr> F	Gender	BW	Female	Herma.
CB	Gender	2/220	18.12	0.94	Female	0.75		
					Herma.	0.65	0.212	
					Male	0.43	< .0001	0.001
3n	Source	DF	F	Pr> F	Gender	BW	Female	Herma.
DT	Gender	2/244	21.12	< .0001	Female	0.58		
			5		Herma.	0.37	0.001	
					Male	0.34	< .0001	0.531

IV. Discussion

IV.1. Triploidization

We were particularly careful during this study to work using triploid groups presenting a high proportion of triploid individuals, as the methods used rarely produce 100 % triploidy. We minimized the presence of diploid individuals in the cytochalasin B-induced group by making treatments on fertilised oocytes from individual females, keeping the maternal half-sib families separate initially, then selecting the best ones with the highest percentage triploidy. In a similar way, Eudeline et al. (2000) optimized tetraploidy induction using oocytes from individual females rather than making an oocyte pool from a number of females. As a result of our procedure, the two triploid groups that we studied exhibited a very high (> 96%) percentage of triploid individuals. The remaining ones were diploids or mosaics. Incidental diploids could result from variable gamete ploidy (Stiles & Choromanski 2002), ploidy reversion (Allen et al. 1999), inter-batch contamination or because cytochalasin B induction is often not totally effective (Gérard et al. 1999). Mosaics are more likely to be due a fundamental instability of artificial triploid animals (Allen & Guo 1996, Allen et al. 1999). To have a precise understanding of the nature of such exceptions, a more in depth study requiring chromosome spreads would be needed as chromosome counting is currently the reference method for studying chromosome number anomalies in oysters (e.g. Wang et al. 1999, McCombie et al. 2005b, Batista et al. 2007), as flow cytometry is unlikely to detect small variations of chromosome number. For the purposes of the present study on the comparison of reproductive effort and growth between the three studied groups, the small proportion of non-diploid individuals can only have had a very limited effect, as the number of $3n$ oysters of both groups showing reproductive development far exceeds the non-triploid percentage detected. The high frequency and degree of reproductive development that we observed in the triploid groups cannot therefore be attributed to the limited presence of diploids.

IV.2. Gametogenesis in diploid and triploid spat

The most striking result of our work was the very high proportion of reproductively maturing spat. For the diploid group, all individuals appeared to have initiated their gonadic maturation, despite being only 5 months old, with a corresponding mean soft flesh mass of 0.25 g. This very small weight at sexual maturity is lower than the estimated 0.4 g minimum proposed by Pouvreau et al. (2006) and suggests that no minimal size or age is required for Pacific oyster to initiate gonadic maturation. In other words, it may well be that metamorphosis and sexual maturation coincide, so that adult traits are fixed after metamorphosis, but the high availability of nutrients in intensive nursery conditions probably lead to an enhancement of such precocious gonadogenesis.

Surprisingly, and despite the partial sterility of triploid oysters, the rate of maturing individuals was very high in the two triploid groups (92.9 % and 97.6 % for group 3nCB and 3nDT respectively). Energy allocation to reproduction relative to soma, estimated by gonadic occupation, seemed to be far from negligible in the two triploid groups, which exhibited only a 47 % reduction in gonadic occupation compared to the diploid group. Measures of reproductive effort in triploid Pacific oysters have been shown to depend strongly on the method of estimation chosen (Normand et al. 2008). For such oysters, which are only known to reach complete gonadic maturation very rarely, counts of the truly mature gametes reflect their reproductive potential (*i.e.* their probability of producing any progeny) but not the amount of energy invested in developing reproductive tissues.

IV.3. Disturbance of gametogenesis in triploid oysters

Another interesting result is the clear difference between diploid and triploid individuals in terms of reproductive parameters such as gonadic occupation. Triploid GO was estimated at half of the diploid one, and there was an higher proportion of hermaphrodites and undifferentiated individuals in the triploid groups. The two groups of triploid oysters were obviously more similar to one another than either was to the diploid group, despite the common parents used for the 3nCB and 2n groups. The method of triploid induction used (chemical induction or mating between diploid and tetraploid broodstock) may lead to genetic differences at several levels, as mentioned in previous studies: unbalanced contribution of

parental genetic values (Blanc et al. 2005), higher heterozygosity of 3nDT individuals (Hawkins et al. 2000), effects of unintentional selection during the production of tetraploid oysters (i.e. selection of fertile triploid females, Guo & Allen 1994b), as well as long-term toxic effects of chemical cytoblocking molecules such as cytochalasin B (Gouilletquer et al. 1996). The effect of triploidy on early reproduction appears, however, to be very similar whatever the induction method used. The frequently observed minimal fertility of triploid individuals is a general pattern, directly related to the ploidy level and already mentioned for numerous species in both plants and animals, which seems to be independent of other indirect effects. One causal factor of the infertility of triploid individuals is related to chromosomal pairing, segregation during meiosis and the fact that homologous chromosomes fail to synapse due to genomic imbalance (Allen et al. 1986, Crane & Sleeper 1989, Otto & Whitton 2000, Maldonado-Amparo et al. 2004, Li et al., 2009b). This is consistent with our results and some previous studies (Allen & Downing 1990, Normand et al. 2008), all of which show that the difficulty met by triploid Pacific oysters in developing gonadic tissues occurs in the final stage of gametogenesis. High ratios of individuals presenting stages at least as developmentally advanced as maturing gonias (stages 1 and 2: 92.9 % and 97.6 % for groups 3nCB and 3nDT, respectively) are indeed observed, while individuals showing fully mature gonadic tissues are almost absent in triploid groups (stage 3: 4.1 %, 0.4 % and 80.9 % for groups 3nCB, 3nDT and 2n, respectively). Such irregular gonadogenesis was revealed by our histological observations of asynchronous maturation of different cohorts of germ cells, characterized by the very high ratios of asynchronous hermaphrodites. We also noticed marginal, but recurrent, atretic gametes (results not shown) while another cohort of germ cells was still maturing. In contrast, maturation in diploid oysters appears to be a continuous phenomenon that leads to homogeneous and mature gonadic tissue. Another hypothesis of the dynamics of gonadic maturation in triploid oysters is that they may develop a first cohort of germ cells that reaches the gonial stage but then faces problems at meiosis that prevent complete maturation of most of the gonias. The oysters then halt their gametogenesis but then initiate a new maturation episode with a new cohort of germ cells, sometimes accompanied by a change of gender (described as asynchronous hermaphroditism) and the atresy of the original germinal products.

Problems of chromosome pairing probably represent the main reason why gamete production, and zygote viability, remain haphazard in triploid animals, but do not lead to a complete inhibition of gametogenesis. It appears clear that a variable proportion of gonias do manage to mature beyond the premeiotic stage to reach the gametic stage, as demonstrated by the high

occurrence of stage 2 in the triploid groups of this study. This differential ability across germ cells from the same individual to fully mature remains intriguing, especially considering the apparent difficulty for trivalent homologous chromosomes to associate in synapsis (see Crane & Sleeper 1989, for a study of meiotic chromosome association in polyploids, McKee 2004, for a review of homologous pairing, and Feitsma et al., 2007 for a case study of chromosome pairing problems), but this difficulty has been noticed for most species in which polyploidy has been induced (Maldonado-Amparo 2004, Cal et al. 2006, Allen et al. 1986).

IV.4. Sex determinism and sexual dimorphisms in diploid and triploid spat

One unexpected result of our study was the slight, but significantly higher gonadic occupation of diploid females compared to males. This result is of interest as it is, to our knowledge, the first time that sexual dimorphism (not protandry, which is a different phenomenon well known in bivalves) has been reported for reproductive effort in Pacific oysters, preliminary studies having shown no difference (Ernande et al. 2004). A study of individual temporal dynamics of gametogenesis is now needed to test whether males and females mature at the same speed in *C. gigas*. Conversely, the reverse gender effect on gonadic occupation appeared in 3nDT oysters of this study as males and hermaphrodites had larger gonads than females. In all cases, the enhanced reproductive effort in diploid females (x 1.4) compared with diploid males was sufficiently significant that we looked more closely at this particular aspect to examine its implications for growth and fitness. *C. gigas* is commonly described as a protandric dioecious mollusc, in which most individuals are males during the first reproductive event, whereas latter seasons of maturation usually show an increasing proportion of females (Galstoff 1964). Nevertheless, the relative influence of genetic versus environmental (potentially mediated by physiological state) factors in determining the ability of a single individual to shift from one gender to another remains uncertain. In general, molluscs exhibit a large variety of sex systems as well as various mechanisms for sex determination (review in Yusa 2007). For *C. gigas*, it was presumed that sex determinism is mainly controlled by environmental factors (Amemiya 1929, Galstoff 1964), but Guo et al. (1998) proposed genetic determinism of sex in oysters on the basis of observed sex ratio variation between families. In a recent study, Baghurst & Mitchell (2002) found that males

and females presented different growth rates. Following Guo et al. (1998), they interpreted this difference as the tendency of genetically determined females to exhibit higher growth rates than males, rather than the tendency of fast-growing individuals to be more susceptible to mature as females.

Induced triploidy can offer an experimental way to study the genetic basis of sex determination, because of the parental imbalance caused by this manipulation. In fish, triploidization has been widely used as a way to control sex ratio and produce mono-gender populations (review in Devlin & Nagahama 2002). Triploidy also impacts sex ratio in some bivalve species: triploid *Mya arenaria* or *Argopecten ventriculosus* are found to be only females (Allen et al. 1986, Ruiz-Verdugo et al. 2000) whereas triploid *Mytilus edulis* are only males (Brake 2004). In our study, no significant difference in sex ratio was observed between the three studied multi-family groups. This absence of direct impact of triploidy on sex ratio in *C. gigas* has also been mentioned in previous studies (Allen & Downing 1990, Normand et al. 2008) and suggests that genetic effects related with parental dosage on sex determinism are weak in this species.

From an evolutionary point of view, protandry in dioecious species is often explained by the size advantage hypothesis (Ghiselin 1969). Under this hypothesis, the reproductive success of females is limited by their total size, whereas the males' ability to fertilise eggs is less dependent on size. This discrepancy results from the much higher number of spermatozoa that can be produced by a male compared with the number of oocytes produced by a female of equal size, and the correlation between the number of eggs produced and a female's size. In our study, the relationship between gender and final soft flesh weight were clear: females had the heaviest soft flesh weight, followed by hermaphrodites and finally by males, which were the smallest. This may reflect a sex determination strategy in *C. gigas*, partly based on individual status. Well nourished oysters with high energy budget or large energy stores would preferentially develop female gonads, whereas slow growing individuals would channel their reproductive effort to male gonads, thus optimising the number of gametes produced. Following this hypothesis, asynchronous hermaphrodites, like those we observed, would be oysters of intermediate condition that began to initiate gonadic maturation for a given gender, and then changed their sexual function. This hypothesis is consistent with our data and with the results of Baghurst & Mitchell (2002), though it might diverge from their own hypothesis of genetic determinism. Our results could be interpreted as additional evidence for the importance of environmental control of sex-determinism in the Pacific oyster, notably mediated via individual energy budget. Genetic factors could indeed play a

role via their effects on energy allocation and growth. The fact that sexually undifferentiated individuals in triploid groups also exhibited lower body weights could also be considered as an indication of energy-mediated sex determinism in *C. gigas*. We hypothesize that gonadic development is under the control of energy budget, and thus related to both growth and reproduction. Under this hypothesis, temperature (Fabioux et al. 2005) and food availability (Ernande et al. 2004) are the two major factors controlling the gonadic development, with a threshold level of stored energy that needs be reached to initiate gonadogenesis in spat. This threshold energy density level:

- i. would be higher in triploid than in diploid individuals (as both triploid groups usually exhibited far more undifferentiated individuals than diploid ones),
- ii. may be positively correlated with the probability of an individual performing gametogenesis as a female for either ploidy group (as better nourished individuals appear to mature as females).

Our results could also have implications for selective breeding for improved growth in Pacific oyster once the level of genetic influence is understood. More light could be shed on this aspect by looking at the influence of parentage by using genetic markers. If individuals that exhibit female gender in their first years of maturation are intrinsically faster-growing oysters, sex ratio of families could be considered as a way to select fast-growing families. By a similar strategy, individual selection of the young females in a population could also lead to faster growing progenies.

Acknowledgements. The authors wish to thank the Ifremer hatchery and the nursery teams in La Tremblade and Bouin (Ifremer's Département Amélioration génétique, Santé animale et Environnement) for their technical assistance during the larval and nursing rearing periods. The present study was partly supported by the Région des Pays de la Loire as part of the topic "Bioproductions et ressources marines" within the project "Gerrico". This work was made possible by a PhD grant allocated by Ifremer and Région Poitou-Charentes to JN.



Chapitre II

Etude des bases génétiques de la variation de l'allocation à la reproduction et à la croissance chez de jeunes huîtres creuses diploïdes et triploïdes élevées en mélange de familles.

A mixed-family study of the genetic bases of allocation to reproduction and growth variation in diploid and triploid young Pacific oysters.

En collaboration avec Bruno Ernande, et Pierre Boudry

Article destiné à être soumis à Genetics Selection and Evolution

Résumé

L'induction de la triploïdie est une méthode d'amélioration génétique employée chez les végétaux, les poissons et les mollusques car elle entraîne des altérations du phénotype qui améliorent les rendements de production agricoles. Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'induction de la triploïdie résulte en une amélioration de la croissance et en une réduction de la quantité moyenne de tissus gonadiques. La variabilité inter-individuelle de l'allocation à la reproduction semble également être supérieure chez ces individus triploïdes. Dans cette étude, nous avons employé une approche expérimentale « en mélange de familles » et des méthodes d'analyses inspirées de la génétique quantitative pour étudier 1) les bases génétiques de la croissance et de la reproduction, 2) les interactions génotype x méthode d'induction de la triploïde et 3) d'éventuels changements dans l'ordre de rang des familles entre individus diploïdes et triploïdes. Deux croisements « full-factorial » ont donc été réalisés, le premier en utilisant pour géniteurs 16 mâles tétraploïdes et 6 femelles diploïdes, et le second avec 16 mâles diploïdes et les 6 mêmes femelles diploïdes. La moitié des embryons diploïdes obtenus ont été traités chimiquement pour induire leur triploïdisation. Les huîtres produites ont ensuite été élevées en écloserie avant d'être échantillonnées à l'âge de 5 mois. Un jeu de marqueurs microsatellites a alors été utilisé pour l'allocation familiale *a posteriori* et a d'abord permis de mettre en évidence une forte variance des contributions familiales à l'intérieur des lots expérimentaux. L'analyse des composants de la variation a également montré un déterminisme génétique modéré pour la variation à la croissance et à la reproduction. Ce déterminisme génétique modéré pourrait avoir été affecté par des phénomènes de compétition intra-groupe, aggravés par la forte sensibilité des traits phénotypiques de l'huître aux variations de l'environnement. D'autre part, des interactions triploïdie x génotype significatives ont été détectées pour la croissance et l'effort de reproduction. Pour la croissance, un effet additif des valeurs génétiques maternelles a été observé et découle probablement de la variation de la contribution des femelles au génome de leur descendance selon la méthode d'induction. Pour l'effort de reproduction, l'ordre de rang des familles a montré un changement entre individus diploïdes et triploïdes, mais pas entre individus triploïdes obtenus par les deux méthodes d'induction différentes. Ces interactions laissent penser que la triploïdie peut induire des réponses phénotypiques non-additives ou transgressives, éventuellement indépendantes de l'expression phénotypique des valeurs génétiques parentales observées chez les huîtres diploïdes.

Mots clés : Huître, triploïde, familles en mélange, déterminisme génétique.

Abstract

Triploidization is widely used for genetic improvement in crops, fishes and molluscs because it often leads to alterations of phenotype that are beneficial for their production. In the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, the artificial induction of triploidy results in an improvement of growth and a reduction of gonad development, although reproductive effort has been found to exhibit larger variation in triploid than in diploid individuals. We used a mixed-family quantitative genetics approach to investigate 1) genetic determinism for growth and gonad development variation, 2) genotype x triploidy induction method interactions and 3) changes in family ranking between diploid and triploid progenies. Two full factorial crosses between 16 tetraploid or 16 diploid sires and 6 dams were performed. In the latter case, triploidy was induced on part of the resulting diploid progeny. All oysters were reared in hatchery before being sampled at 5 month-old. Multiplexed microsatellite markers were used to assess parentage *a posteriori*, and revealed high variation in reproductive success of breeders. Genetic basis for growth and reproductive effort were found low to moderate, highlighting the potential role of competition between individuals and the high susceptibility of oysters to environmental cues. Significant genotype x triploidy interactions appeared for growth, and reproductive effort. For growth, we observed additive effect of dam values probably due to unbalanced contribution in the offspring. genome for triploid groups. For reproductive effort, we found discrepancies in half-sib families ranking between diploid and triploid individuals but not between triploid groups from different induction methods. These interactions revealed that the expression of genetic values was significantly altered by triploidy, and that triploid oysters could exhibit unexpected (non-additive or transgressive) phenotype response, eventually irrespective with diploid parental genetic values.

Keywords: Oyster, triploid, mixed families, genetic determinism.

I. Introduction

Triploidy induction is hardly deleterious in numerous organisms, and poorly tolerated in vertebrates (Mable, 2004). It has been successfully induced in some fishes (Maxime, 2008, Swarup, 1959) and amphibians (Fankhauser, 1945, Mable, 2004), but lead to lethal effects in most mammals notably by severely affecting foetal development (Nimierko, 1975). Such modifications induced by triploidy are very comprehensive from an evolutionary point of view: before the induction of triploidy, the actual (realized) phenotype is the result of complex interactions between diploid genotypes and their environment over millions of years of evolution. When occurring, the apparition of polyploidy disrupts some of these interactions, notably (but not only) in changing dosage-dependant gene expression that finally leads to phenotypic modifications (Birchler et al. 2007). However, triploidy does not always result in dramatic phenotypic changes related to an unbalanced genome. Even if fitness is often strongly reduced due to partial or even full sterility of triploids, triploidization also induces phenotypic changes that can be beneficial for some traits and therefore used in species of commercial interest.

Three specific issues related to the effect of triploidy on phenotypic expression can be identified. Firstly, as demonstrated in various plant and animal species, triploidization is known to directly affect the average performance (*i.e.* phenotypic mean) regardless of the breeder's genetic values (see Otto and Whitton, 2000 for a review). Triploidy may also interact with the transmission of additive genetic values between parents and their progeny, resulting in a significant interaction between number of chromosomes (gene dose) and genetic – inherited – values in ploidy series. This can be due to the unbalanced chromosome contribution of male and female parents, as demonstrated in brown trout (Blanc et al., 2005) in which 2/3 of the triploid genome comes from the dam while the other 1/3 comes from the sire. This 'scale effect' has been shown to occur also in rainbow trout (Blanc et al., 2001) and salmon (Jonhson et al., 2007) and results in an increase of the triploid phenotypic variance attributable to dam. However, linear additivity of parental values regarding to parental contribution rarely occurs because of dosage compensation effects probably occurring at transcriptomic level and finally resulting in a few-less-than-additive effect in triploid phenotype (Jonhson et al., 2007). Increase in non-additive genetic effects in polyploids is also expected and could result for genetic rearrangements (Chen, 2007, Song et al., 1995), partial

compensation for gene-dosage effects (Wang et al., 2006), or epistasis effects (Etterson et al., 2007). Ultimately, triploidy x genetic interactions should cause the disruption of genetic correlations between triploid and diploid relatives (in other words: change in family ranking for the considered trait). Such an effect has been suspected from evidences of genotype-dependant phenotypic divergence in response to change in ploidy (Kermani et al., 2003; Henry et al., 2005; Riddle et al., 2006) or lack of genetic correlation between triploid and diploid familial performances in Salmonids (Bonnet et al. 1999, Blanc et al., 2005).

Today, triploidy induction is the one of the most commonly method used for genetic improvement in aquaculture productions. It has been used in a wide range of marine fish (Maxime, 2008) and shellfish species (Beaumont & Fairbrother, 1991). In fish, triploidy leads to complete or partial sterility, contributing to the genetic containment of non-native species and improving growth performances trough induced sterility (Hulata, 2001). Similarly in oysters, triploidy-induced partial or complete sterility is also beneficial to aquaculture production because it improves the meat quality of oysters during the reproductive season (Allen and Downing, 1997), and participates to energetic re-allocation from reproduction to somatic growth (for review, see Nell 2002). Particularly in diploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*, reproductive effort is especially high compared with others molluscs (Van der Veer et al., 2006) and correlated with growth and survival (Ernande et al., 2004, Samain et al., 2007). The triploid partial sterility limits the weight loss that normally occurred in diploid oysters at spawning, resulting in a clear gain in growth (Allen and Downing, 1986) and could also participate to the improvement of survival to summer mortalities resistance (Boudry et al., 2008). Reproductive effort in triploid *Crassostrea gigas* appeared however very variable: previous publications reported nearly sterility (2% of diploid reproductive effort in triploid group) (Guo et Allen, 1994a) while others showed high production of gametes and spawning for these triploid individuals (67.6% of the mean diploid spawning effort) (Normand et al., 2008). Moreover, variability between individuals appeared as well enhanced (Guo et Allen, 1994a), because triploid oysters simultaneously show very different gonadic maturation stages in the same experimental group (Allen et Downing, 1990, Normand et al., 2008).

Determinisms for the variability in reproductive effort in triploid Pacific oysters remain to be investigated. Environmental variability is indeed expected to play a major role in this variance, notably because environmental factors are well known to primarily drive gametogenesis in diploid individuals (Fabioux et al., 2005, Pouvreau et al., 2006). Genetic

determinism could however also play a significant role as demonstrated in diploid oysters (Ernande et al., 2004).

One major constraint in genetic studies in oysters is related to their high phenotypic plasticity. Because oysters are too small at birth to be reliably marked, families or other genetic subunits are often raised in separate tanks to help track pedigrees until animals are large enough to be marked by families (Herbinger et al., 1999). However, there are considerable experimental evidences that small environmental differences (notably stocking density) between rearing structures deeply affect oyster survival, growth and reproductive effort through inter-individual competition (Sheridan, 1997). In order to minimize environmental variation between families, and thus to avoid confounding genetic determined effects from rearing structure effects, we employed mixed-family approach (that consists in rearing mixed families together in the same tank, before conducting phenotypic measurements and performing a posteriori parental allocation using molecular markers) (Herbinger et al., 1999; Boudry et al., 2002). Such an approach has notably been adopted for quantitative genetics studies in fishes (Pierce et al., 2008, Vandeputte et al., 2009), gasteropods (Lucas et al., 2006), and crustaceans (Jerry et al., 2006). For oysters, it has been successfully used to study variance in reproductive success (Boudry et al., 2002; Taris et al., 2006) but remained to be applied in quantitative genetic studies.

In this context, the present study aimed to study genetic bases of reproductive effort and growth in diploid with triploid related oysters. We wanted a quantitative genetic approach because it constitutes a powerful tool that allowed factorizing phenotypic variance between its genetic and environmental components. In addition, triploidy induction typically results in multi-traits phenotypic variation, which could result in confounding results when integrated phenotypic responses are analysed and quantitative genetics background appeared to be particularly well suited for multi-traits analyses. Finally, these methods have already allowed major advances in understanding genotype-phenotype relationships in triploid organisms (D'Souza et al., 2005, Blanc et al., 2005, Riddle et al., 2006), but little have been made to test for genetic x ploidy interaction in oysters. To our knowledge, only two studies reported results for genetic determinisms in triploid oysters: for survival in Pacific oysters (Boudry et al., 2008) and growth in Sydney rock oysters (Hand et al., 2004). In these two cases, the response to selection was correlated between triploid and diploid related lines. We focused here on the allocation to reproduction because this phenotypic trait is primarily affected by

triploidy. The consequences of such a direct effect on the genetic determinism for reproductive effort in triploid individuals needed to be tested.

Two experimental groups of 96 full-sibs families (6 dams x 16 sires) of diploid and triploid individuals were therefore produced by crossing the same diploid parents. Half of the obtained embryos were treated with a chemical to inhibit the reduction of the female oocyte, producing a diploid and a triploid group of 96 full-sibs related families. A third experimental group of half-sibs related triploid oysters was also produced by crossing the same 6 female oysters with 16 tetraploid males, producing a second triploid group. Parentage was determined using microsatellite markers and reproductive effort and fresh weight were measured at 5-month old. Bibliographic references for genetic determinism for reproduction in diploid Pacific oyster being scarce (to our knowledge, only one heritability estimator published by Ernande et al., 2004), we thus studied genetic basis for the variation of these traits both in diploid and triploid oysters. The pertinence of the experimental design, the effect of triploidy on the genetic determinisms of reproductive effort and growth are finally discussed.

II. Material and methods

II.1. Studied species

The oyster *Crassostrea gigas* is a suspensivore bivalve introduced from Japan into France in the late 1960's for aquacultural purposes (Grizel et Héral, 1991). It is an opportunistic species, and the combination of high fecundity, large larval dispersal and high plasticity has ensured its successful setting in many parts of the world where it has often turned invasive (Ruesink et al., 2005). In temperate areas, the Pacific oyster follows an annual cycle regulated by environmental factors such as food availability and water temperature that drive its energetic investment to the different physiological compartments: somatic growth, reproduction and maintenance (Pouvreau et al., 2006). Under natural temperate conditions, the elevation of temperature and food availability in spring results in gonad development that culminates in summer with the emission of gametes. Autumn and winter are then characterized by a resorbing phase, leading to the disappearing of gonadic tissues (Enriquez-Diaz, 2004). Such a cycle can be mimicked in hatchery by controlling temperature and food availability leading to the availability of mature individuals all year long (Fabioux et al., 2005). Reproductive effort in *C. gigas* was demonstrated to be a parameter phenotypically and genetically correlated with growth and survival, due to the highly environmental-dependant allocation to physiological functions and the importance of gonad development in terms of energetic allocation (Ernande et al., 2004).

II.2. Production and management of biological material

We performed a full factorial (North Carolina Design II) (Lynch et Walsh, 1998) to produce the three experimental groups following the procedure presented in details in Normand et al. (submitted) (Chapitre I des Résultats). Briefly, 6 diploid dams were crossed with 16 diploid sires to produce a first batch that was then divided into 2 sub-groups of embryos. One was treated with cytochalasin B for triploidy induction, and we finally obtained two groups of (potentially) 96 full-sibs families diploid (2n) and triploid (3nCB) from the same breeders. The 6 same dams were then crossed again with 16 tetraploid males to produce another triploid (3nDT) group. It must be noticed also that gametic contributions were equalized between

different breeders in order to optimise genetic diversity. Rearing until sampling date was conducted with special attention in avoiding selecting individuals on size criteria (size-selective sieving), which is a common practice in commercial hatchery but has been proved to erode genetic diversity (Taris et al., 2006). Determination of effective triploid status of oysters from 3nCB and 3nDT was performed following the method described in Normand et al. (submitted) (Chapitre I des Résultats). Finally, 320 randomly chosen 5-month old oysters were sampled for each group.

II.3. Genotyping and pedigree analysis

A small piece of gill was sampled on 38 parental oysters and 900 progenies, and preserved in ethanol. DNA was extracted using KIT Promega, and concentrations adjusted after spectrophotometric dosage analysis. For the 2n and 3nCB groups, three multiplexed microsatellite loci were used as described by Taris et al. (2005). For the 3nDT group, we used six additional microsatellite loci in order to improve the power of parental assignment. Microsatellite primers were selected among available markers so that they show high polymorphism and easy scoring. The three multiplexed loci used were as follows:

Multiplex 1: Cg108, Cg49 (Magoulas et al., 1998), L10 (Huvet et al., 2000),

Multiplex 2: ucdCg148, ucdCg129, ucdCg177 (Li et al., 2003),

Multiplex 3: ucdCg166, ucdCg198, ucdCg200 (Li et al., 2003).

Multiplex were then run on a ABI Prism[®] 3100 automated sequencer (Applied Biosystems), and genotypes were read using Genemapper[®] software. As all computer programs used for parentage allocation are currently designed for parentage allocation in diploid individuals. Triploid genotypes were therefore treated using the following procedure:

- for 3nCB: dams were first manually allocated. One of the two maternal alleles was therefore removed for the triploid genotype to obtain a diploid genotype. The parentage computing was then performed normally as for diploid individuals, and enables us to test for the accuracy of our manual assignation of dams.
- for 3nDT: dams were first manually allocated. Due to low genetic polymorphism of tetraploid sires used in the present experiment, sire allocation was not possible.

For diploid individuals, no transformation was necessary for parentage allocation. Pedigree analysis was conducted for 2n individuals, and 'diploidized' 3nCB genotypes, using PAPA

(Package for the Analysis of Parental Allocation), which performs parental identification for sampled individuals based on breeding likelihood methods (Duchesne et al., 2002). We optimised the total level of transmission error ($\alpha = 0.1$) and the distribution of transmission error over alleles ($S = 6$) as recommended by Duchesne et al (2002).

Finally, number of alleles at locus allowed us to check for the effective triploid status of individuals from the both the 3nCB and 3nDT triploid groups, following Hawkins et al. (2000).

II.4. Phenotypic traits

We used soft weight (soft flesh weight: FW) of each individual as an estimator for growth and we measured gonadic occupation (GO) for reproductive effort following the method described in Enriquez-Diaz (2004). Gonadic occupation is proximate of gonado-somatic index used to estimate reproductive effort (*i.e.* quantity of gonadic versus somatic tissues) since dissection of gonad cannot be properly performed in oysters to estimate their reproductive effort (Royer et al., 2008).

II.5. Statistical analyses

All statistical analyses were realized with the SAS software for Windows v8.2. GO was expressed as a percentage and thus could be assimilated as a threshold trait. Values were therefore log-transformed to ensure homoscedasticity. Homogeneity of variances was verified preliminary to perform Anova (Levene test: proc UNIVARIATE, SAS).

II.5.a. Within-group causes of variation and genetic parameters estimates

We tested genetic determinism for within-group variation in reproductive effort and growth. Estimators for breeders components of variance were computed using mixed general linear models (proc MIXED, SAS) (Littell et al., 1996, Littell et al., 2002), with sire, dam and sire x dam effects noticed as random effects for 2n and 3nCB groups. For 3nDT group, no information was available for sires, and we only test dam as a random effect. Specifically for gonadic occupation, we also used FW as a covariate (fixed effect), because allocations to somatic and gonadic growth proceed from the same (energetic) supply and were then suspected to covary. For FW, we did not use GO as a cofactor for the analysis because we wanted FW to be an indicator for total energy acquisition rather than an estimator for somatic growth. This indicator of somatic investment was in all-cases unavailable as FW integrated as well gonadic and somatic weight.

The variance analysis models used for these analyses were therefore written as follow:

$$\begin{aligned} \text{2n and 3nCB groups:} \quad & \text{GO} = \mu + \text{FW} + \text{Sire} + \text{Dam} + \text{Sire} \times \text{Dam} + \varepsilon \\ & \text{FW} = \mu + \text{Sire} + \text{Dam} + \text{Sire} \times \text{Dam} + \varepsilon \\ \text{3nDT group:} \quad & \text{GO} = \mu + \text{FW} + \text{Dam} + \varepsilon \\ & \text{FW} = \mu + \text{Dam} + \varepsilon \end{aligned}$$

The variance components estimates from this analysis were then used to estimate broad sense heritability ($h^2_{b.s.}$) and narrow sense heritability ($h^2_{n.s.}$) in diploid individuals, following Lynch and Walsh (1998).

$$\sigma^2_s = \sigma(\text{PHS}) = (\sigma^2_A / 4) + (\sigma^2_{AA} / 16)$$

σ^2_s = estimate for sire component of variance, $\sigma(\text{PHS})$ = paternal half-sibs covariance, σ^2_{AA} = additive x additive interaction effect. For triploid individuals obtained by doubling of the maternal contribution, we used the genetic model for the partitioning of genetic variance detailed in Wu (1995).

$$\sigma^2_s = \sigma(\text{PHS}) = (\sigma^2_A / 128) - \sigma^2_D (243 / 512)$$

Heritability estimates were therefore estimated assuming (i) in diploid that epistatic term ($\sigma^2_{AA} / 16$) was negligible for paternal half-sibs covariance, (ii) in triploid that dominance genetic variance $\sigma^2_D (243 / 512)$ was negligible for paternal half-sibs covariance.

$$2n : h^2_{n.s.} = V_A / V_P = 4\sigma^2_{\text{sire}} / \sigma^2_{\text{total}}$$

$$3n : h^2_{n.s.} = V_A / V_P = 128\sigma^2_{sire} / \sigma^2_{total}$$

The standard deviation of the heritability estimates, were computed using the general formula to calculate a ratio of variances from Lynch and Walsh (1998) (delta-method).

II.5.b. Analysis of among group breeders effects and genetic x ploidy interactions

We used mixed models (proc MIXED, SAS, Littell et al., 1996) in order to dissect total phenotypic variation among groups in specific breeders effects and their interaction with triploidy and induction methods (group effect). Group was considered as a fixed effect (3 levels) whereas sire (16 levels), dam (6 levels), and the interactions were noticed as random effects. Interactions between genetic effects (sire, dam and sire x dam) and group were also included, for the following reasons: first, parsimonious approach cannot exclude group-specific response for this traits (we expected such a response precisely for the two considered characters that are known to be strongly impacted by triploidy induction), and second we were especially interested by estimating the total fraction of phenotypic variance explained by the ploidy x breeder effect. Non-significant effects were then removed one-by-one, starting with the effects of highest-order interaction. For GO, we added the interaction FW x group as a covariable for previously mentioned reasons. For FW, we used group as a covariable because of the well-known effects of triploidy on growth rates in oysters. The 2 simplest models are shown below:

$$GO = \mu + FW \times Group + Sire + Dam + Group \times Sire + Group \times Dam + \varepsilon$$

$$FW = \mu + Group + Sire + Dam + Group \times Sire + Group \times Dam + \varepsilon$$

II.5.c. Among group regressions of mean familial values

Finally, we investigated in details group x breeder values interactions, searching for: (i) linear covariation between relatives mean genetic (half-sibs and full-sibs) values or (ii) potential change in genetic sub-units (half-sibs and full-sibs) rank order among experimental groups. We used linear regression (proc REG, SAS) between pairs of groups to compute slopes and associated standard errors of the regression lines and we plotted residuals versus predicted values to ensure that variances were homogenous. It must be noticed that in 2n group, 1/2 of

the offspring genome come from each parent whereas in 3nCB 1/3 of the genome come from the sire and 2/3 from the dam and in 3nDT groups, 1/3 of the genome come from the dam and the other 2/3 from the sire. As pointed out by Blanc et al. (2001), the slope of the regression axis between related individuals in which parental contributions differed gave information of the additivity of allelic expression (*i.e.* triploid 'scale effect'). As no trend appeared in the residuals (that could have suggest nonconstant variances), we finally generated F-statistics and Pearson correlation coefficients in order to test for the accuracy of our model in explaining variation in data (Sokhal and Rohlf, 1995).

III. Results

III.1. Parental assignment

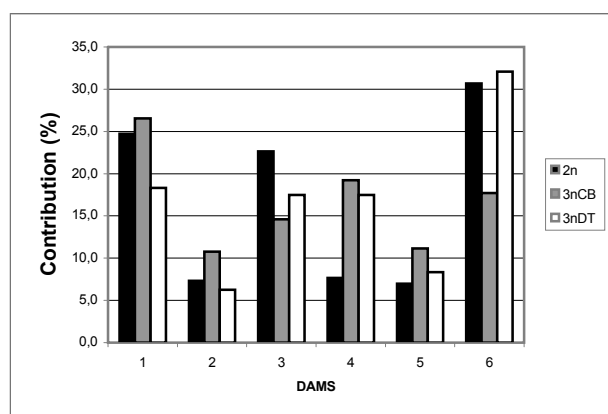
Parentage analysis was successfully performed for a high proportion of individuals in groups 2n and 3nCB. Out of the 320 oysters sampled both in the 2n and the 3nCB groups, respectively 312 and 306 samples were genotyped (the others were lost due to mislabelling or problems of sample conservation) and 287 and 260 individuals (respectively 92 and 85%) were unambiguously allocated to a sire and a dam (the others were not due to inter-samples contamination or ambiguous genotype). For 3nDT, 300 oysters were sampled, 280 were genotyped and 241 were allocated to a dam (86%). We failed to allocate tetraploid sires for this group even after increasing from 3 to 9 the number of microsatellites markers. This was due to redundant alleles combinations resulting from the low polymorphism found in the tetraploid broodstock (Table 13).

Parental contributions exhibited inter- and intra-group variation (Figure 27). A slight and non significant trend appeared notably for dams, suggesting some inter-group covariation in the representation of breeders (*i.e.* the most represented dams seem to be the same for the three groups).

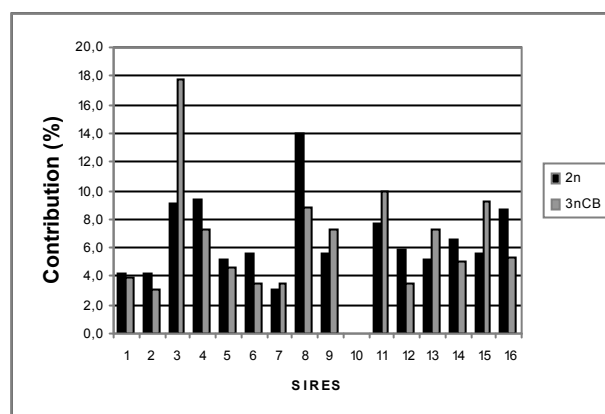
Intra-group parental contributions were highly unbalanced among breeders (Figure 27): for example, one dam produced 32.1% of the 3nDT group until one another only contributed to 6.3% of the experimental population. For sires, progeny of one individual was totally lacking from the 2n and 3nCB groups. Despite these discrepancies found in breeders representation within the three studied groups, a slight and non significant trend appeared notably for dams, suggesting some inter-group covariation in the representation of breeders (*i.e.* the most represented dams seem to be the same for the three groups).

Table 13 : Mean number of alleles for the different groups of breeders

Microsatellite	Breeders number	Dams 2n (N = 6)	Sires 2n (N = 16)	Sires 4n (N = 16)
CG 108	29	9	23	10
CG 49	23	12	19	8
L 10	23	9	21	8
CG 148	16	10		8
CG 177	16	11		9
CG 129	18	13		10
CG 166	11	7		7
CG 198	12	11		10
CG 200	10	7		7



a



b

Figure 27: Among group contribution of a) Dams, b) Sires at the sampling date (% of individuals assigned to a couple of parents).

III.2. Within group analysis

Ancova analysis showed a significant positive covariation between gonadic occupation and fresh weight in diploid oysters (F-value = 5.41; P = 0.02) (Table 14), but not in 3nCB nor 3nDT groups (3nCB: F-value = 0.98; P = 0.32; 3nDT: F-value = 1.05; P = 0.31) (Table 14).

In the diploid group, the sire effect accounted for 6.9% of the total phenotypic variance while dam or dam x sire effects were much lower (sire effect: Z = 1.24, P = 0.11, dam effect: Z = 0.37, P = 0.35, dam x sire interaction effect: not estimated because the associated variance component is not significantly different from 0) (Table 14). Narrow sense heritability estimates appeared to be rather high although clearly non-significantly different from zero, with a value of $h^2_{n.s.} = 0.28 \pm 3.36$.

For the 3nCB group, genetic component for reproductive effort variation appeared to be higher than in diploid group with sire, dam and sire x dam effects nearly significant at 5 %

(sire effect: $Z = 1.64$, $P = 0.05$, dam effect: $Z = 1.38$, $P = 0.08$, sire x dam interaction effect: $Z = 1.56$, $P = 0.06$) (Table 14). This increased genetic basis compared with the diploid group, resulted from a higher proportion of total variance explained by genetic effects (11.3%, 20.9% and 8.7% respectively for sire, dam and sire x dam effect). Computed narrow sense heritability mean estimate and standard error exhibited aberrant values (much higher than one) and also non-significant (data not shown). For 3nDT, group, computation failed to estimate dam effect.

For growth, no significant genetic effect was observed in the 2n group (sire effect: $Z = 0.6$, $P = 0.27$, dam effect: $Z = 1.18$, $P = 0.12$, dam x sire interaction effect: not estimated because the associated variance component is not significantly different from 0) (Table 15) and heritability estimate was low ($h^2 = 0.06$) and non-significant.

In 3nCB group, the variance component associated with sire effect was also non-significant for growth (sire effect: $Z = 0.42$, $P = 0.33$) although dam effect was getting closer to the 5% significance threshold (dam effect: $Z = 1.46$, $P = 0.07$) (Table 15). Such a reinforcement of dam effect compare with diploid group was likely to result from the enhancement of the variance dam component that accounted for 22.8% of total phenotypic variance (versus 10.7% in diploid group) as already noticed for gonadic occupation. Heritability estimate and associated error were as well aberrant (> 1), as noticed above for gonadic occupation.

Table 14: Intra-group analysis of variance results for sire and dam effects on gonadal occupation, *Pv*: proportion of total phenotypic variance explained by each factor, h^2 *n.s.* \pm *SD*: narrow sense heritability estimates with its standard deviation. Not estimated parameters are indicated by the ‘n.e.’ abbreviation.

Group:	Covariance parameter	Estimate	Standard-error	Z-value	Pr-Z	<i>Pv</i>	h^2 <i>n.s.</i> \pm <i>SD</i>
2n	Sire	0.03643	0.02938	1.24	0.1075	6.9%	0.276 \pm
	Dam	0.00407	0.01098	0.37	0.3553	1%	3.36
	Dam x Sire	0	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	
	Residual	0.4877	0.04689			92.3%	
	Fixed Effect	Num DF	Den DF	F-Value	Pr-F		
	FW	1	154	5.41	0.0214		
3nCB	Sire	0.06997	0.04264	1.64	0.0504	11.3 %	
	Dam	0.1287	0.09329	1.38	0.0839	20.9 %	
	Dam x Sire	0.05339	0.03418	1.56	0.0592	8.7 %	
	Residual	0.3644	0.04169			59.1 %	
	Fixed Effect	Num DF	Den DF	F-Value	Pr-F		
	FW	1	123	0.98	0.325		
3nDT	Dam	0	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	
	Residual	0.448	0.04365				
	Fixed Effect	Num DF	Den DF	F-Value	Pr-F		
	FW	1	199	1.05	0.3071		

Table 15: Intra-group analysis of variance results for sire and dam effects on fresh weight, *Pv*: proportion of total phenotypic variance explained by each factor, h^2 *n.s.* \pm *SD*: narrow sense heritability estimates with its standard deviation. Not estimated parameters are indicated by the ‘n.e.’ abbreviation.

Group:	Covariance parameter	Estimate	Standard-error	Z-value	Pr-Z	<i>Pv</i>	h^2 <i>n.s.</i> \pm <i>SD</i>
2n	Sire	0.00037	0.00062	0.60	0.2735	1.4 %	0.0566
	Dam	0.00280	0.00238	1.18	0.1195	10.7 %	\pm 1.08
	Dam x Sire	0	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	
	Residual	0.02303	0.00199			87.9 %	
3nCB	Sire	0.00088	0.00210	0.42	0.3378	1 %	
	Dam	0.01953	0.01340	1.46	0.0724	22.8 %	
	Dam x Sire	0	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	
	Residual	0.06521	0.00613			76.2 %	
3nDT	Dam	0.00181	0.00200	0.91	0.1824	3.11 %	
	Residual	0.05636	0.00521			96.9 %	

III.3. Analysis for among group breeders effects, triploidy and their interactions

For gonadic occupation, a significant FW x Group effect appeared ($\chi^2_{2,410} = 3.82$, $P = 0.03$) (Table 16) among groups. Estimates of sire and dam effects were close to 0 and non significant, but breeder x group interactions were (sire x group: $Z = 2.44$, $P = 0.01$ and dam x group: $Z = 1.68$, $P = 0.05$) (Table 16). For fresh weight, group effect was also significant ($\chi^2_{2,17.1} = 16.54$, $P = 0.003$) although breeder effects and breeder x group effects were not (Table 17).

Table 16: Among-group analysis of variance results for group, sire and dam effects and their interactions for gonadal occupation. Not estimated parameters are indicated by the ‘n.e.’ abbreviation.

Variable: log(GO)

Fixed effects	NumDF	DenDF	Chi ²	Pr-Chi ²
FW x Group	2	410	3.82	0.0266
Covariance parameters	Estimate	Standard-error	Z-value	Pr-Z
Sire	0	n.e.	n.e.	n.e.
Dam	9.03 E–36	n.e.	n.e.	n.e.
Sire x Group	0.0750	0.0307	2.44	0.0073
Dam x Group	0.0982	0.0585	1.68	0.0467
Error	0.4474	0.0313		

Table 17: Among-group analysis of variance results for group, sire and dam effects and their interactions for fresh weight. Not estimated parameters are indicated by the ‘n.e.’ abbreviation.

Variable: FW

Fixed effects	NumDF	DenDF	Chi ²	Pr-Chi ²
Group	2	17.1	16.54	0.0031
Covariance parameter	Estimate	Standard-error	Z-value	Pr-Z
Sire	0.00074	0.00082	0.9	0.1852
Dam	0.00713	0.00672	1.06	0.1444
Sire x Group	0	n.e.	n.e.	n.e.
Dam x Group	0.00458	0.00364	1.26	0.1040
Error	0.0425	0.00267		

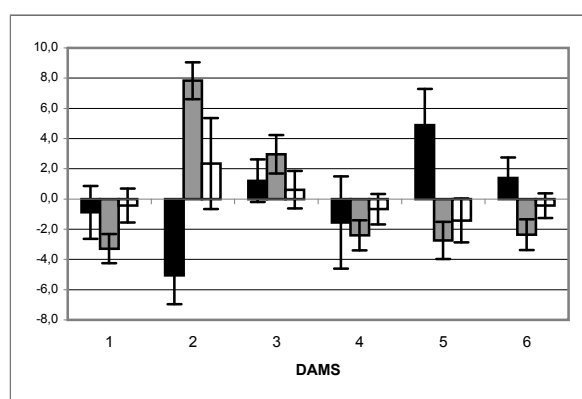
III.4. Among group regression of mean familial values

For gonadic occupation, the regression of mean half-sibs values for 2n and 3nCB was not significant (maternal half-sibs: $F = 0.75$, $P = 0.44$, paternal half-sibs: $F = 0.92$, $P = 0.35$, full-sibs: $F = 0.17$, $P = 0.68$) (Table 18), indicating a change in mean familial values rank order between these two groups (Figure 28). Covariation between maternal 2n and 3nDT values appeared more linear ($F = 6.23$, $P = 0.07$) (Table 18) although half-sib families rank order was also reversed between the two groups (Figure 28). Interestingly, maternal 3nCB and 3nDT half-sib values showed a significant positive linear regression ($F = 40.03$, $P < 0.01$), which traduced a perfect conservation of families rank order between the two groups (Figure 28).

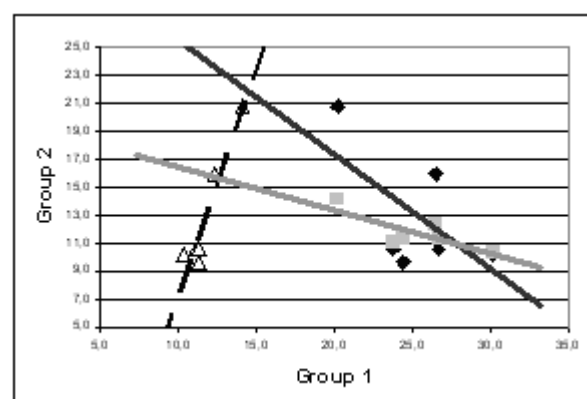
For fresh weight, we found a positive covariation for dams' effects and for all pairs of groups, although 2n – 3nCB linear regression was significant only at 10% (3nCB – 2n: $F = 5.84$, $P = 0.07$, 3nDT – 2n: $F = 16.58$, $P = 0.01$, 3nCB – 3nDT: $F = 21.55$, $P = 0.01$) (Table 18). This particular result led from the conservation of mid-parents values rank order between all pairs of groups (Figure 29). Regression between paternal half-sib and full-sibs values for 3nCB and 2n groups appeared however non significant (paternal half-sibs: $F = 0.46$, $P = 0.51$, full-sibs: $F = 2.88$, $P = 0.10$) (Table 18). The slope of the regression line between mean phenotypic values grouped by dams (Table 18) provided itself some additional information about the part of the total phenotypic variance explained by dams' effects. Dam's values explained a greater part of the variance component in 3nCB group than in 2n and 3nDT group as illustrated by the slopes of the regression lines superior to 1 (3nCB – 2n: slope = 1.71 ± 0.71 , 3nCB – 3nDT: slope = 2.40 ± 0.52) (Table 18) (Figure 29). Conversely, dams effect accounted for a lower part of data variation in 3nDT group than for 2n group (3nDT – 2n: slope = 0.76 ± 0.19) (Figure 28).

Table 18: Among groups regressions of mean genetic (half-sibs and full-sibs) values: F value and associated p-value for the part of variation in data explained by the model, correlation coefficient, slope and standard error of the regression line.

Variable:		y=	x=	F-value	Pr-F	R ²	Slope ± S.E.	
GO	Maternal Half-Sibs	3nCB	2n	0.75	0.437	0.15	-0.81 ± 0.95	
		3nDT	2n	6.23	0.067	0.60	-0.31 ± 0.12	
		3nCB	3nDT	40.03	0.003	0.91	3.22 ± 0.51	
	Paternal Half-Sibs	2n	3nCB	0.92	0.350	0.07	-0.38 ± 0.40	
	Full-Sibs	2n	3nCB	0.17	0.679	0.01	-0.09 ± 0.212	
FW	Maternal Half-Sibs	3nCB	2n	5.84	0.073	0.60	1.71 ± 0.71	
		3nDT	2n	16.58	0.015	0.80	0.76 ± 0.19	
		3nCB	3nDT	21.55	0.010	0.84	2.40 ± 0.52	
		Paternal Half-Sibs	2n	3nCB	0.46	0.509	0.04	0.12 ± 0.17
		Full-Sibs	2n	3nCB	2.88	0.097	0.07	0.14 ± 0.08



a

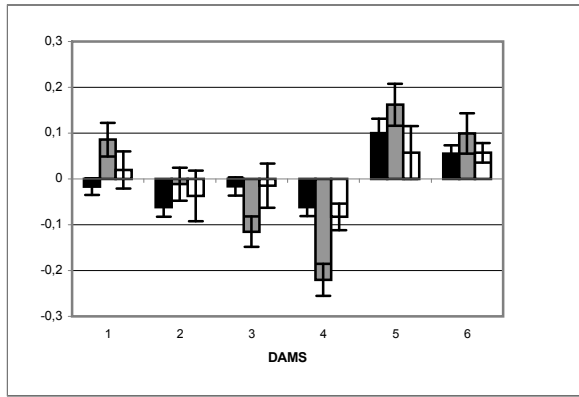


b

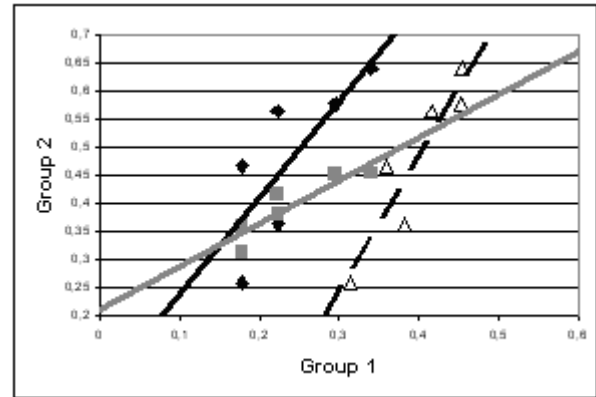
Figure 28: Among group covariation for mean gonadic occupations (%) in 6-dams progeny:
a) Difference from the group mean with standard errors: 2n: black bars, 3nCB: grey bars and 3nDT: white open bars.

b) Scatter diagram of group 1 vs. group 2:

- Group 1= 2n and group 2 = 3nCB: black losanges and regression line.
- Group 1= 2n and group 2 = 3nDT: grey squares and regression line.
- Group 1= 3nDT and group 2 = 3nCB: open triangles and dashed regression line.



a



b

Figure 29: Among group covariation for mean fresh weight (g) in 6-dams progeny:

a) Difference from the group mean with standard errors: 2n: black bars, 3nCB: grey bars and 3nDT: white open bars.

b) Scatter diagram of group 1 vs. group 2:

- Group 1 = 2n and group 2 = 3nCB: black losanges and regression line.
- Group 1 = 2n and group 2 = 3nDT: grey squares and regression line.
- Group 1 = 3nDT and group 2 = 3nCB: open triangles and dashed regression line.

IV. Discussion

We will discuss the experimental design, before focusing first on determinism for resource allocation to phenotypic traits in the diploid group. This was not really the aim of this study, but some comments about these results are necessary before using its to compare with growth and reproductive effort determinisms for triploid oysters. Interactions between genetic effects and triploidy induction method for these traits will then be discussed. Finally, general relevance of these results and opportunity for selection will be tackled.

IV.1. Advantages and constraints of the mixed families approach

Mixed family approach has been proposed first to counter bias related to tank effects for the estimation of genetic parameters. Fish families reared in separate tanks or, conversely, mixed in a common tank have been reported to present different performances (Ruzzante & Doyle, 1993; Herbinger et al., 1999; Vandeputte et al., 2009). Such a phenomenon results from the phenotypic integration of (environmental) rearing structures effects and genetic differences between genetics sub-units reared in separate tanks. It therefore leads to confound genetic determinism with environmental effects. The rationale in using mixed families approach consists in homogenised tank effects between the different genetic sub-units in order to compare genetic determinisms in the same environment (Herbinger et al., 1999). Moreover, mixed family approach also allowed working with high numbers of families without increasing the number of experimental tanks (Herbinger et al., 1999). For these two reasons, mixed families experimental designs have already been employed in a wide range of marine species (Estoup et al., 1998, Lucas et al., 2006, Pierce et al., 2008). This methode have also been employed for oyster larvae to estimate genetic polymorphism in cultured stocks (Boudry et al, 2002; Taris et al., 2006).

IV.1.a. Parentage assignment

A central point for the reliability of mixed family approach is related to the efficiency of parental allocation procedure which was optimised by Taris et al. (2005) for 2n individuals. In this study, we confirmed the efficiency of the method for the parentage assignment of 2n individuals (since 92 % of 2n individuals were efficiently allocated to a couple of parents), but also for 3nCB individuals (since 85 % of 3nCB individuals were efficiently allocated to a couple of parents).

We however faced the impossibility to allocate tetraploid sires although we employed a high number (9 loci) of microsatellite markers. This problem was expected because tetraploid sires were obtained by several generations of intra-line breeding and from a low-polymorphic genetic basis at beginning due to a reduced number of involved triploid breeders (see Eudeline et al. 2000 for a description of the method by which tetraploid were obtained). 3nDT individuals therefore exhibited a high number of common microsatellite alleles that do not allow discriminating between different sires. Moreover, we faced several problems related specifically to polyploidy, notably for the discrimination between homozygote genotypes at two or three alleles and null alleles. The problem of pseudo-heterozygotes (for example, individuals showing a AAB triploid genotype, by opposition with full-heterozygotes showing a ABC genotype) is known to complicate parentage assignment in polyploids (Bruvo et al., 2004). In any case, we primarily focused for this study on the genetic covariation between groups from different ploidy and induction method. Tetraploid males, obviously, were only involved for the production of 3nDT group, which implied also that covariation between sires mean cannot be tested anyway with this particular group, however it would have been interesting to test sire effects in 3nDT group.

IV.1.b. Genetic parameters estimates

To our knowledge, this study is the first report of mixed families approach applied in estimating genetic parameters in marine adult bivalves, and raised some interesting evidences. It is obvious that the parental (genetic) effects found in this study were low and weakly significant, notably for sire, and family effects. This founding is unlikely to have resulted from sampling related errors because measurement methods were carefully optimised (Royer et al., 2008). It is possible that the large variance found in familial contributions (thus

resulting in under-represented families in the samples) finally led to a low statistical power for the analysis of genetic components of variance, as pointed by theoretical approaches (Lynch et Walsh, 1998). Unfortunately, the phenotypic measurements conducted in this study were highly time-consuming and thus did not allowed us to increase the sampling size to counter this bias. High variances of reproductive success between oyster families have been already reported, and result from gametic competition, or differential viability between families in competition in the same environment (Boudry et al., 2002).

It must be noticed also that very little culling has been practised during the larval rearing. Size-selective sieving is a common zootechnical practice, but has been shown to erode genetic diversity and thus could result in biased genetic parameters estimates (Taris et al., 2006). This fact have probably also contributed to enhance size variation in the experimental groups of oysters.

The low genetic determinism (and the high values of error term) we found here can be interpreted as well as a result of the very high sensibility of *Crassostrea gigas* phenotypic traits to environmental conditions. Growth and allocation to reproduction in Pacific oyster are well known to be primarily determined by food supply (Pouvreau et al., 2006). The low genetic determinism we found here therefore could be due to environmental heterogeneity at the tank level. Evidences for intra-group competition affecting genetic determinism of phenotypic traits have been previously reported in fishes (Rodriguez-Munoz et al., 2003, Ruzzante and Doyle, 1991, Herbinger et al., 1999; Vandeputte et al., 2009) and are very likely to result to the underestimation of genetic basis for a trait particularly in *Crassostrea gigas* (Sheridan, 1997). The phenotypic correlation found in diploid group between growth and gonadic occupation suggested that the expression of both these phenotypic traits depended mainly of the amount of energy available through nutrition. Aptitude for competition and location in the rearing structure could affect primarily the individual performances, diluting the genetic determinism. It is therefore possible that the higher genetic determinisms we found for 3nCB was partly enhanced by the very high mortalities at larval stage that commonly follow chemical triploidy induction (*i.e.* more than 95% in our case, see also Guo et al., 1996 for similar results). It must be noticed that these oysters were grown with high phytoplankton supply (see Normand et al., submitted, for details on the rearing procedure) (Chapitre I des Résultats) at density usually not considered to limit individual access to food. *Crassostrea gigas* is nevertheless a filter feeder in which food acquisition is known to be size-related due to allometric relations between gills area and body size (Pouvreau et al., 2006). Small differences in initial size or location in rearing structures are therefore highly suspected

to result in long term consequences in individual performances and aptitude to competition (Collet et al., 1999). This could be notably the case for individuals reared in hatchery and nursery facilities – such as the ones we studied here - where densities are usually high and inter-individual competition expected to be intense.

On one hand, the high sensibility of Pacific oyster to environmental determinisms promotes the interest in using mixed families approach to estimate genetic parameters. On the other hand, it must be noticed also that such an experimental approach does not guarantee environmental homogeneity for highly competitive organisms such as *Crassostrea gigas*. This tends to underestimate the genetic basis or could result to biased genetic estimators for energy acquisition related traits if the individual aptitude for competition is genetically determined as seen in fish species (Ruzzante and Doyle, 1991). Rearing at low densities should result in an overestimation of the genetic determinisms by reducing inter-individual competition but could also generate biased estimators in the case of a genetic x environment interaction.

Finally, it must be noticed that we found aberrant (superior to 1) heritability estimates for 3nCB group. This is due to the genetic model for the decomposition of variance components in triploid individuals that grants a higher weight to the additive component of variance compare to diploid individuals (respectively $[128 \times \sigma^2_A]$ versus $[4 \times \sigma^2_A]$) (Wu, 1995) and thus required extremely precise genetic variance components, a condition that we not have reached here.

IV.2. Determinism for reproductive effort and growth in diploid group

Variation of allocation to reproduction in the diploid oysters group was found to have a rather low genetic basis – while sire effects were nearly significant - as demonstrated by the high within half-sib families variance and the non-significant heritability estimate. Only one study already reported estimates for genetic determinism of reproductive effort in *Crassostrea gigas*, which were found highly variable. Depending from the environment where oysters were reared, the authors found heritabilities estimates to vary from slightly negative values to estimates superior to 1 (Ernande 2001; Ernande et al., 2004).

Analysis of variance for fresh weight showed no significant breeders effects, although the genetic covariations observed between 2n and both 3nCB and 3nDT groups roughly suggests

some maternal effect on growth. This trait usually exhibits a low genetic determinism in Pacific oyster: previously published heritability estimates for young oysters growth varied from 0.07 to 0.15 depending on the testing site (Degrémont et al., 2007), or were estimated to be 0 in 6 month old oysters (Ernande et al., 2004). Moreover, the magnitude of genetic determinism could be dependant of the environment has shown by genotype x environment interactions observed for growth (Evans and Langdon, 2006; Dégremont et al., 2007), or growth and reproductive effort (Ernande et al., 2004). Finally, the relative ranking of families itself has been shown to shift with environmental changes, resulting from genetically determined plasticity (Ernande et al., 2004). The phenotypic correlation between growth and reproductive effort found for 2n group suggests also that the exhibited reproductive effort and growth in diploid oysters depended mainly of the amount of energy available through nutrition as noticed above. It is probable that the individuals that assimilated enough energy through nutrition to have the higher growth rate were also the ones in which reproductive effort (that proceeds from the same energy flow) was the higher. Such a primarily environmental determinism is probably responsible for the high variation of age-determined heritability estimators found in Pacific oyster (Sheridan, 1997).

IV.3. Determinism for growth in triploid oysters

Genetic determinism appeared to be low for growth in triploid groups. However, near significant sire effect were observed for 3nCB group, suggesting a genetic basis for its inter-individual variation. The observed correlation between half-sibs families means among groups may also result from conserved breeder effect. The variation of the slopes of regression lines together with the enhancement of the dam variance component detected in 3nCB group suggests that dams' effects explained the genetic covariance proportionally to the relative genetic contribution of the dams to the offspring genotype. In other words, dams that contributed to 2/3 of the 3nCB offspring genome were found to account for a greater part of phenotypical variance than in 2n group and 3nDT group (where they contributed respectively for 1/2 and 1/3 of the offspring phenotype). Conversely, females only contributed for 1/3 of the 3nDT genome that results in a diminished dam effect compared to both two other groups. Such an interaction between triploidy and genetic has been also been found in triploid salmonids (Blanc et al., 2005; Blanc et al., 2001) and most probably indicates the near-additivity of dam genetic values. This conserved dam effect among groups however leads to

confound maternal (*i.e.* non-genetic) effects with genetic effects since genetic correlation was not significant between paternal half-sibs families. Anyway, the non-significance of sire effects and paternal half-sibs regression models probably resulted from the reduced contribution of sires to the offspring genome, combined with high phenotypical variance and unbalanced contributions of numerous sires.

IV.4. Determinism for reproductive effort in triploid oysters

For reproductive effort, the genetic determinism appeared higher for 3nCB individuals than for diploid ones, resulting in more important dam and sire effects, with dam effect accounting for a greater part of phenotypic variance. For this trait, the interaction between triploidy and parental values did not simply leads from a difference in scale response due to parental unbalanced contribution as seen for fresh weight. The non-significant regression for gonadic occupation between diploid and the two triploid groups resulted from a change in the ranking of half-sib families. The ranking was however strictly conserved between the two triploid groups. Lack of genetic correlations between diploid and triploid familial performances have also been found for growth in salmonids (Blanc et al., 2005, Bonnet et al., 1999) and could result from inflated non-additive genetic components in neopolyploids. For example, inflated epistasis effects have been found in tetraploid *Campanulastrum* (Etterson et al., 2007) and dosage compensation occurred in triploid salmon (Jonhson et al., 2007). Maternal non-genetic effects are also suspected to increase for triploid individuals obtained by chemical or physical treatment of oocytes where egg quality should be implied in stress tolerance. We have found no bibliographic references for “maternal effect x ploidy interaction”, however experimental evidences of dam-specific effects on triploidy induction success have been observed in Pacific oysters (Eudeline et al., 2000).

On the other hand, it is also possible that our polygenic trait (reproductive effort) integrated in fact two different traits differentially expressed in diploid and triploid oysters. In other words, we suspect that inherited genetic factors primarily controlling the measured allocation to reproduction were the same for the 3nCB and 3nDT groups, but not between triploid and diploid oysters. Indeed, the fact that growth was phenotypically correlated with reproductive effort in diploid but not in triploid oysters suggests that observed gonadic occupation did not depend primarily from food availability in triploids. It must be also noticed that these triploid oysters exhibited earlier stages of gonadic maturation characterized by mitotic proliferation of

gonial cells whereas diploid individuals have undergone gametogenesis (Normand et al., submitted) (Chapitre I des Résultats). The rapid growth of gonad that occurs during gametogenesis but not during gonial proliferation makes that reproductive effort estimated for animals having reached these ultimate stages of gonad maturation (here, the diploid oysters) is more probably linked with energy acquisition than for individuals at earlier stages of gonad development (here, the triploid individuals).

It appears from this work that a part of the exhibited high variance for the allocation to reproduction in triploid oysters may be the result of breeder's effects, and that genetic determinism estimates could be increased in triploid individuals compared to diploid ones. Typically, one of the maternal half-sib 3nCB families exhibited a gonadic occupation reaching 20.8 % (Figure 28.a) (not much lower from the diploid mean of 25.3 %) whereas another only showed a 7.4% gonadic occupation. Environmental effects on the allocation to reproduction of triploid oysters remain still to be tested, since experimental evidences suggested temperature effects on the gonadic development (Shpigel et al., 1992; Normand et al., 2008) (Annexe I).

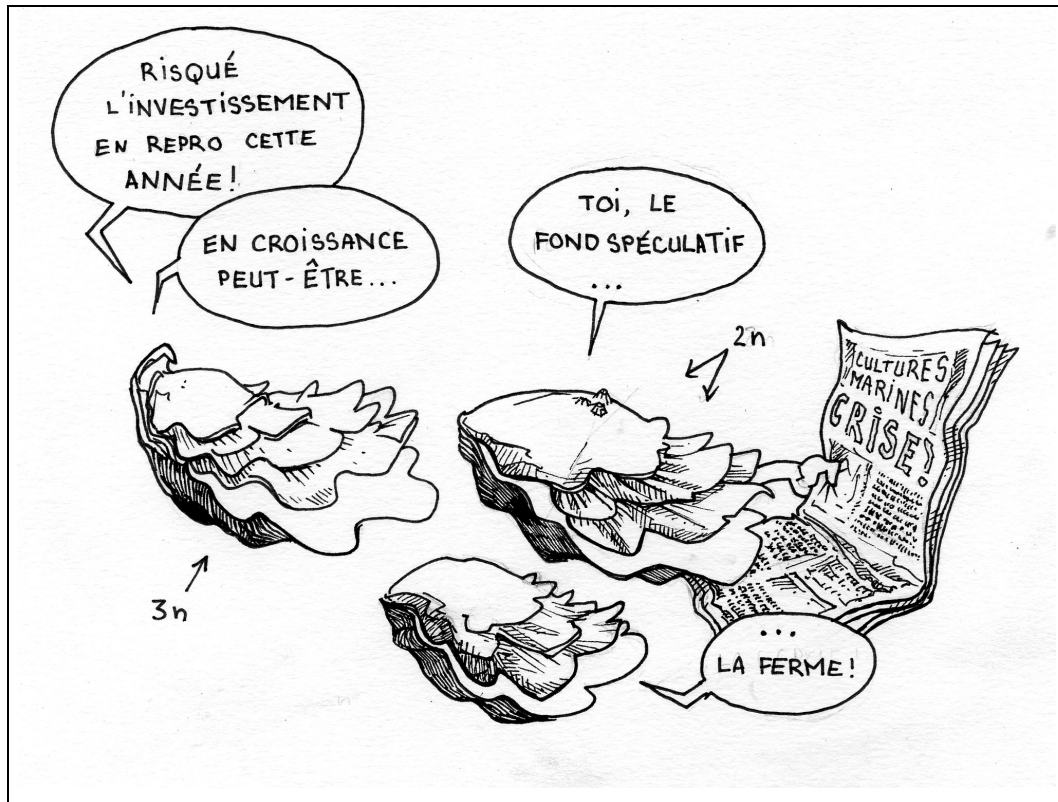
V. Conclusion

First, this study underlines the effects of zootechnical practices on genetic parameters estimates in *Crassostrea gigas*. Rearing (and more generally environmental) conditions appeared to be of first importance in determining phenotypic responses in Pacific oyster, and genetic determinism is highly expected to interact with environment, a fact that have already been noticed in diploid individuals. The mixed families approach adopted here certainly participated to reduce environmental heterogeneity among groups. It also probably resulted in the increase of within-group heterogeneity that should have participate in diluting genetic effects. In this context, it appears that some extra-work is still needed to compare the effects of experimental designs (mixed versus separated families) for the estimation of genetic parameters in *Crassostrea gigas*. More generally, the study of genetic x environment interactions constitute an exciting research field that could participate in improving 1) the comprehension of evolutive mechanisms acting in natural populations, or 2) the efficiency of selective breeding programs in agricultural species.

For the effects of triploidy on genetic determinism in Pacific oyster, it appears that triploidy have not only direct and linear effects on phenotypical values but also interacts with the

transmission of breeders genetic values, producing even ‘transgressive’ phenotypes (see Otto and Whitton, 2000 for a review of phenotypic divergence induced by polyploidy). Our results suggest that such an interaction between triploidy and genetic effects could be particularly pronounced for traits primarily affected by triploidy induction, such as the allocation to reproduction.

These results have also some implications for the opportunity of selective breeding of diploid Pacific oyster broodstock to produce genetically enhanced triploid progenies. Since triploids are generally sterile or produce poor-quality aneuploid offspring, selection must be made on diploid or tetraploid parents. Changes in family ranking between diploid and triploid group such as the one we observed for reproductive effort suggest that selective breeding in triploid individuals may necessitate in certain cases direct testing of triploid offspring to ensure the transmission of the diploid breeders traits.



Chapitre III

Réponses d'huîtres creuses diploïdes et triploïdes à une sélection directionnelle effectuée sur l'intensité du développement gonadique de leurs géniteurs diploïdes : allocation à la reproduction et à la croissance

I. Introduction

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'allocation gonadique mesurée chez un individu à un moment donné est soumise à une très forte variabilité. Son contrôle prioritaire par les conditions environnementales induit dans les écosystèmes tempérés une rythmicité du développement gonadique (Pouvreau et al., 2006) qui alterne des phases de repos sexuel (au cours desquelles le tissu gonadique est quasiment inexistant) en hiver, et des phases de fort développement gonadique en été. Chez cette espèce, l'effort de reproduction a été estimé à 55 % du budget énergétique annuel (Van der Veer et al., 2006) et la masse de tissus gonadiques peut représenter 62 % du poids de tissus frais de l'individu (Deslous-Paoli et Héral, 1988). Parallèlement à cette variabilité temporelle de l'allocation à la reproduction, la variabilité spatiale des conditions environnementales affecte également le développement gonadique, à travers la variabilité inter-sites de la disponibilité en phytoplancton et la température qui conditionnent les performances de croissance (Bourlès, 2009 ; Cardoso et al., 2007). La variabilité du développement gonadique et l'importance de l'allocation énergétique associée induit en conséquence la variabilité des paramètres métaboliques et immunitaires :

- Une part importante des réserves énergétiques est utilisée pour la gamétogenèse en période de maturation (Deslous-Paoli et Héral, 1988 ; Bacca et al., 2007),
- l'activité respiratoire, utilisée comme un indicateur du métabolisme énergétique (Lambert et al., 2008) est également affectée par le développement gonadique (Moal et al., 2008) et l'émission gamétique (Tran et al., 2008)
- les indicateurs de la réponse immunitaire : activité microbienne (Li et al., 2009a) et concentrations hémoctaires (Delaporte et al., 2007) montrent également une variabilité associée au développement gonadique.

Ces covariations traduisent le fort degré de dépendance de la condition physiologique (au sens large) de l'individu, et de son allocation à la reproduction. Elles sont probablement à l'origine de la corrélation négative observée entre la survie estivale et la maturité gonadique (Bourlès, 2004 ; Samain et al., 2007) et des « trade-offs » génétiques observés entre effort de reproduction, survie, et croissance (Ernande et al., 2004). Particulièrement, ceux-ci prévoient une co-réponse à la sélection de l'effort de reproduction d'une part, et de la survie et la croissance d'autre part. Une telle réponse corrélée de l'allocation à la reproduction et de la survie a d'ailleurs été effectivement observée :

- Chez *Crassostrea gigas*, lors de la sélection de lignées divergentes pour leur résistance au syndrome de mortalité estivale (Samain et al., 2007 ; Boudry et al., 2008),
- Chez *Crassostrea virginica*, lors de la sélection de lignées divergentes pour leur résistance au parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX) (Barber et al., 1991).

La réponse corrélée de la croissance à une variation de l'effort de reproduction est probablement également observée chez les huîtres triploïdes qui présentent une amélioration de leurs performances de croissance parallèlement à une réduction de leur développement gonadique. L'augmentation du taux de croissance des huîtres triploïdes est ainsi principalement interprétée comme la conséquence directe de la ré-allocation vers la croissance d'une partie de l'énergie allouée chez les huîtres diploïdes à la reproduction (Kesarcodey-Watson et al., 2001b, Garnier-Géré et al., 2002, Nell, 2002). Soulignons ici que les autres améliorations induites par la triploïdisation de l'huître creuse découlent également directement de la réduction du développement gonadique puisqu'elle permet leur commercialisation pendant la période de maturité sexuelle des huîtres diploïdes au cours de laquelle les huîtres triploïdes présentent une valeur commerciale accrue (Allen et Downing, 1997). La fertilité réduite des triploïdes permet également de limiter leur dissémination, et ceci constitue une condition obligatoire à l'utilisation d'individus issus de manipulations en laboratoire pour l'élevage en milieu naturel, indépendamment par ailleurs des avantages conférés par la triploïdie (Piferrer et al., 2007). Cette capacité de dissémination réduite a également conduit à envisager la triploïdie comme un moyen de confinement génétique des stocks (Allen et Guo, 1996).

Dans ce contexte, nous avons étudié la réponse d'individus diploïdes et triploïdes à une pression de sélection dirigée sur l'intensité du développement gonadique. Les deux raisons principales qui ont motivé ce travail tiennent :

- 1) au manque relatif d'estimateurs du déterminisme génétique de l'allocation à la reproduction, alors que la variation de celle-ci paraît impliquée dans l'expression de la variabilité de nombreux autres traits physiologiques.
- 2) à l'intérêt expérimental que présente l'étude de lignées génétiques divergentes pour la reproduction.

Pour le premier point, il n'existe à notre connaissance qu'une étude rapportant des estimations de l'héritabilité de l'effort de reproduction chez *Crassostrea gigas* (Ernande, 2001 ; Ernande et al., 2004). Le déterminisme de l'effort de reproduction apparaît d'ailleurs très dépendant de

l'environnement d'élevage expérimenté, et les estimateurs d'héritabilité calculés montrèrent alors une variation très significative, depuis des valeurs légèrement négatives jusqu'à des valeurs supérieures à 1. Au cours de cette étude, les interactions observées entre les valeurs génétiques des parents et l'environnement allèrent jusqu'à induire un changement de rang des familles entre milieux d'élevages différents (Ernande et al., 2004; Ernande 2001).

Chez les huîtres triploïdes, aucun estimateur d'héritabilité n'a jamais été publié. Des travaux précédents montrent pourtant que les approches expérimentales inspirées par la génétique quantitative et appliquées à divers modèles (nématode : D'Souza et al., 2005 ; maïs : Riddle et al., 2006 ; saumon : Jonhson et al., 2007) se sont avérées très informatives pour la compréhension des divergences phénotypiques induites par la polyploïdie.

Dans le Chapitre II des Résultats, nous avons présenté des estimateurs génétiques de l'héritabilité de l'allocation à la reproduction pour des individus diploïdes et triploïdes élevés « en mélange de familles ». Au cours de ce travail, une absence de corrélation génétique entre huîtres triploïdes et diploïdes a été constatée. La perturbation du déterminisme génétique constatée chez ces derniers individus semblait résulter alors à la fois d'une augmentation des effets génétiques non-additifs et d'une différence entre les conditions environnementales expérimentées entre individus de ploïdie différentes. L'analyse *a posteriori* du schéma expérimental employé lors de cette étude suggérait également une forte hétérogénéité des conditions environnementales rencontrées au sein d'un même groupe d'individus (en l'occurrence : accessibilité à la nourriture). Cette variance environnementale découlait probablement de l'intense compétition inter-individuelle qui s'exprime en conditions d'élevage chez *Crassostrea gigas* (Sheridan, 1997), et cette augmentation de la variabilité environnementale avait alors été fortement suspectée d'avoir contribué à réduire le composant génétique de la variance inter-individuelle. Pour la présente étude, le protocole expérimental a donc été considérablement modifié. Une pression de sélection a été induite en choisissant des géniteurs diploïdes montrant un développement gonadique contrasté et la réponse à la sélection a été étudiée chez leur descendance diploïde et triploïde.

Concernant le second point, l'obtention par sélection d'individus divergents génétiquement pour leur allocation à la reproduction constitue un outil expérimental puissant pour tester l'hypothèse d'un trade-off entre la reproduction, la survie, et la croissance chez l'huître. Elle permet notamment d'optimiser les approches expérimentales par l'étude d'individus montrant des phénotypes contrastés pour ce caractère. L'optimisation des stratégies d'histoire de vie sous la contrainte de la sélection naturelle (Stearns, 1992) tend en effet à réduire la variabilité

génétique pour les traits liés à la fitness en populations naturelles, tels que l'effort de reproduction chez l'huître (Ernande et al., 2004). La manipulation expérimentale de la variation entre les individus permet d'accroître artificiellement celle-ci, et augmente donc d'autant la probabilité de détecter les trade-offs (Schwarzkopf et al., 1999). Notons ici qu'une seule référence publiée démontre un trade-off génétique, au sens strict, entre reproduction et survie chez l'huître creuse (Ernande et al., 2004). Les corrélations précédemment citées entre la variabilité individuelle de l'allocation à la reproduction et les indicateurs du métabolisme et de la réponse immunitaire sont effectivement représentatives de trade-offs phénotypiques entre ces traits. Pourtant, ces corrélations ne sont pas forcément prédictives de la réponse évolutive des traits phénotypiques associés à ces indicateurs (Stearns, 1989) et à plus forte raison de la réponse de ces mêmes traits à l'induction de la triploïdie. La sélection de lignées divergentes réalisée au cours du programme Morest, et la co-réponse de la résistance à la mortalité estivale et de la dynamique de maturation observée alors suggère effectivement un trade-off génétique entre reproduction et survie (Boudry et al., 2008, Huvet et al., en préparation). Notons dans ce cas que 1) la pression de sélection n'était pas spécifiquement orientée vers la reproduction, et 2) que le caractère de « survie à la mortalité estivale sur estran » ne peut pas être considéré comme représentatif de la survie individuelle globale. Dans ces conditions, l'existence d'un trade-off génétique entre ces traits reste donc supposée.

Dans cette partie, nous présenterons les résultats d'une expérimentation visant à estimer la réponse phénotypique de lignées diploïdes et triploïdes obtenues par sélection divergente pour l'allocation gonadique. La variabilité des indicateurs quantitatifs de l'allocation à la reproduction, et des indicateurs de la qualité de la gamétogenèse sera analysée en priorité. La discussion portera particulièrement sur l'influence de la triploïdie sur les déterminismes génétiques, et sur les réponses corrélées des traits phénotypiques à une pression de sélection dirigée sur l'effort de reproduction.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Choix des géniteurs diploïdes et protocole de sélection

Les géniteurs utilisés lors du croisement étaient des huîtres diploïdes provenant des lots expérimentaux étudiés dans les chapitres précédents. Ces individus étaient alors âgés de 1 an, et avaient été élevés sur une concession ostréicole en mer depuis le mois de Janvier 2007. Ces individus constituaient 3 familles de $\frac{1}{2}$ frères non-sélectionnées, issues du croisement factoriel de 3 femelles différentes 16 mâles.

La maturation gonadique de huîtres s'est effectuée dans le milieu naturel et un sous-échantillonnage régulier a été réalisé au cours de celle-ci afin de fixer la date du croisement au moment optimal : à la fin de la gamétogenèse, avant l'émission des gamètes. Le choix des géniteurs et le croisement ont été effectués à la fin du mois de Juin 2007, lorsque la maturité gonadique atteinte était suffisante pour procéder au croisement et que la variabilité inter-individuelle était encore suffisamment grande pour trier les individus sur ce caractère.

Chez l'huître, l'allocation à la reproduction (le développement gonadique) dépend à la fois de la quantité d'énergie assimilée par la nutrition et de la proportion d'énergie allouée à la reproduction (l'effort de reproduction au sens strict). Une pré-sélection sur la taille des géniteurs a été effectuée afin de sélectionner des individus sur l'intensité de l'effort de reproduction plutôt que sur l'assimilation énergétique (supposée proportionnelle à la croissance) (Figure 30). La masse moyenne d'un individu de chaque demi-famille a été déterminée par pesée de 50 huîtres prises au hasard, et seules les huîtres dont la déviation en masse était inférieure à 15 % de la moyenne de la famille de $\frac{1}{2}$ frères ont été conservées pour cette étude.

Pour chaque famille de $\frac{1}{2}$ frères, 250 individus ont ensuite été échantillonnés au hasard et ouverts avant d'être triés visuellement en fonction de l'intensité de leur gamétogenèse. A l'issue de ce tri, 3 groupes de 50 individus montrant un développement gonadique contrasté (faible, moyen et fort) ont été constitués (Figure 30). Ces groupes de géniteurs choisis seront respectivement appelés groupe « b », groupe « m » et groupe « h » dans la suite de ce chapitre. Pour chacun de ces groupes, 25 individus par famille de $\frac{1}{2}$ frères ont été conservés pour servir de géniteurs, tandis que les masses viscérales des 25 huîtres restantes ont été

plongées dans un fixateur afin de caractériser plus tard l'intensité de l'effort de sélection par histologie semi-quantitative.

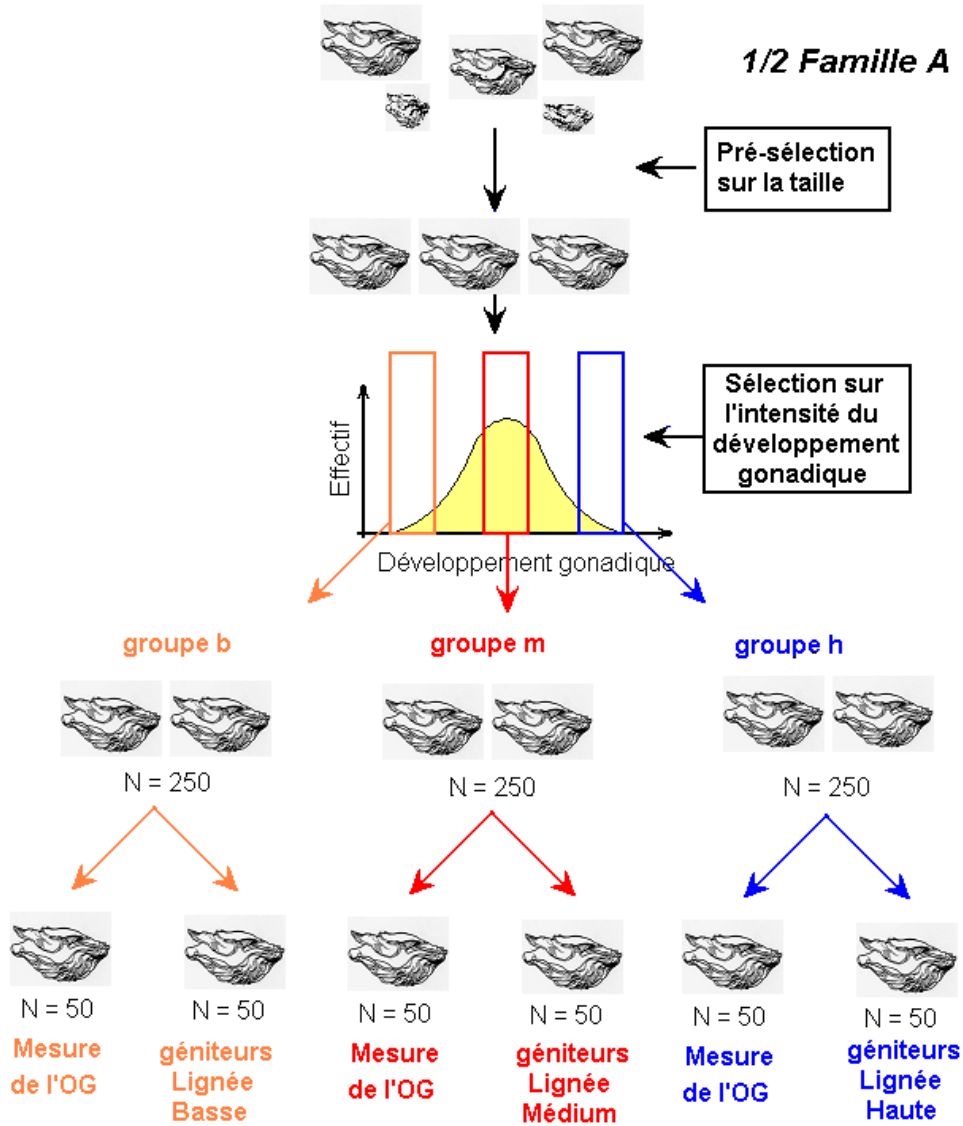


Figure 30 : Méthode d'induction de la pression de sélection divergente pour l'une des 3 familles de 1/2 frères de géniteurs.

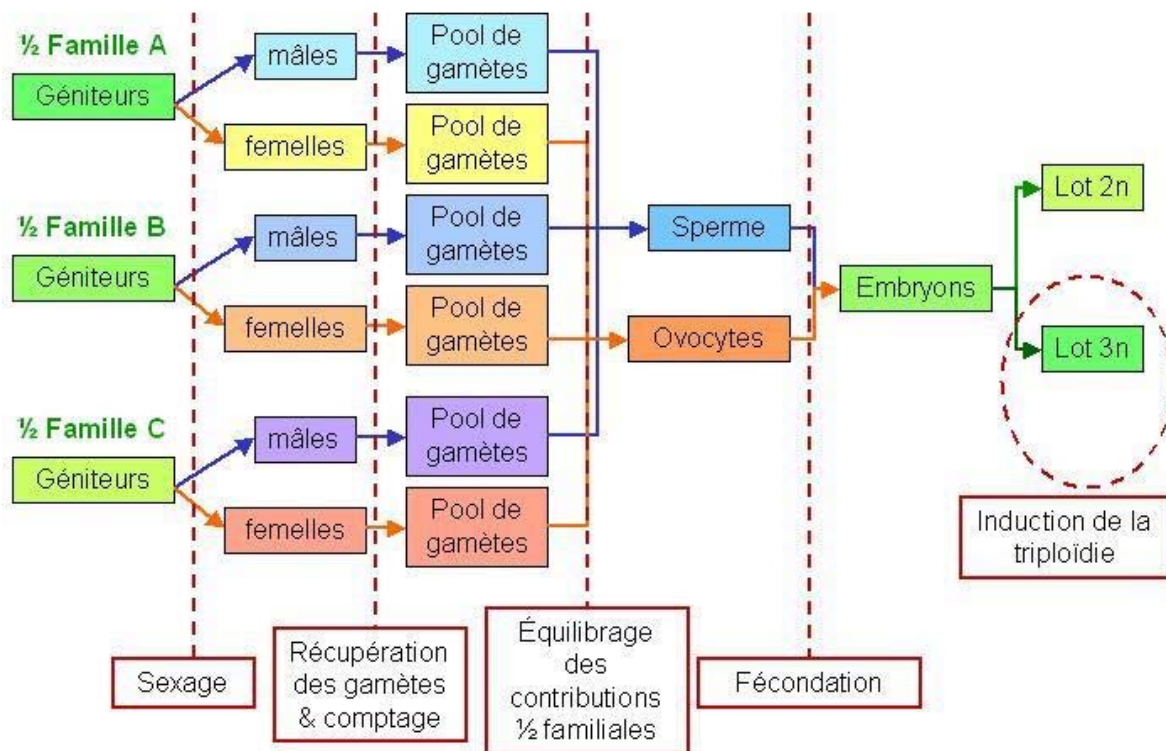


Figure 31 : Schéma du protocole de fécondation et de l'induction de la triploïdie telles qu'appliqué à chacun des groupes (b, m, h) de géniteurs constitués.

II.2. Productions et élevage des lignées expérimentales

Pour chaque famille de $\frac{1}{2}$ frères et pour chaque groupe d'intensité de développement gonadique, le genre sexuel des 25 individus gardés comme géniteurs a été déterminé par observation microscopique du contenu de leur gonade (Figure 31). Leurs gonades ont été dilacérées au scalpel afin de constituer 1 « pool » de gamètes mâles et femelles, par famille de $\frac{1}{2}$ frères et par groupe. La concentration gamétique de chacune de ces solutions de gamètes a été déterminée par observation microscopique et comptage sur cellule de Malassez (ovocytes) et cellule de Thoma (spermatozoïdes). Pour chaque groupe, les solutions de sperme puis d'ovocytes de chaque famille de $\frac{1}{2}$ frères ont ensuite été mélangées en veillant à équilibrer les contributions entre $\frac{1}{2}$ famille, ceci afin de minimiser la consanguinité dans la descendance et d'équilibrer les contributions gamétiques. Les croisements ont ensuite été effectués en fécondant les ovocytes d'un groupe avec la solution de sperme des mâles du même groupe, à un ratio de 100 spermatozoïdes pour 1 ovocyte (Figure 31).

20 minutes après la fécondation, la moitié des embryons de chacun des 3 groupes a été placée dans un bécher séparé et traitée par l'adjonction de cytochalasine B afin de procéder à l'induction de la triploïdie (Figure 31). Les 6 groupes d'embryons diploïdes et triploïdes ont ensuite été mis en élevage dans 6 bacs cylindrico-coniques séparés pour l'élevage larvaire.

Après l'élevage larvaire et la micronurserie à l'écloserie expérimentale de La Tremblade, les huîtres ont été gardées pendant 2 mois en nurserie à la station expérimentale de Bouin à faible densité (5000 individus par tube tamis), en assurant un apport en phytoplancton important. 2 poches ostréicoles de 500 individus (réplicats d'élevage) ont ensuite été placées sur tables ostréicoles en mer (Banc d'Agnas, Bassin de Marennes-Oléron) au mois de novembre 2007. L'échantillonnage a été réalisé au début du mois de Juillet 2008, soit quelques semaines avant l'apex de maturité gonadique, principalement en raison de contraintes zootechniques (risque de mortalité estivale).

II.3. Echantillonnage des individus des lignées expérimentales

Pour les lots diploïdes, 50 individus par lignée ont été prélevés. Pour les lots triploïdes issus d'inductions chimiques, le taux d'induction atteint rarement 100% (Gérard et al., 1999) et 100 huîtres ont été prélevées par lot afin de pouvoir éliminer de l'échantillon initial de potentiels individus diploïdes ou mosaïques (présentant des populations cellulaires de ploïdie différentes). Ces individus ont alors été analysés individuellement en cytométrie en flux selon la méthode décrite par Benfey et Solar (1986) (la méthode est décrite précisément dans la Partie II de la section Approches expérimentales) pour finalement ne conserver que 50 individus triploïdes.

Pour chaque individu échantillonné, les paramètres suivants ont été mesurés :

- la masse totale fermée (M_{tot}) est obtenue par pesée de l'individu fermé, après l'avoir tamponné à l'aide d'un papier absorbant pour éliminer l'excédent d'eau sur la coquille,
- la masse de coquille, et la masse de tissus mous ont été déterminées après ouverture et séparation du corps de l'animal et de ses valves. Les tissus mous ont été tamponnés et placés sur un papier absorbant 10 minutes pour éliminer l'excédent d'eau avant la pesée tandis que les valves ont séché à l'air libre.

Dans cette étude, nous utiliserons la masse totale fermée (M_{tot}) comme indicateur de la croissance totale, et un indice de condition (IC) comme indicateur du remplissage de l'huître :

$$IC = \text{masse de chair égouttée} \times 100 / \text{masse de coquille sèche}$$

Les masses viscérales ont été identifiées individuellement et fixées pour mesurer l'allocation à la reproduction par histologie semi-quantitative selon le protocole décrit dans Enriquez-Diaz (2004). Une section transversale passant par le milieu de la masse viscérale été coupée à $5\mu\text{m}$ d'épaisseur au microtome, montée sur lame microscopique, colorée en double coloration hématoxyline-éosine, et numérisée à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'une caméra numérique. L'occupation gonadique (OG) a été mesurée à l'aide d'un logiciel de traitement d'image.

$$OG = \text{surface occupée par des tissus gonadiques} \times 100 / \text{surface occupée par des tissus somatiques}$$

Parallèlement à la mesure de l'occupation gonadique, le stade de maturité gonadique a été qualifié par observation microscopique en utilisant une échelle adaptée de Mann (1979) et Lango-Reynoso (2000) (Partie II de la section Approches expérimentales). Chez les individus triploïdes, de nombreux hermaphrodites asynchrones montrèrent la présence simultanée de cellules des lignées germinales mâle et femelle. Chez ces hermaphrodites, une des lignées germinales était en fin de résorption et montraient de rares gamètes atrétiques, tandis que l'autre était dominante. Le genre sexuel et le stade de maturité gonadique de l'individu ont alors été déterminés comme étant ceux de la cohorte de cellules germinales la plus abondante.

II.4. Analyse statistique des résultats et calcul de l'héritabilité réalisée

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS 8.2. Pour les analyses de variance, la normalité du jeu de données a été systématiquement testée par l'application d'un test de Levene et l'hétérogénéité des variances évaluées en procédant à une régression des résidus obtenus par l'Anova sur les résidus prédits. Les variances hétérogènes montrées par l'occupation gonadique ne satisfaisant pas aux conditions requises pour l'analyse de variance, les données ont été log-transformées ($OG_t = \log(OG + 1)$). Remarquons également que dans le cas des modèles incluant des interactions et des effets hiérarchisés, la statistique F des effets « simples » a été calculée à l'aide de l'option TEST de la proc GLM, en mettant au

numérateur la variance intergroupe de l'interaction ou de l'effet de niveau supérieur. Les modèles ont été progressivement réduits par l'élimination des effets non-significatifs en commençant par les interactions et les effets hiérarchisés. Les modèles présentés dans les sections suivantes du « Matériel et méthode » sont les modèles incluant le nombre maximal d'effets, tandis que les estimateurs présentés dans la section « Résultats » ont été obtenus en appliquant les modèles « réduits ». Pour les Anovas réalisées sur les variables continues, les comparaisons par paire des effets ont été testées par la méthode des LS-means (Littell et al., 2002).

II.4.a. Caractérisation de l'allocation à la reproduction des géniteurs

La pression de sélection a été qualifiée par la différence entre l'allocation à la reproduction des géniteurs utilisés pour générer les lignées « Haute », « Basse » et « Medium ». Les effets d'un éventuel dimorphisme sexuel (genre sexuel, 2 niveaux : mâle ou femelle), de la famille de ½ frères du géniteur (3 niveaux : A, B, ou C) et du groupe de développement gonadique qualifié lors du croisement (3 niveaux : groupes b, m, h) sur l'occupation gonadique ont été testés en Anova (proc GLM, SAS) (Littell et al., 2002). Une première analyse a été menée sur l'ensemble du jeu de données selon le modèle « complet » :

$$OG_t = \text{Sexe} + \frac{1}{2} \text{ Famille} + \text{Groupe} + \text{Sexe} \times \frac{1}{2} \text{ Famille} + \text{Sexe} \times \text{Groupe} + \frac{1}{2} \text{ Famille} \times \text{Groupe}$$

En raison d'une interaction significative détectée entre les effets de la famille de ½ frères des géniteurs et du groupe de développement gonadique, une analyse des effets du groupe et du genre sexuel développé a été ensuite réalisée par famille de ½ frères, selon le modèle :

$$OG_t = \text{Sexe} + \text{Groupe} + \text{Sexe} \times \text{Groupe}$$

II.4.b. Caractérisation de la reproduction des descendants sélectionnés

L'occupation gonadique des descendants sélectionnés a été analysée en Anova (proc GLM, SAS) (Littell et al., 2002). Les effets de la Lignée (3 niveaux : Basse, Medium, Haute), de la ploïdie (2 niveaux : 2n ou 3n), leur interaction, et les effets du réplicat d'élevage (2 poches ostréicoles) imbriqués dans la lignée ont été testés. Le remplissage de la coquille (IC : variable continue) et la masse totale fermée (M_{tot} : variable continue) sont utilisées comme covariables afin de détecter d'éventuelles corrélations entre croissance somatique et développement gonadique. L'effet du stade de maturité gonadique (5 niveaux : 0, 1, 2, 3, 4) a été également utilisé pour tester les corrélations entre le niveau de maturité gonadique et l'allocation estimée à la reproduction. L'effet du genre sexuel est testé uniquement pour les individus ayant développé une gonade (2 niveaux: mâle ou femelle) : les individus de sexe « indéterminé » sont exclus de l'analyse pour cet effet.

$$OG_t = Ploïdie + Lignée + Stade + Sexe + M_{tot} + IC + Lignée(Réplicat) \\ Ploïdie \times Stade + Ploïdie \times Lignée$$

La fréquence d'occurrence des genres sexuels (3 niveaux : indéterminé, mâle, femelle) et celle des stades de maturation gonadique (5 niveaux : stades 0, 1, 2, 3, 4) ont été analysées. Ces analyses ont été réalisées sur la totalité du jeux de données en modélisant une distribution multinomiale (proc GENMOD, fonction cumlogit) (Littell et al., 2002) selon le modèle :

$$Fréquence (sexe ou stade) = Ploïdie + Lignée + Lignée(Réplicat)$$

Pour chaque stade de développement gonadique et chaque sexe identifié, l'influence des effets de la ploïdie et de la lignée a également été analysée en modélisant une distribution binomiale (proc GENMOD, fonction logit) (Littell et al., 2002) selon le modèle :

$$Fréquence (sexe ou stade) = Ploïdie + Lignée + Lignée(Réplicat)$$

II.4.c. Evaluation de la réponse à la sélection : calcul des paramètres génétiques

L'effort de sélection appliqué aux groupes de développement gonadique constitués est estimé par la différence entre l'occupation gonadique moyenne des géniteurs diploïdes du groupe

« divergent » (faible ou fort développement gonadique : groupes b et h) et celle du groupe « moyen » (groupe m).

$$ES = OG_{\text{Groupe faible / fort développement gonadique}} - OG_{\text{Groupe développement gonadique moyen}}$$

Pour chaque groupe de ploïdie, la réponse à la sélection des descendants est calculée par la différence entre l'occupation gonadique moyenne de la lignée « divergente » (Basse ou Haute) et celle de la lignée Medium.

$$RS = OG_{\text{Lignée Haute / Basse}} - OG_{\text{Lignée Medium}}$$

L'héritabilité réalisée h^2_R est calculée pour les lignées Haute et Basse par le rapport entre l'effort de sélection appliqué aux géniteurs (ES) et la réponse à la sélection des descendants (RS) par groupe de ploïdie.

$$h^2_R = RS / ES$$

Il est probable que la dynamique de la gonadogenèse influe sur l'expression des différences d'occupation gonadique entre lignées (voir Encart). Une hérabilité « corrigée » (h^2_{RC}) du différentiel de dynamique entre lots a également été calculée. Dans ce cas, la réponse à la sélection est exprimée en pourcentage de la différence entre l'OG moyenne de la lignée considérée et celui de la lignée Medium, et l'effort de sélection est exprimé en pourcentage de la différence entre l'OG moyenne du groupe de géniteurs considéré et celui du groupe m.

Encart : à propos de la comparaison des estimateurs de l'héritabilité...

La comparaison des estimateurs d'héritabilités pour un même trait mais entre groupes d'individus différents suppose que le trait soit mesuré dans le même environnement. Dans notre étude, le trait mesuré est l'OG qui augmente de façon saisonnière chez l'huître, avec la maturation gonadique (Figure 32). Dans ce cas, la réponse à la sélection (RS) mesurée est vraisemblablement croissante elle aussi au cours de la maturation gonadique puisqu'elle est estimée par la différence $OG_{\text{lignée sélectionnée}} - OG_{\text{lignée témoin}}$ il est très probable que cette différence s'exprime plus fortement à la fin de la gamétogenèse qu'au début. Les estimateurs de l'héritabilité réalisée pour l'allocation à la reproduction chez une même lignée seront dans ce cas très probablement dépendants de la maturité des tissus gonadiques puisque h^2_R est proportionnelle à la réponse à la sélection RS .

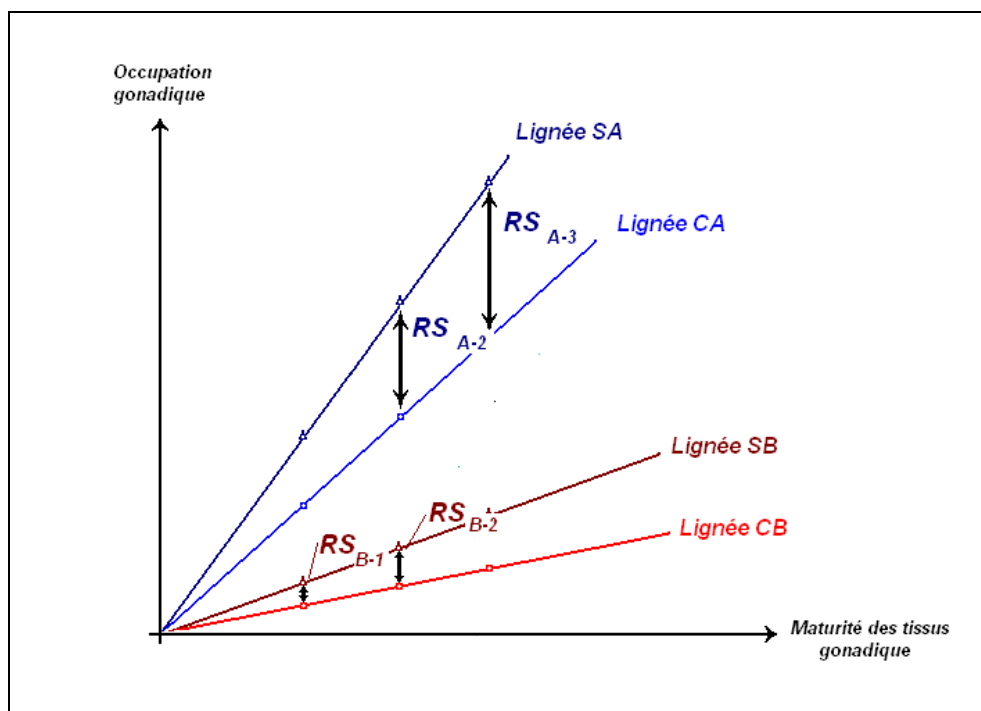


Figure 32 : Représentation théorique de la relation entre OG et maturité gonadique assumant arbitrairement une relation linéaire entre ces deux traits. L'évolution de l'OG est figurée pour 2 groupes (A et B) d'individus, présentant chacun une lignée sélectionnée S, et une lignée témoin C.

Cette observation (h^2_R dépendante de la maturité gonadique) est sans conséquence pour la comparaison des estimateurs d'héritabilité entre lignées d'individus d'une même ploïdie, puisque ces individus présentent simultanément des stades de maturité gonadique comparables. Les huîtres triploïdes sont quant à elles connues pour présenter des stades de maturité gonadique plus précoces que les individus diploïdes (Allen et Downing, 1986, Allen et Downing, 1990). Il est probable alors que les estimateurs h^2_R calculés pour ces huîtres $3n$ soient alors réduits (par rapport à ceux calculés pour les $2n$) non pas à cause d'une différence induite par la triploïdie dans l'expression des valeurs génétiques parentales, mais simplement parce que la réponse à la sélection s'exprime moins chez les individus en début de gamétogenèse.

Encart a : à propos de la comparaison des estimateurs de l'héritabilité...(fin)

Une correction des estimateurs d' h^2 est proposée pour la comparaison entre individus diploïdes et triploïdes. La réponse à la sélection (RS_C) des lignées sélectionnées sera ainsi exprimée en proportion (%) de l'OG des lignées témoins, puisque ce rapport est (en théorie) indépendant du stade de maturité gonadique.

$$RS_C = (OG_{\text{lignée sélectionnée}} - OG_{\text{lignée témoin}}) \times 100 / OG_{\text{lignée témoin}}$$

Les 2 estimateurs d'héritabilité h^2_R et h^2_{RC} sont présentés dans la section Résultats et leur pertinence est discutée dans la section Discussion.

II.4.d. Remplissage et croissance des lignées sélectionnées

Les effets de la Lignée (3 niveaux : Basse, Medium, Haute), de la ploïdie (2 niveaux : 2n ou 3n), leur interaction, et les effets du réplicat d'élevage (2 poches ostréicoles) imbriqués dans la lignée ont été testés sur l'IC. L'occupation gonadique (OG : variable continue) et la masse totale fermée (M_{tot} : variable continue) ont été utilisées comme covariables afin de détecter une corrélation éventuelle entre la croissance totale, le développement gonadique et le remplissage des individus. Comme pour l'occupation gonadique, l'effet du genre sexuel est testé uniquement pour les individus ayant développé une gonade (2 niveaux: mâle ou femelle) : les individus de sexe « indéterminé » sont exclus de l'analyse pour cet effet.

$$IC = \text{Ploïdie} + \text{Lignée} + \text{Sexe} + M_{\text{tot}} + \text{Lignée}(\text{Réplicat}) + \text{Ploïdie} \times \text{Lignée}$$

La croissance totale individuelle (M_{tot}) a été analysée en employant le même modèle avec le remplissage (IC) et l'occupation gonadique (OG_t) en covariables. En raison d'une interaction significative détectée entre les effets de la lignée et de la ploïdie, une analyse des effets groupe et sexe a finalement été réalisée par groupe de ploïdie, selon le modèle :

$$M_{\text{tot}} = \text{Lignée} + \text{Sexe} + M_{\text{tot}} + \text{Lignée}(\text{Réplicat})$$

III. Résultats

III.1. Occupation gonadique des géniteurs

L'analyse de la variabilité de l'allocation à la reproduction chez les géniteurs montre une OG moyenne croissante entre les groupes b, m, h (respectivement $54,3 \% \pm 2,5$, $72,0 \% \pm 1,0$ et $75,1 \% \pm 0,9$). L'analyse de variance par le modèle complet montre un effet très significatif de l'interaction famille x groupe ($F_{4,154} = 7,72$, $P < 0,0001$) (Tableau 19) qui traduit une certaine hétérogénéité de la pression de sélection exercée pour l'obtention des lignées divergentes en fonction de la famille de ½ frères d'origine des géniteurs. L'analyse séparée par famille de ½ frères montre dans tous les cas un effet significatif ou très significatif du groupe de géniteurs sur l'occupation gonadique (Tableau 19) et aucun dimorphisme sexuel pour ce caractère. Plus précisément, les comparaisons paire par paire révèlent pour chaque famille de ½ frères une différenciation significative entre le groupe b et les groupes m et h, mais aucune différenciation significative entre ces 2 derniers (Figure 33). La forte variance de l'occupation gonadique rencontrée chez le groupe b ($\sigma^2_{OGb} = 377,2$) comparativement aux deux autres groupes de géniteurs (m et h respectivement $\sigma^2_{OGm} = 57,3$ et $\sigma^2_{OGh} = 38,3$) est liée à une gamétogenèse de qualité hétérogène observée par microscopie (données non présentées). A l'intérieur de ce groupe de géniteurs, certains individus présentaient une gamétogenèse apparemment très retardée (gonade partiellement immature).

Tableau 19 : Analyse de la variabilité de l'occupation gonadique des groupes de géniteurs constitués pour le croisement.

Analyse inter- famille de ½ frères				
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
Sexe	NS	1	0	0,9864
1/2 famille	NS	2	0,59	0,5985
Groupe	NS	2	3,95	0,113
1/2 famille x groupe	***	4	7,72	< 0,0001
Erreur		154		

Analyse intra- famille de ½ frères		1/2 famille A		
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
Sexe	NS	1	0,63	0,4303
Groupe	***	2	11,59	< 0,0001
Erreur		46		

		1/2 famille B		
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
Sexe	NS	1	1,55	0,3393
Groupe	**	2	45,7	0,021
Erreur		51		

		1/2 famille C		
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
Sexe	NS	1	1,12	0,2952
Groupe	***	2	29,99	< 0,0001
Erreur		53		

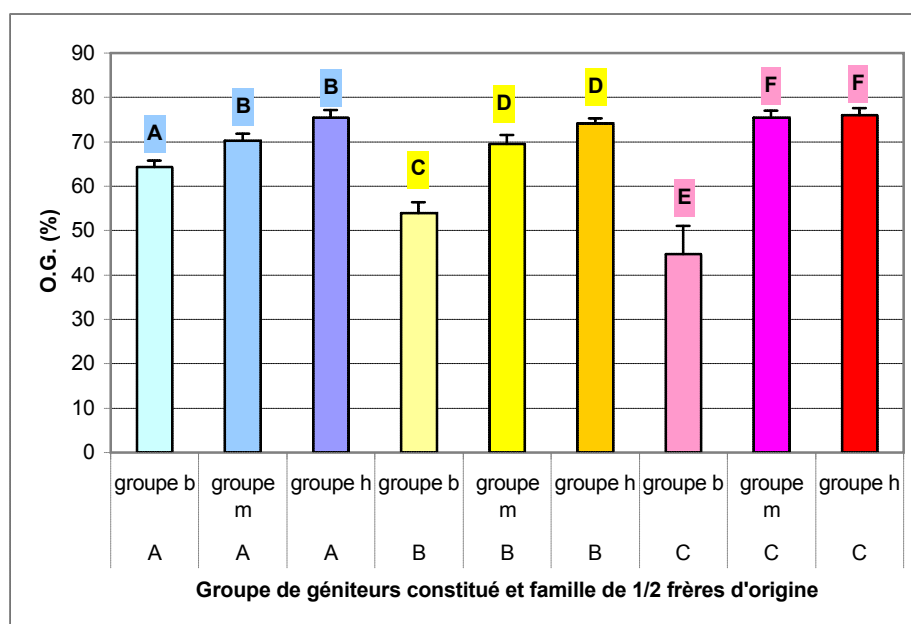


Figure 33 : Occupation gonadique moyenne des géniteurs (OG en %) et erreur-standard : différenciation intra-famille de ½ frères des groupes de géniteurs constitués (LS-means), une lettre en commun entre 2 groupes signifie une absence de différenciation significative pour les valeurs d’OG de ceux-ci.

III.2. Caractérisation de la reproduction des descendants, aspects quantitatifs

L’occupation gonadique moyenne mesurée chez les descendants est faible chez les huitres 3n (7,8%), et un peu plus forte chez les 2n (20,9%). L’analyse de la variabilité de l’allocation à la reproduction montre un effet très significatif du stade de maturité gonadique ($F_{4; 215} = 25,75$, $P < 0,0001$) (Figure 34) et des effets significatifs de la Lignée ($F_{2; 215} = 7,64$, $P = 0,0006$) et de l’IC ($F_{1; 215} = 9,23$, $P = 0,0027$) (Tableau 20). L’effet de la ploïdie n’apparaît pas significatif à l’analyse, probablement absorbé par l’effet du stade de maturité puisque le même modèle d’analyse privé de l’effet du stade de maturité gonadique montre au contraire un effet très significatif de la triploïdie ($F_{1; 215} = 28,78$, $P < 0,0001$) (données non présentées).

Une augmentation de l’allocation gonadique moyenne est constatée entre les Lignées Basse, Medium, et Haute (GO Basse = 10,3 % ± 3,44, GO Medium = 13,6 % ± 3,42, GO Haute = 19,1 % ± 3,8). Le calcul des LS-means révèle une différenciation significative de la lignée Haute par rapport aux Lignées Medium et Basse, mais pas de différenciation entre ces

dernières (Figure 35). En l'absence d'interaction significative détectée entre la ploïdie x lignée, les analyses présentées ici ont été réalisées sur la totalité du jeu de données. La même analyse conduite en considérant séparément les 2 groupes de ploïdie abouti d'ailleurs aux mêmes résultats (données non-présentées). La covariation détectée entre l'indice de condition et l'occupation gonadique découle d'une corrélation positive entre ces deux variables :

$$OG_t = 0,036 \pm 0,011 * IC.$$

L'analyse réalisée avec le modèle complet n'a pas permis de détecter un effet significatif de l'interaction ploïdie x lignée ($F_2 ; 207 = 1, P = 0,3695$) (données non présentées) sur la variabilité de l'occupation gonadique des descendants. Cette absence d'interaction traduit la conservation de l'effet du groupe de géniteurs d'origine sur l'allocation à la reproduction des descendants, qu'elle que soit par ailleurs leur ploïdie. L'absence d'effet significatif du réplicat d'élevage ($F_3 ; 215 = 0,50, P = 0,6810$) (Tableau 20) suggère que les conditions d'élevage n'ont pas joué un rôle significatif dans l'expression de la variabilité mesurée pour l'allocation gonadique.

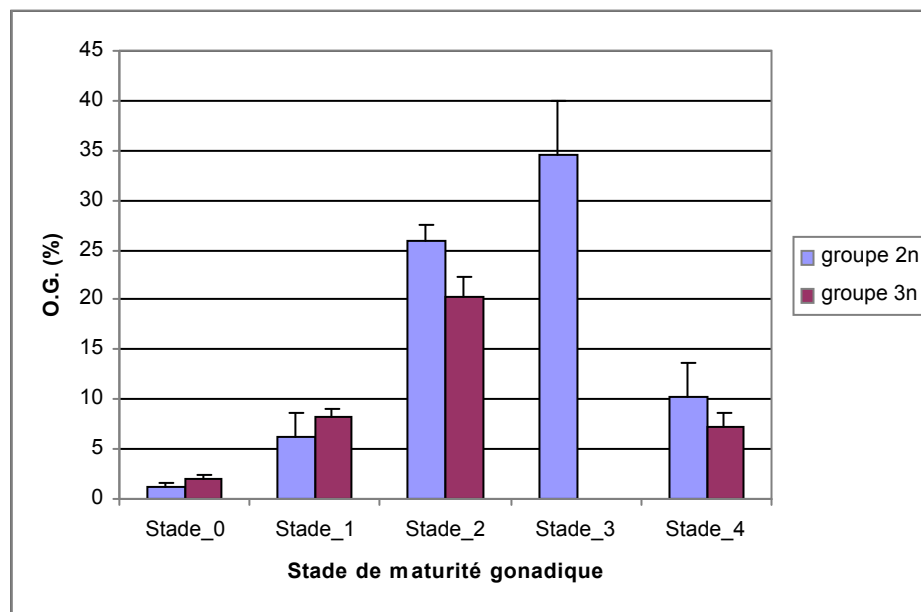


Figure 34 : Occupation gonadique moyenne des descendants sélectionnés (OG en %) et erreur standard, par stade de maturité gonadique.

Tableau 20 : Analyse de la variabilité de l'occupation gonadique des Lignées de descendants

Analyse inter-groupe				
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
IC	**	1	12,22	0,0006
M _{tot}	NS	1	0,64	0,4229
Stade	***	4	25,75	< 0,0001
Ploïdie	NS	1	0,45	0,5048
Lignée	**	2	7,08	0,0011
Sexe	NS	1	0,03	0,8523
Lignée(Réplikat)	NS	3	0,50	0,6810
Erreur		215		

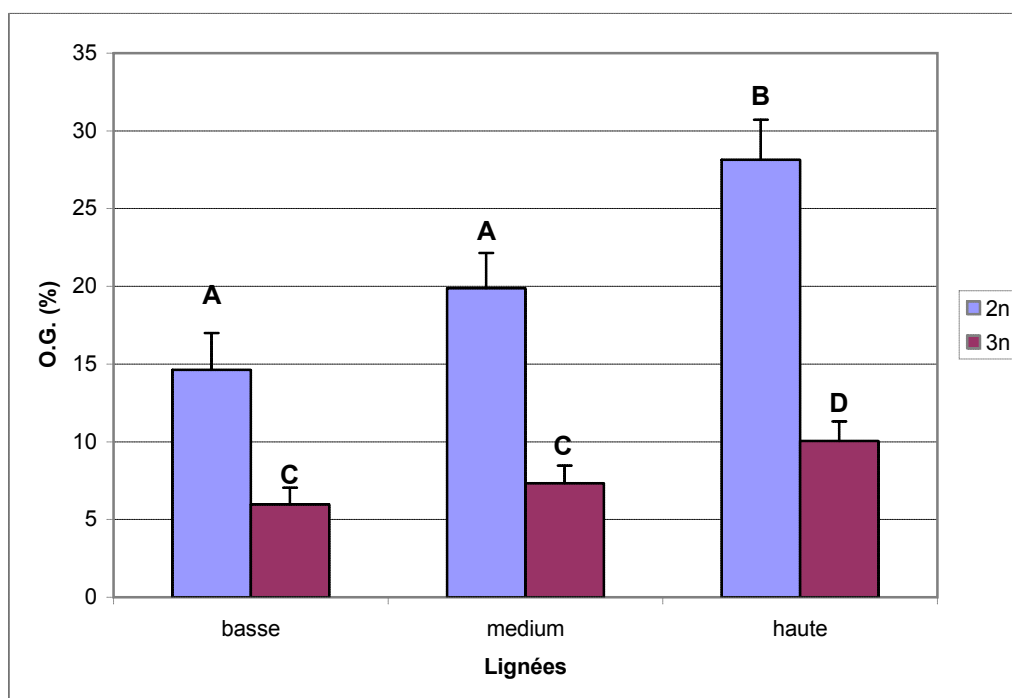


Figure 35 : Occupation gonadique des descendants (OG en %, moyenne et erreur-standard): différenciation intra- groupe de ploïdie des lignées (LS-means).

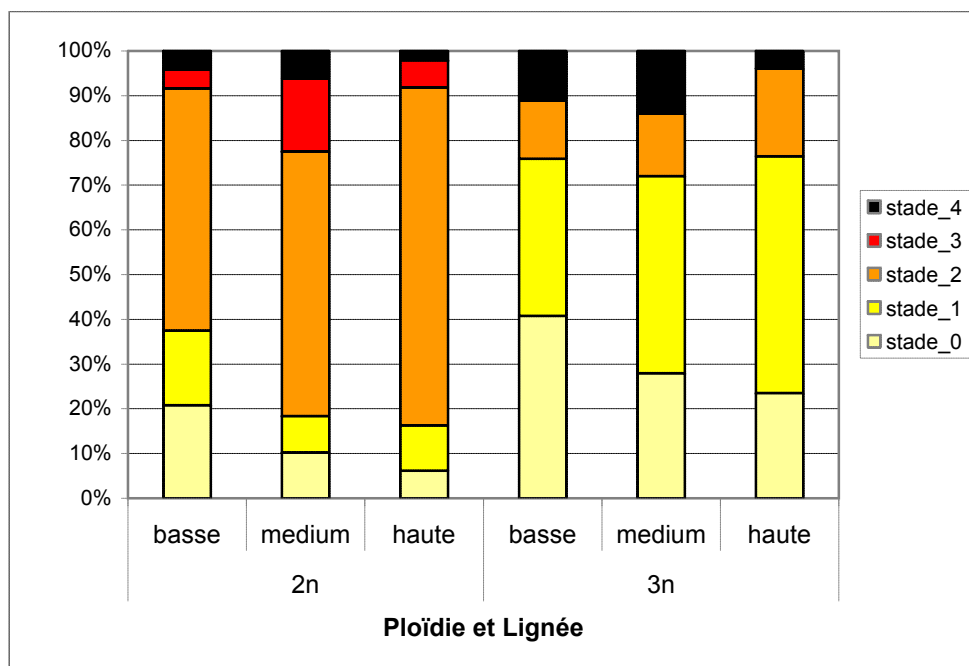


Figure 36 : Fréquence d'occurrence (%) des stades de maturité gonadique chez les descendants, par lignée et groupe de ploïdie.

III.3. Caractérisation de la reproduction des descendants, stades de maturité et genre sexuel

L'analyse de la fréquence d'occurrence des stades de maturation montre des distributions significativement différentes entre individus de ploïdie différente, qui traduisent le différentiel de la dynamique de maturation gonadique entre individus diploïdes et triploïdes ($\chi^2 = 63,3$; $P < 0,0001$) (Figure 36). En considérant la totalité du jeu de données, les effets de la lignée et du réplicat d'élevage sur les fréquences d'occurrence des stades de maturation apparaissent non-significatifs (respectivement $\chi^2 = 3,10$; $P = 0,2125$ et $\chi^2 = 10,79$; $P = 0,2138$).

L'analyse des mêmes effets conduite en considérant séparément chaque stade de maturité montre un effet très significatif de la ploïdie ($P < 0,0001$) pour la fréquence d'occurrence de chaque stade à l'exception du stade 4 ($\chi^2 = 3,8$; $P = 0,0520$). L'effet de la lignée n'est réellement significatif que pour le stade 0 ($\chi^2 = 7,7$; $P = 0,0207$), traduisant la corrélation négative entre l'intensité du développement gonadique moyen du lot et la fréquence d'occurrence du stade 0. Aucun effet significatif du réplicat d'élevage n'a été détecté.

Chez les huîtres triploïdes, la majorité des individus sont en stade précoce de maturation gonadique (stade 0 et 1 : 30,8 et 44 %) et la gamétogenèse semble ne s'être initiée que chez une faible proportion d'individus (stade 2 : 15,5 %). Lors de l'échantillonnage, aucune huître triploïde n'avait atteint une maturité gonadique totale et une quantité non-négligeable d'individus montraient une cohorte de la lignée germinale en cours de résorption (stade 4 : 10%) (Figure 36). Chez les huîtres diploïdes, la majorité des individus échantillonnés avaient initié leur gamétogenèse (stade 2 : 62,9 % d'occurrence) et quelques huîtres montraient des stades précoces de développement gonadique (stade 0 : 12,4 % et stade 1 : 11,7 %). Une faible proportion d'individus présentaient également une gonade complètement mature (stade 3 : 8,9 %) et là encore, certaines huîtres montraient une résorption gonadique en cours (stade 4 : 4,1 %)(Figure 36).

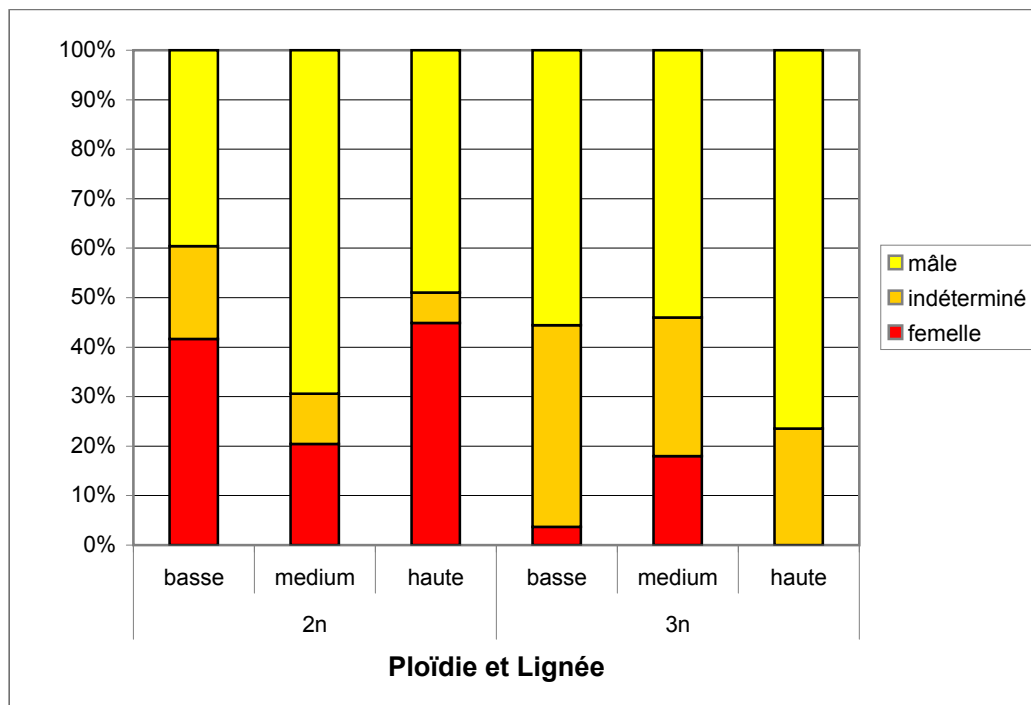


Figure 37 : Fréquence d'occurrence (%) des genres sexuels, et des individus indéterminés chez les descendants, par lignée et groupe de ploïdie.

En considérant la totalité du jeu de données, les fréquences d'occurrence des genres sexuels identifiés montrent un effet très significatif de la ploïdie ($\chi^2 = 42,14$; $P < 0,0001$) (Figure 37). Les répliquats d'élevage ($\chi^2 = 12,35$; $P = 0,1364$) ou la lignée ($\chi^2 = 2,83$; $P = 0,2429$) ne semblent quant à eux pas avoir d'effet significatif sur la distribution globale des fréquences des différents genres sexuels. Les pourcentages d'occurrence des femelles est très

significativement supérieur chez les huîtres diploïdes (2n : 35,6 % et 3n : 7,2 % ; $\chi^2 = 38,98$; $P < 0,0001$). A l'inverse, la fréquence d'apparition des individus de sexe indéterminés est très significativement supérieure chez les individus triploïdes (2n : 11,7 % et 3n : 30,8 % : $\chi^2 = 16,47$; $P < 0,0001$). Le seul effet significatif détecté pour la lignée concerne les individus de sexe indéterminés, plus nombreux dans les lignées Basses et Médium que dans la lignée Haute (lignée Basse : 29,7 %, lignée Medium : 19,1 % , lignée Haute : 14,8 %). Aucun effet significatif du réplikat d'élevage n'a été détecté lors de ces analyses.

III.4. Estimation des paramètres génétiques

L'effort de sélection estimé (chez les géniteurs) montre une pression de sélection plus forte pour la lignée Basse ($ES_{\text{Basse}} = -17,68\%$), que pour la lignée Haute ($ES_{\text{Haute}} = +3,13\%$) (Tableau 21), du fait d'un différentiel d'occupation gonadique plus important entre les géniteurs du groupe b et du groupe m (-24,6 %), qu'entre les géniteurs du groupe h et du groupe m (+4,3 %). A l'inverse, la réponse à la sélection des descendants est plus marquée pour les individus des lignées Hautes ($RS_{2n\text{Haute}} = +8,26\%$; $RS_{3n\text{Haute}} = +2,72\%$), que pour ceux des lignées Basses ($RS_{2n\text{Basse}} = -5,24\%$; $RS_{3n\text{Basse}} = -1,36\%$). Les héritabilités réalisées calculées pour les lignées reflètent cette tendance avec de plus fortes valeurs d'estimateurs pour les lignées Hautes ($h^2_{R-2n\text{Haute}} = 2,64$; $h^2_{R-3n\text{Haute}} = 0,87$) que pour les lignées Basses ($h^2_{R-2n\text{Basse}} = 0,30$; $h^2_{R-3n\text{Basse}} = 0,08$). La réponse à la sélection semble généralement plus marquée (et les estimateurs d' h^2_R plus forts) chez les huîtres diploïdes que chez les triploïdes.

L'héritabilité corrigée des effets de la dynamique (ES et RS exprimés en pourcentages de différence par rapport au témoin) génère des estimateurs dont la différence est moins marquée entre classes de ploïdie ($h^2_{RC-2n\text{Basse}} = 1,07$; $h^2_{RC-3n\text{Basse}} = 0,75$ et $h^2_{RC-2n\text{Haute}} = 13,58$; $h^2_{RC-3n\text{Haute}} = 8,63$), mais dont les valeurs sont là encore très fortes pour les lignées Hautes, et plus élevées chez les huîtres 2n que chez les huîtres 3n (Tableau 21).

Tableau 21 : Paramètres génétiques de la réponse à la sélection

Géniteurs						
Groupe	Moyenne OG (%)	Effort de sélection	Ecart par rapport au groupe m (%)			
b	54,32	-17,68	-24,6			
m	72					
h	75,13	3,13	4,3			

Descendants						
Ploïdie	Lignée	Moyenne OG (%)	Réponse à la sélection	Ecart par rapport à la lignée Medium (%)	h^2_R	h^2_{RC}
2n	Basse	14,63	-5,24	-26,4	0,30	1,07
	Medium	19,87				
	Haute	28,13	8,26	58,4	2,64	13,58
3n	Basse	5,97	-1,36	-18,5	0,08	0,75
	Medium	7,33				
	Haute	10,05	2,72	37,1	0,87	8,63

III.5. Condition et croissance des lignées sélectionnées

La masse totale fermée (M_{tot}) moyenne par ploïdie est de 6,8 g chez les huîtres diploïdes et 8,3 g chez les huîtres triploïdes (Figure 38). L'analyse de variance effectuée par le modèle complet ne montre aucun effet significatif des variables explicatives, à l'exception d'un effet très significatif de l'interaction ploïdie x lignée qui traduit des performances de croissance par lignée ne s'exprimant pas de la même façon entre individus diploïdes et triploïdes (Tableau 22). L'analyse séparée des mêmes effets par groupe de ploïdie détecte chez les huîtres 2n une covariation de la M_{tot} avec l'IC (corrélation positive : $M_{tot} = 0,222 \pm 0,071 * IC$) ($F_{1,114} = 9,84$; $P = 0,0022$) et un effet significatif de la Lignée ($F_{2,114} = 5,26$; $P = 0,0065$). Chez les diploïdes, les individus de la lignée Haute sont significativement plus gros que les individus des lignées Medium et Basse (Figure 38).

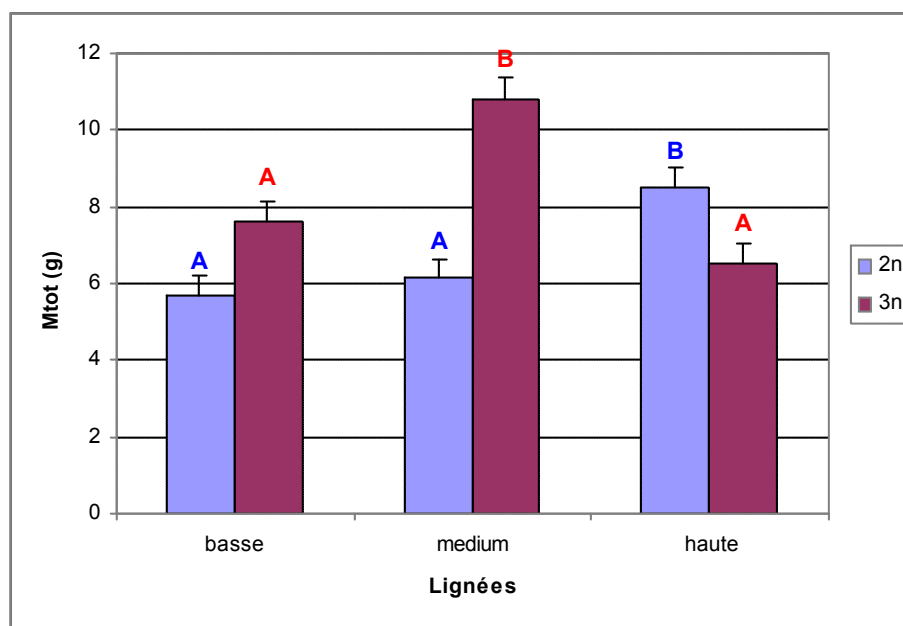


Figure 38 : Masse totale fermée des descendants (M_{tot} en g, moyenne et erreur-standard): différenciation intra- groupe de ploïdie des groupes de lignées (LS-means).

Tableau 22 : Analyse de la variabilité de la masse totale fermée des Lignées de descendants

Analyse inter-groupe de ploïdie				
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
OG _t	NS	1	0,14	0,7402
IC	NS	1	2,11	0,2837
Ploïdie	NS	1	1,89	0,303
Lignée	NS	2	0,16	0,8648
Sexe	NS	1	0,72	0,4843
Lignée(Réplicat)	NS	3	2,03	0,1102
Ploïdie x Lignée	**	2	8,32	0,0003
Erreur		213		
Analyse intra-groupe de ploïdie				
Groupe 2n				
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
OG _t	NS	1	1,39	0,2415
IC	**	1	9,84	0,0022
Lignée	**	2	5,26	0,0065
Sexe	NS	1	0,76	0,3843
Lignée(Réplicat)	NS	3	1,06	0,369
Erreur		114		
Analyse intra-groupe de ploïdie				
Groupe 3n				
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
OG _t	NS	1	0,92	0,3388
IC	**	1	6,56	0,0121
Lignée	*	2	2,66	0,0751
Sexe	**	1	12,8	0,0006
Lignée(Réplicat)	NS	3	1,89	0,1361
Erreur		93		

Chez les huîtres triploïdes, l'effet de la lignée n'est pas significatif au seuil de 5 % ($F_{2,93} = 2,66$; $P = 0,0751$) bien que les comparaisons par paire montrent une différenciation significative de la lignée Medium dont les individus sont significativement plus gros que ceux des 2 autres lignées (Figure 38). Là encore, la masse totale fermée montre une covariation avec l'indice de condition (corrélation positive : $M_{tot} = 0,187 \pm 0,07 * IC$). L'effet significatif détecté pour le genre sexuel ($F_{1,93} = 12,80$; $P = 0,0006$) traduit le dimorphisme sexuel exprimé par le groupe : les rares femelles (11 sur 155 individus) étant significativement plus grosses que les mâles ($12,82 \text{ g} \pm 1,52$ contre $7,84 \text{ g} \pm 0,42$).

L'analyse de la variabilité de l'indice de condition (IC) détecte un effet significatif de la lignée ($F_{2,215} = 8,64$; $P = 0,0002$) mais aucun effet significatif de l'interaction ploïdie x lignée ($F_{2,213} = 0,10$; $P = 0,9083$, analyse par le modèle complet) (données non-présentées) ni de l'effet de la ploïdie ($F_{1,215} = 2,23$; $P = 0,1370$) (Tableau 23). L'effet apparemment conservé de la lignée entre groupes de ploïdies différentes se traduit par un remplissage significativement supérieur des individus des lignées Medium (Figure 39) (Lignée Basse : $13,93 \pm 0,38$; Lignée Medium : $18,20 \pm 0,6$; Lignée Haute : $15,50 \pm 0,42$). L'analyse des covariations détecte un effet significatif de l'OG_t sur l'IC ($F_{1,215} = 9,23$, $P = 0,0027$) et un effet très significatif de la M_{tot} ($F_{1,215} = 18,10$, $P < 0,0001$) (Tableau 23) qui résultent d'une corrélation positive entre l'IC et la covariable dans les 2 cas.

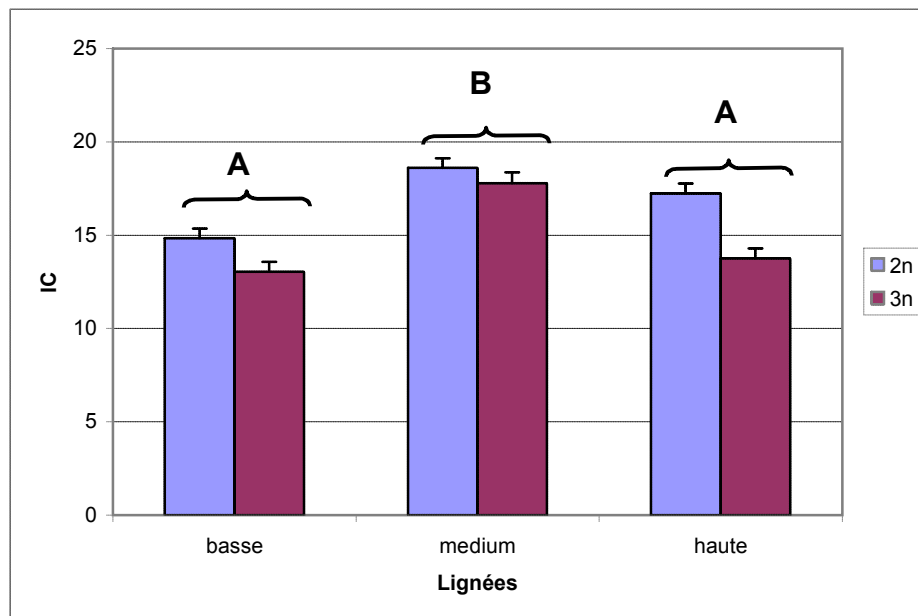


Figure 39 : Indice de condition des descendants (IC) (moyenne et erreur-standard): différenciation inter- groupe de ploïdie des lignées (LS-means).

Tableau 23: Analyse de la variabilité de l'indice de condition (IC) des descendants sélectionnés

Analyse inter-groupe de ploïdie				
Source	Significativité	DF	F-Value	Pr > F
OG _t	**	1	9,23	0,0027
M _{tot}	***	1	18,10	< .0001
Ploïdie	NS	1	2,23	0,1370
Lignée	**	2	8,64	0,0002
Sexe	NS	1	0,85	0,3574
Lignée(Réplikat)	NS	3	2,42	0,0671
Erreur		215		

IV. Discussion

IV.1. Caractérisation de la reproduction des géniteurs et des descendants

Chez les géniteurs, l'occupation gonadique croissante des groupes b, m, h indique l'efficacité de la méthode employée pour constituer des groupes d'individus d'allocation à la reproduction contrastée (voir le Paragraphe IV.3. de cette partie pour une discussion de la réponse à la sélection des lignées). La comparaison des valeurs d'OG mesurées (67 % en moyenne) avec les valeurs d'occupation gonadique rapportées dans la littérature (Enriquez-Diaz, 2004 ; Royer et al., 2008) suggère que le développement gonadique des individus avait alors atteint un stade proche de la maturité. L'observation microscopique a confirmé l'homogénéité de la gamétogenèse à l'intérieur des sous-échantillons constitués à partir des groupes de géniteurs. Les individus montraient tous des tissus gonadiques matures à l'exception d'individus du groupe b (16 sur 59) qui présentaient encore des cellules de la lignée germinales immatures. Les comparaisons paire par paire montrent une différenciation significative entre le groupe b de géniteurs, mais pas entre les groupes m et h, indiquant que l'effort de sélection a été plus intense pour diminuer l'allocation à la reproduction que pour l'augmenter.

Chez les descendants, le développement gonadique mesuré pour les lignées Basse, Medium et Haute est clairement croissant entre celles-ci, et montre une différenciation significative de la lignée Haute comparée aux 2 autres, mais pas de différences significatives entre celles-ci. Parallèlement à la variabilité de l'allocation à la reproduction, l'observation microscopique révèle une certaine hétérogénéité pour les indicateurs qualitatifs de la reproduction chez les descendants et une corrélation significative entre le degré de maturité gonadique et l'allocation à la reproduction. Cette corrélation avait été suggérée par notre approche théorique de la modélisation de l'allocation à la reproduction (voir Encart). Une occupation gonadique croissante est ainsi mesurée entre les stades 0, 1, 2 et 3 de maturité gonadique. Le stade 4, caractérisant une résorption des tissus gonadiques s'accompagne également d'une diminution de l'occupation gonadique mesurée. L'absence d'interaction significative détectée entre le stade de maturité gonadique et la ploïdie résulte probablement de la même corrélation : à stade de maturité gonadique égal, les huîtres triploïdes présentent une

occupation gonadique moyenne qui ne diffère pas significativement de celle des individus diploïdes. La même corrélation entre le stade de maturité gonadique et l'allocation à la reproduction s'exprime dans la réponse des lignées de descendants à la sélection : la fréquence d'individus en stade 0 est la plus forte dans les lignées Basses (ceci pour les 2 groupes de ploïdie) qui présentent subséquentement les plus faibles occupations gonadiques moyennes.

Remarquons ici que les valeurs relativement faibles d'occupation gonadique mesurées en général chez les huîtres des lignées sélectionnées traduisent l'immaturation gonadique de ces individus, mise en évidence par la forte occurrence d'individus en cours de gamétogenèse chez les huîtres diploïdes (stade 2 : 62 %). Les suivis effectués dans le Bassin de Marennes-Oléron montrent que les huîtres creuses y atteignent habituellement la maturité gonadique au mois de Juillet (soit à la date de notre échantillonnage) (Deslous-Paoli et Héral, 1988). Les individus étudiés ici présentaient un retard de leur maturation gonadique qui découlait probablement d'un cycle zootechnique inhabituel, puisqu'ils ont été gardés longtemps (3 mois en tout) en nurserie et micronurserie afin de stimuler leur croissance, et ont ensuite été placés tardivement (au mois de Novembre) en mer. Il est probable que le stade précoce de maturation gonadique atteint par les huîtres (et notamment les triploïdes) n'ait pas permis la pleine expression de la réponse à la sélection (Paragraphe IV.7. de cette Discussion). D'un autre côté, le fait que l'allocation à la reproduction des huîtres triploïdes ait été mesurée en début de gonadogenèse a permis d'éviter que des phénomènes d'atrésie ne se produisent chez ces individus, venant biaiser l'estimation de l'allocation à la reproduction. Le degré de maturité de la gonade à la date d'échantillonnage est en effet un paramètre qui influence beaucoup la mesure de l'occupation gonadique chez les huîtres creuses triploïdes qui présentent une tendance prononcée à résorber leur tissus gonadique en cours de maturation (Allen et Downing 1990, Shpigel et al., 1992).

IV.2. Sex-ratio et dimorphisme sexuel

Une forte différence de sexe-ratio est observée entre huîtres diploïdes et triploïdes, qui présentent respectivement 6,8 et 1,2 femelles pour 10 mâles, et contraste fortement avec les données de la littérature qui rapportent plutôt des sexe-ratio équilibrées entre huîtres creuses $2n$ et $3n$ (Allen and Downing, 1990, Chapitre I des Résultats, Annexe I). Une telle différence de sexe-ratio entre individus diploïdes et triploïdes pourrait résulter de la contribution non-

balancée de l'un des génomes parentaux⁸ si l'on admet l'hypothèse d'un déterminisme génétique du sexe chez *Crassostrea gigas*. Un tel effet de la triploïdie sur la sexe-ratio a par exemple été rapporté chez la moule *Mytilus edulis* dont les triploïdes sont très majoritairement mâles (Brake et al., 2004), et chez *Mya arenaria* et *Argopecten ventricosus* dont les triploïdes sont majoritairement femelles (Allen et al., 1986 ; Ruiz-Verdugo et al., 2000).

L'hypothèse alternative d'un déterminisme physiologique du genre sexuel chez l'huître creuse, probablement basé sur une corrélation positive entre le niveau de réserves métaboliques et la probabilité de développer une gonade femelle doit également être considérée (Galstoff, 1964 ; Le Dantec, 1968 ; Enriquez-Diaz, 2004). Dans la mesure où l'induction de la triploïdie a une influence directe sur la croissance, elle doit en avoir une également sur le budget énergétique et il est probable que la condition physiologique de nos individus $2n$ et $3n$ n'aie pas été équivalente au cours de leur cycle d'élevage. La différence observée de sexe-ratio entre groupes de ploïdie pourrait ainsi résulter d'une différence d'état physiologique autant que d'une perturbation du déterminisme génétique du sexe. Dans notre étude, le dimorphisme sexuel est observé particulièrement chez les individus triploïdes dont les femelles montrent une masse totale très supérieure à celle des mâles. Un tel dimorphisme a déjà été observé chez des huîtres creuses triploïdes et diploïdes (Baghurst et Mitchel, 2002 ; Chapitre I des Résultats) et suggère fortement une différence de budget énergétique entre individus ayant développé une gonade femelle ou mâle. Cette relation entre acquisition énergétique et déterminisme du sexe peut soit impliquer une relation de causalité entre la première et le second, soit résulter de la covariation de 2 traits phénotypiques déterminés par un facteur externe.

IV.3. Réponse à la sélection des individus diploïdes et triploïdes : reproduction

Une corrélation est observée entre l'OG mesurée chez les lignées de descendants et celle des groupes de géniteurs dont ils sont issus, et ceci pour les individus diploïdes comme triploïdes. Cette corrélation suggère fortement une réponse de l'allocation à la reproduction des descendants $2n$ comme $3n$ à la sélection divergente exercée lors du croisement. L'absence d'interaction significative détectée entre la lignée et la ploïdie des individus implique

⁸ En l'occurrence la triploïdie a été ici induite par l'inhibition d'une des divisions de méiose de l'ovocyte et la femelle contribue donc pour 2/3 au génotype triploïde de sa descendance, contre 1/3 pour le mâle.

également une conservation de l'effet du groupe de géniteurs d'origine sur l'allocation à la reproduction des descendants, qu'elle que soit par ailleurs leur ploïdie. Les différences de maturité gonadique observées entre lignées d'une part, et entre groupes de ploïdie d'autre part suggèrent que la réponse à la sélection des lignées intègre à la fois une composante quantitative (la réponse à la sélection mesurée) et une composante qualitative (en l'occurrence une gamétogenèse moins avancée chez les individus des lignées Basses diploïdes et triploïdes). Les héritabilités estimées signifient que pour 1% de différence entre l'OG du géniteur et la moyenne de sa population d'origine, l'occupation gonadique des descendants est augmentée de 2,64 % et 0,87 % respectivement pour les lignées Hautes diploïdes et triploïdes et, à l'inverse, diminuée de 0,30 % et 0,08 % pour les lignées Basses diploïdes et triploïdes. La corrélation génétique observée entre individus diploïdes et triploïdes d'une part, et les valeurs relativement élevées des estimateurs d'héritabilité pour l'allocation à la reproduction d'autre part, attestent de la faisabilité d'une sélection des géniteurs diploïdes pour l'amélioration génétique de ce caractère chez les huîtres triploïdes. Remarquons que notre précédente étude du déterminisme génétique de l'allocation à la reproduction chez des huîtres creuses diploïdes et triploïdes (Chapitre II des Résultats) n'avait mis en évidence ni l'un ni l'autre de ces résultats. La divergence entre les résultats de cette étude précédente et ceux de celle-ci sera discutée dans les paragraphes suivants.

IV.4. Réponse à la sélection des individus diploïdes et triploïdes : croissance

Une attention particulière a été apportée lors de ce travail à la réponse des variables liées à la croissance telles que l'indice de condition et la masse totale fermée à la pression de sélection exercée sur l'intensité de l'allocation à la reproduction. De nombreuses observations suggèrent en effet 1) que l'allocation à la reproduction d'un individu et sa croissance somatique sont corrélées chez *Crassostrea gigas* (Pouvreau et al. 2006, Royer et al., 2008), 2) que l'effort de reproduction montre un trade-off génétique avec la croissance (Ernande et al., 2004). La covariation inter-individuelle de l'indice de condition d'un côté, et de l'occupation gonadique et la masse totale de l'autre, atteste du degré de corrélation entre ces traits phénotypiques. A l'inverse, l'occupation gonadique moyenne des lots expérimentaux ne montre de covariation ni avec l'indice de condition, ni avec la masse totale moyenne. Ce point

précis suggère que les groupes d'individus sélectionnés divergent effectivement pour leur effort reproducteur plutôt que pour des variables corrélées à celui-ci, mais également liées à l'acquisition énergétique (et pour lesquelles un différentiel entre lignées pourrait entraîner un différentiel d'allocation à la reproduction). La sélection préalable de géniteurs présentant une taille moyenne proche de celle de leur lot d'origine a très probablement contribué à améliorer notre effort de sélection en rendant la pression de sélection plus spécifique de l'effort de reproduction. Remarquons toutefois que les corrélations détectées entre l'occupation gonadique et les paramètres liés à la croissance devraient logiquement entraîner sur le long terme l'expression d'un différentiel de croissance entre individus divergents pour leur effort reproducteur. L'existence de mécanismes de ré-allocation énergétiques entre survie, croissance gonadique et croissance somatique est en effet fortement suspectée chez l'huître creuse et pourrait participer aux corrélations observées entre survie et effort de reproduction chez les diploïdes (Ernande et al., 2004, Samain et al., 2007) comme à la croissance accélérée des individus triploïdes (Hawkins et al., 1994 ; Garnier-Géré et al., 2002 ; Nell 2002). Il est probable que ces mécanismes s'expriment notamment après plusieurs saisons de maturation au cours desquelles les individus émettent une masse de gamètes (et perdent donc d'autant plus de poids) que leur effort de reproduction est important.

IV.5. Une sélection divergente dissymétrique

Les différences d'allocations gonadiques moyennes entre lignées montrent un renversement de tendance entre géniteurs et descendants : si l'effort de sélection a été plus fort chez les géniteurs du groupe b, la réponse à la sélection a été plus forte pour les descendants des lignées Hautes. Les estimateurs d'héritabilité estimés pour les individus des lignées Hautes apparaissent en conséquence plus forts que pour les lignées Basses ($h^2_{R2n-Haute} > h^2_{R2n-Basse}$ et $h^2_{R3n-Haute} > h^2_{R3n-Basse}$) (Tableau 21) et cette différence traduit une réponse phénotypique plus fortement divergente dans le sens d'une augmentation que d'une diminution de l'allocation à la reproduction. L'explication d'un tel renversement de tendance entre l'effort de sélection et la réponse à la sélection découle très probablement d'une interaction entre l'effort de reproduction individuel des géniteurs, et leur contribution au pool de gamètes constitués lors du croisement. La variabilité d'occupation gonadique mesurée pour les huîtres d'un même groupe implique en effet que des géniteurs de très faible occupation gonadique ont été utilisés lors du croisement en même temps que des individus ayant développé une plus grosse gonade,

et produit subséquemment plus de gamètes. La forte variance d'OG mesurée notamment dans le sous-échantillon de géniteurs du groupe b doit ainsi traduire des contributions gamétiques individuelles proportionnelles à l'allocation à la reproduction, et donc très différentes entre individus. La contribution réduite des géniteurs de faible occupation gonadique au pool de gamètes initial a probablement eu pour conséquence de minimiser le nombre de leurs descendants dans la lignée sélectionnée, et donc d'augmenter la probabilité d'apparition des génotypes les plus féconds au sein de celle-ci. Ce phénomène implique une différence (sous-estimation pour les lignées Hautes et sur-estimation pour les lignées Basses) entre la pression de sélection réellement exercée lors du croisement, et l'estimation de l'effort de sélection mesuré sur un sous-échantillon de géniteurs. L'observation de stades de maturité plus précoces chez les géniteurs du groupe b suggère également que la pression de sélection exercée lors du tri des géniteurs intégrait à la fois les composantes dynamiques et quantitatives de l'allocation à la reproduction.

Sur un plan méthodologique, un tel phénomène aurait pu être contrecarré en équilibrant les contributions gamétiques individuelles entre géniteurs plutôt qu'entre familles de $\frac{1}{2}$ frères. Une telle opération aurait nécessité toutefois un surcroît de travail lors du croisement qui pose d'autres difficultés techniques et n'a pu être appliquée ici. Sur un plan plus théorique, il aurait été également possible de corriger les paramètres génétiques des différences de contribution entre géniteurs en pondérant la différence observée entre l'OG individuelle et l'OG de la population non-sélectionnée par l'effort de reproduction du géniteur. Lors de cette étude, la méthode employée pour la mesure de l'OG était destructive, et ne pouvait pas s'effectuer sur les individus participant au croisement : la mesure directe de l'OG des géniteurs n'était donc pas disponible et la correction des paramètres génétiques n'a pu être effectuée.

IV.6. Des résultats dissymétriques ?

Dans les résultats que nous présentons ici, l'ordre des rangs des 3 lignées est conservé entre classes de ploïdie et la réponse à la sélection des huîtres triploïdes apparaît remarquablement corrélée à celle des individus diploïdes. L'analyse de la variabilité de l'occupation gonadique montre une absence d'interaction significative ploïdie x lignée qui traduit la conservation de l'effet du groupe de géniteurs d'origine sur l'allocation à la reproduction des descendants, qu'elle que soit leur ploïdie. La corrélation génétique observée entre individus diploïdes et triploïdes d'une part, et les valeurs relativement élevées des estimateurs d'héritabilité pour

l'allocation à la reproduction d'autre part, suggèrent qu'une sélection génétique des géniteurs diploïdes pourrait effectivement s'avérer efficace pour l'amélioration de ce caractère chez les huîtres triploïdes. Dans notre précédente étude, des interactions très significatives avaient au contraire été détectées entre la ploïdie et les valeurs parentales à la fois pour la croissance et pour l'effort de reproduction (Chapitre II des Résultats). Les performances familiales pour l'allocation à la reproduction n'avaient alors pas montré de corrélation entre individus diploïdes et triploïdes, suggérant une perturbation majeure du déterminisme génétique de l'allocation à la reproduction chez les huîtres triploïdes.

Les résultats de cette étude et de la précédente traduisent dans un cas une réponse additive modérée des individus triploïdes à la sélection effectuée sur les diploïdes, et dans l'autre une absence de corrélation génétique entre individus diploïdes et triploïdes. Cette différence résulte probablement de la sensibilité des déterminismes génétiques de l'huître aux conditions environnementales, mis en évidence par des interactions génétique x environnement pour la survie, l'effort de reproduction, la croissance (voir Sheridan, 1997, Ernande et al., 2004, Degrémont et al, 2007, Evans et Langdon, 2006). Il faut noter que l'environnement d'élevage a été volontairement modifié entre la précédente étude et celle-ci afin de créer des conditions supposées plus favorables à l'expression d'un déterminisme génétique chez les huîtres triploïdes. Pour le présent travail, l'utilisation d'individus plus âgés, élevés à plus faible densité que lors de la précédente étude a probablement participé à diminuer la compétition inter-individuelle qui semblait s'être fortement exprimée la première fois. Il est probable que cette procédure ait finalement contribué à tempérer les effets de l'environnement sur l'expression du déterminisme génétique en réduisant la variabilité environnementale à l'échelle de l'individu. Pris ensemble, les résultats de ces 2 études suggèrent que l'effort de reproduction des huîtres triploïdes peut montrer une corrélation positive avec celui d'individus diploïdes apparentés, mais uniquement sous certaines conditions environnementales (au sens large) particulières.

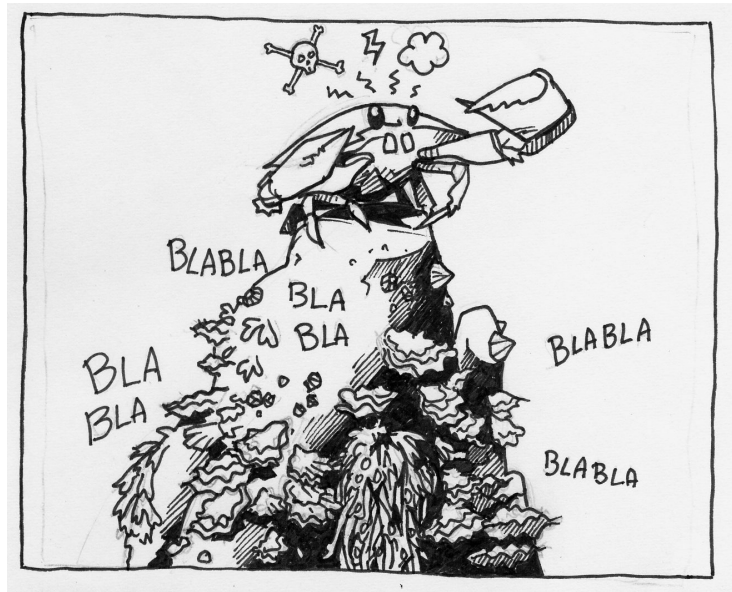
IV.7. Héritabilités comparées des individus diploïdes et triploïdes

Les valeurs de l'héritabilité réalisée h^2_R estimées chez les huîtres diploïdes sont de 67 à 74% plus fortes que chez les triploïdes (Tableau 21), et cette différence peut être directement interprétée comme la preuve d'un déterminisme génétique moins fort chez les huîtres triploïdes. Une analyse plus détaillée de l'effet de la triploïdie sur la gamétogenèse permet de formuler une hypothèse concernant la réduction observée de l'héritabilité réalisée.

Il est probable que cet effet de la triploïdie sur le développement gonadique soit en réalité multi-paramétrique et que l'indicateur biométrique utilisé ici (l'OG) intègre plusieurs composantes de cette perturbation. Tout d'abord, la triploïdie entraîne un retard de maturation gonadique. Ensuite, l'expression d'une différence d'OG entre lignées d'effort reproducteur contrastés est dépendante de la dynamique de maturation gonadique. Il est probable que la réponse à la sélection des individus triploïdes soit alors d'autant plus faible que leur stade de maturité est précoce (et leur gonadogenèse réduite), indépendamment de toute considération sur l'expression des valeurs génétiques chez les polyploïdes. La correction du différentiel d'allocation gonadique par l'effet de la dynamique de maturation permet ainsi de réduire en grande partie l'écart observé entre les valeurs d'héritabilité chez les huîtres $2n$ et $3n$ ($h^2_{R2n} - h^2_{R3n} > h^2_{RC2n} - h^2_{RC3n}$) (Tableau 21). Remarquons ici que cette correction a été réalisée en considérant l'hypothèse d'une relation linéaire entre le différentiel d'allocation gonadique et le degré de maturité gonadique qui ne constitue probablement qu'une approximation grossière de la corrélation entre ces deux variables. Les données disponibles ne nous ont toutefois pas permis de modéliser de façon réaliste la corrélation, notamment en raison d'une répartition très déséquilibrée des stades de maturité entre classes de ploïdie (stade 3 absent chez les $3n$).

V. Conclusion

Ces résultats mettent en évidence l'efficacité de la sélection génétique de géniteurs diploïdes pour l'obtention de lignées triploïdes divergentes pour leur effort de reproduction. Le protocole expérimental semble avoir généré une réponse dissymétrique, en amplifiant la réponse des groupes de descendants dans le sens d'une augmentation de l'allocation à la reproduction, et en la diminuant dans le sens d'une réduction de celle-ci. Dans tous les cas, la variation de l'allocation à la reproduction semble intégrer une composante dynamique et une composante quantitative, à la fois entre les lignées d'un même groupe de ploïdie, et entre groupes de ploïdie différents. Ce dernier point illustre la complexité de l'analyse comparée de la transmission des caractères génétiques entre individus de ploïdie différente. L'effet simultané de l'induction de triploïdie sur la dynamique de gonadogenèse et l'intensité de l'effort reproducteur entraîne une réponse intégrée de l'allocation à la reproduction et des paramètres génétiques associés (en l'occurrence h^2) qui ne facilite pas l'interprétation biologique des différences observées entre individus $2n$ et $3n$. Les corrélations physiologiques observées chez l'huître creuse laissent également présager de l'expression à long terme d'une réponse corrélée de la survie et de la croissance à une sélection sur la reproduction. Le suivi des performances physiologiques de ces individus au cours de leur deuxième et troisième année (2009-2010) de croissance (programme « OxyGènes », GIS Europôle Mer) permettra sans doute d'approfondir l'étude de la réponse à la sélection de ces lignées d'huîtres.



Discussion

I. Résultats principaux et conclusions

I.1. Allocation à la reproduction des huîtres triploïdes

I.1.a. *Quantification*

Notre travail avait pour premier objectif de caractériser qualitativement et quantitativement la maturation gonadique des huîtres triploïdes. L'occupation gonadique (OG) d'huîtres creuses triploïdes et diploïdes a donc été mesurée à plusieurs reprises au cours de cette thèse, et nous rapportons dans les sections précédentes des résultats qui montrent un développement gonadique significatif chez les huîtres triploïdes.

Lors de notre première étude (Chapitre I des Résultats), la majorité des huîtres 3n échantillonnées présentaient des tissus gonadiques en cours de maturation, malgré leur jeune âge à la date d'échantillonnage. Les valeurs d'occupations gonadiques mesurées atteignaient alors en moyenne 12 % chez les huîtres triploïdes, contre 25 % chez les huîtres diploïdes (soit une OG réduite de 53 % chez les huîtres 3n par rapport aux 2n).

Lors de notre seconde étude (Chapitre II des Résultats), les valeurs d'occupation gonadique mesurées chez les huîtres triploïdes atteignaient 8 % contre 21 % chez les diploïdes (soit une OG réduite en moyenne de 60 % chez les huîtres triploïdes). L'allocation à la reproduction des huîtres triploïdes (la proportion d'énergie allouée à la reproduction) semble être donc diminuée en moyenne d'un peu plus de la moitié par comparaison avec les diploïdes, en considérant que l'occupation gonadique mesurée est un estimateur correct de la quantité d'énergie allouée à la production de tissus reproducteurs. Ces résultats sont en contradiction avec l'opinion relativement répandue qui voudrait que le développement gonadique des huîtres creuse triploïdes soit négligeable, et qui a poussé certains auteurs à les considérer comme des témoins ne développant aucun tissu reproducteur, pour des études portant sur la physiologie des diploïdes (Hoonkoop 2003 ; Amiard et al. 2005 ; Gagnaire et al. 2006). A l'inverse, nos résultats sont relativement cohérents avec d'autres publications qui employaient également l'occupation gonadique pour mesurer l'allocation à la reproduction. Allen et Downing (1986) rapportaient des valeurs d'occupation gonadique chez les triploïdes comprises entre 19 et 44 % de celle des diploïdes. Shpigel et al. (1992) avaient quant à eux estimé une occupation gonadique chez les triploïdes comprise entre 60 et 80 % de celle des

huîtres diploïdes, mais pour cette dernière étude, les auteurs avaient exclu de leur analyse les individus triploïdes ne présentant aucun développement gonadique.

Il faut préciser ici que pour nos travaux, nous avons volontairement mesuré l'occupation gonadique d'individus en début de gonadogenèse, afin d'essayer d'estimer une valeur maximale d'OG atteinte chez les triploïdes et éviter que des phénomènes de résorption et de rematuration ne débouchent sur des estimateurs biaisés de l'allocation réelle à la reproduction. Cette approche semble avoir été efficace, puisque seule une proportion réduite d'individus a montré des signes d'atrésie ou plusieurs cohortes de cellules. Dans le même temps, cette mesure précoce de l'allocation à la reproduction n'est très probablement pas un bon indicateur de la quantité de gamètes finalement produite. Nous discuterons dans le paragraphe suivant la relation entre l'allocation à la reproduction observée en début de gamétogenèse chez les triploïdes, et leur fécondité.

1.1.b. Dynamique de maturation gonadique des triploïdes

Les résultats de nos travaux semblent indiquer que la triploïdie induit une gonadogenèse plus hétérogène que chez les huîtres diploïdes. Cette hétérogénéité s'est manifestée par l'occurrence plus grande d'individus présentant simultanément des cellules de la lignée germinale à des stades variés de maturation ainsi que d'hermaphrodites. Une petite proportion d'individus triploïdes ont montré également une absence totale de gonadogenèse, n'initiant donc pas de maturation gonadique (Chapitre II : Stade 0 = 4,6 % des 3n, Stade 0 = 0 % des 2n; Chapitre II : Stade 0 = 30,8 % des 3n, Stade 0 = 12,4 % des 2n). Ce résultat particulier indique probablement que la réduction du développement gonadique des huîtres triploïdes peut intervenir très tôt, dès les premières étapes de la maturation.

Cependant, chez la majorité des individus échantillonnés, un développement gonadique aux stades précoces (prolifération goniale en cours) a été observé. L'aspect et la quantité produite de tissus reproducteur était alors très comparable à ceux d'individus diploïdes à stade de maturité équivalent, ce qui pourrait indiquer que la prolifération des gonies se déroule normalement chez les huîtres triploïdes, comme cela a été proposé dans des études précédentes (Allen & Downing 1990, Raguènes, 2006). La gamétogenèse semble en revanche généralement très affectée par la triploïdie : l'ovogenèse et la spermatogenèse observées chez les huîtres triploïdes étaient ainsi marginales, très retardées dans leur initiation par rapport aux diploïdes. Il semble qu'une fraction très variable des cellules germinales puisse arriver

jusqu'à pleine maturité, alors que les autres restent « bloquées » à des stades précoces, ou sont résorbées. Des cellules de la lignée germinale présentant des signes d'atrésie ont été d'ailleurs observées chez un nombre important d'huîtres triploïdes, mais elles étaient très peu nombreuses dans nos échantillons recueillis en début de gonadogénèse, et disséminées dans un tissu gonadique majoritairement en cours de maturation (Figure 40). Ces phénomènes de résorption gonadique spontanée chez les huîtres triploïdes sont rapportés de façon récurrente dans la littérature et ont également été observés sur des individus issus de nos lots expérimentaux, lors de suivis menés parallèlement aux travaux rapportés ici (expérimentations décrites dans Castagnet, 2008). Si l'on admet que les premières étapes du développement gonadique se déroulent normalement, il est alors probable que ce soit la variabilité de l'intensité des phénomènes de résorption gonadique qui conditionne la quantité de gamètes effectivement produits par les huîtres triploïdes.

La forte proportion (9,7 %) d'hermaphrodites asynchrones observés lors de notre première étude (Figure 41) chez les individus triploïdes pourrait également être une conséquence directe de leur gamétogénèse perturbée. Il est en effet possible que les difficultés rencontrées au cours des dernières étapes de la gamétogénèse puissent entraîner une résorption gonadique rapide de la cohorte de cellules de la lignée germinale, et une re-maturation d'une seconde cohorte, éventuellement d'un sexe différent. L'hypothèse d'une alternance rapide de phases de maturation-résorption gonadique chez les triploïdes tranche avec les descriptions précédemment publiées de la maturation des huîtres creuses diploïdes qui envisageaient plutôt la maturation continue d'une seule et même cohorte de cellules de la lignée germinale au cours d'un cycle de développement gonadique (Fabioux, 2004). Elle pourrait toutefois expliquer certains changements saisonniers de la sex-ratio observés y compris chez des lots d'huîtres diploïdes qui montrent parfois une plus forte proportion de mâles ou d'hermaphrodites en début de saison qu'à la fin (observé dans Enriquez-Diaz, 2004 ; Meisterzheim, 2008, Annexe I). Pour être testée, l'hypothèse d'une telle dynamique de gonadogénèse rapide nécessiterait toutefois un effort d'échantillonnage conséquent et à haute fréquence, ou (ce qui serait encore mieux) un suivi non-destructif. Ceci est malheureusement peu compatible avec les techniques classiquement utilisées pour l'étude de la reproduction de l'huître creuse.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les huîtres triploïdes présentent un développement gonadique perturbé dès les premières étapes de la maturation gonadique. Il semble pourtant qu'une majorité d'individus (mais pas la totalité) développe effectivement une proportion

significative de tissus gonadiques. La maturation des cohortes de cellules de la lignée germinale semble toutefois altérée y compris chez ces individus qui montrent de nombreuses cellules aux stades les plus précoces de maturation. La production finale de gamètes matures pourrait alors être conditionnée par le déclenchement de la résorption gonadique et sa dynamique, probablement dépendants des conditions environnementales.

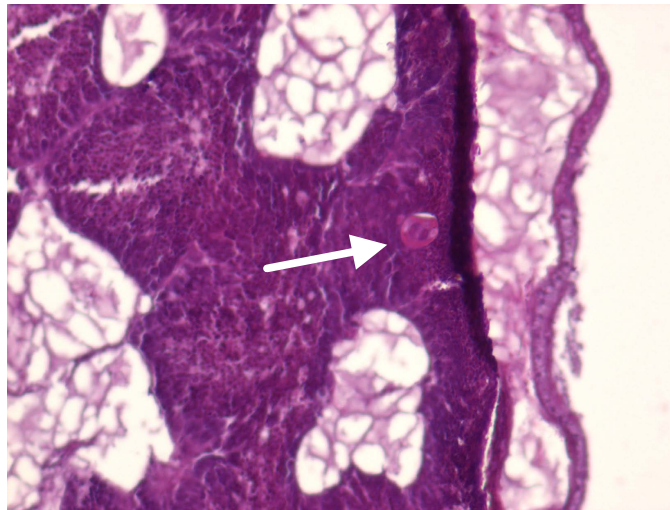


Figure 40 : Atrésie marginale observée chez un individu triploïde. La flèche pointe un ovocyte atreptique isolé au milieu d'un tissu gonadique mâle en cours de maturation.

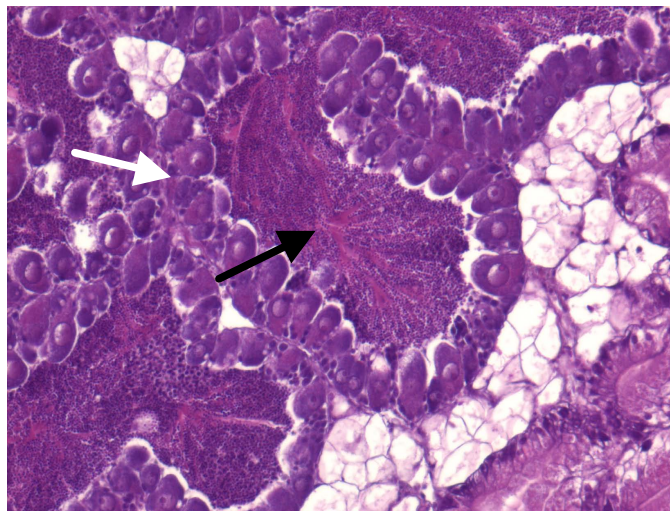


Figure 41 : Hermaphrodisme asynchrone observé chez un individu triploïde. La flèche noire pointe des spermatozoïdes matures, probablement en cours de résorption, au centre des follicules. La flèche blanche désigne la seconde cohorte de cellules de la lignée germinale femelle en cours de vitellogénèse en périphérie de ces mêmes follicules.

I.2. Déterminismes de l'allocation à la reproduction et à la croissance

I.2.a. Déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction

Nos résultats mettent en évidence l'existence d'une base génétique pour la variation de l'allocation à la reproduction chez les huîtres diploïdes et triploïdes. Lors de notre première étude (Chapitre II des Résultats), un déterminisme génétique modéré a été détecté pour l'allocation à la reproduction chez de très jeunes individus (5 mois). La décomposition de la variance phénotypique a montré des effets parentaux expliquant une part parfois élevée de la variance, mais peu significatifs. La corrélation détectée entre les performances moyennes des familles de $\frac{1}{2}$ frères 3nCB et 3nDT suggère également un effet génétique commun pour le déterminisme de l'allocation à la reproduction dans ces deux groupes. A l'inverse, le changement de l'ordre de rang des performances familiales moyennes détecté entre individus triploïdes et diploïdes traduit l'absence de corrélation génétique entre ces groupes d'individus. Notre expérimentation de sélection divergente (Chapitre III des Résultats) a montré quant à elle une réponse très nette de l'allocation à la reproduction mesurée chez des individus plus âgés à une sélection exercée sur le développement gonadique des géniteurs. Il faut noter que cette seconde expérience a été réalisée à partir des familles diploïdes de la première étude : l'apparente divergence dans nos résultats n'est donc pas due à une différence dans la variabilité génétique de ces deux populations. La réponse à la sélection observée montre qu'une pression de sélection exercée sur les géniteurs diploïdes peut entraîner une divergence pour ce caractère dans les descendances diploïdes et triploïdes. La répétabilité et la pertinence des paramètres génétiques estimés seront discutées en détail dans le paragraphe suivant, mais les très fortes valeurs d'héritabilité réalisée estimées suggèrent que le déterminisme génétique pour ce trait est relativement fort. L'observation d'une corrélation génétique 2n-3n observée dans notre seconde étude, mais pas dans la première, souligne l'importance des conditions environnementales sur l'expression de ce déterminisme génétique pour l'allocation à la reproduction des huîtres triploïdes.

L'existence d'un polymorphisme génétique pour la variabilité de l'effort de reproduction chez les huîtres diploïdes avait déjà été montrée précédemment (Ernande et al., 2004). Ce résultat peut paraître surprenant dans la mesure où l'effort de reproduction est un composant

déterminant de la fitness et devrait donc être soumis à une forte pression de sélection naturelle, conduisant à une réduction de la variabilité génétique pour ce caractère. Selon ces auteurs, l'existence d'une variabilité génétique pour ce trait résulte probablement d'un trade-off génétique entre effort de reproduction et survie : des pressions de sélection agissant en sens opposé maintiendraient ainsi la variabilité génétique pour ces deux traits en populations naturelles. L'hétérogénéité spatio-temporelle des pressions de sélection qui s'exercent chez cette espèce, dont l'introduction est relativement récente en Europe, contribue probablement également au maintien d'une variabilité génétique pour ce trait.

1.2.b. Triploïdie et déterminisme génétique de l'allocation à la reproduction

Lors de notre première étude (Chapitre II des Résultats), nous avons observé deux types d'interactions « triploïdie x génotype » différentes. La première a montré un changement de rang pour l'allocation à la reproduction entre familles diploïdes et triploïdes, tandis que la seconde traduisait une augmentation de la composante maternelle pour la variation de la masse de chair.

Le changement de rang observé pour les performances familiales moyennes entre individus triploïdes et diploïdes pourrait suggérer que la triploïdie a profondément influencé l'expression des valeurs génétiques parentales pour l'allocation à la reproduction lors de cette étude. De telles absences de corrélations génétiques entre individus diploïdes et triploïdes ont également été observées pour la croissance chez les salmonidés (Blanc et al., 2005, Bonnet et al., 1999) et pourraient découler d'une augmentation des effets génétiques non-additifs chez les néo-polyploïdes. D'autre part, il est également possible que le caractère phénotypique mesuré lors de notre première expérimentation (l'OG) ait en fait intégré deux traits différenciellement exprimés chez les individus diploïdes et triploïdes. Le décalage de maturité gonadique observé aurait ainsi pu conduire à générer des estimateurs génétiques pour l'allocation gonadique aux stades précoces de maturité chez les individus triploïdes, et pour des stades ultérieurs chez les huîtres diploïdes.

L'effet de la triploïdie sur le déterminisme génétique de l'allocation à la croissance semble assez différent de la réponse observée pour l'occupation gonadique. L'augmentation de la composante de la variance d'origine maternelle observée entre les lots 3nDT, 2n et 3nCB suggère un effet proportionnel à la contribution de la femelle au génome de la descendance.

Ce type d'interaction entre ploïdie et valeurs génétiques des géniteurs a déjà été documenté chez plusieurs espèces de salmonidés (Blanc et al., 2001 ; Blanc et al., 2005 ; Johnston et al., 2007) et traduit probablement l'additivité des valeurs génétiques maternelles. Une telle covariation génétique linéaire entre individus diploïdes et triploïdes suggère que pour ce trait, la réponse à la sélection d'individus triploïdes peut être augmentée selon la contribution du géniteur au génome des triploïdes. Une pression de sélection exercée sur les mâles tétraploïdes devrait ainsi s'avérer plus efficace pour l'amélioration génétique des huîtres 3nDT qu'une sélection exercée sur les femelles diploïdes, puisque les mâles contribuent plus au génome de la descendance. A l'inverse, la réponse à la sélection des huîtres 3nCB devrait être augmentée si l'effort de sélection est appliqué aux femelles qui contribuent pour 2/3 au génotype triploïde.

Remarquons enfin que certaines études précédentes (Guo et Allen, 1997 ; McCombie et al., 2005a) suggéraient que la méthode de production des géniteurs tétraploïdes aurait pu entraîner la sélection non-intentionnelle de génotypes triploïdes fertiles. Ainsi, les géniteurs tétraploïdes utilisés lors de notre première étude ont été initialement obtenus par le croisement d'une femelle triploïde et d'un mâle diploïde. La contribution génétique du géniteur triploïde est alors trois fois supérieure à celle du diploïde du fait de la méthode d'induction employée (rétention du premier globule polaire) (Guo et Allen, 1994). Ces tétraploïdes ont ensuite été reproduits entre eux au cours de plusieurs générations successives. L'implication initiale de géniteurs triploïdes fertiles lors de ce croisement aurait pu entraîner chez la descendance tétraploïde la sélection de caractères génétiques favorisant la maturation gonadique des triploïdes obtenus par croisement $4n \times 2n$. Aucune différence significative n'a cependant été détectée au cours de nos travaux entre l'allocation gonadique moyenne des huîtres triploïdes obtenues par induction chimique ou par croisement d'un mâle tétraploïde et d'une femelle diploïde. Ce résultat suggère que l'éventuelle sélection non-intentionnelle d'individus triploïdes fertiles n'a eu que peu d'effet sur l'allocation à la reproduction des triploïdes obtenus par croisement $4n \times 2n$.

1.2.c. Effets environnementaux et variabilité des paramètres génétiques

L'huître creuse est connue pour exprimer une grande plasticité phénotypique. La sensibilité de ses traits phénotypiques aux conditions environnementales affecte les paramètres génétiques associés de plusieurs manières. D'abord, des interactions Génotype x Environnement sont rapportées dans plusieurs études précédentes pour la survie, la croissance et l'effort de reproduction (voir Sheridan, 1997, Ernande et al., 2004, Degremont et al, 2007, Evans et Langdon, 2006). Ensuite, des différences d'environnement à très petite échelle (à l'intérieur d'une même structure d'élevage) semblent susceptibles d'influencer les performances de croissance (Sheridan et al., 1996 ; Sheridan 1997), et ces différences pourraient s'exprimer à long terme puisque le taux de croissance précoce semble être un bon prédicteur de la taille à 10 mois (Boudry et al., 2003). Ces effets se traduisent notamment par une augmentation de la variabilité phénotypique intra-groupe expérimental, et par une exacerbation des différences environnementales entre structures d'élevage. Ils découlent probablement de l'interaction de la compétition inter-individuelle pour l'espace et la nourriture d'une part (Sheridan et al., 1996 ; Sheridan 1997), et de la corrélation entre la taille et la capacité de filtration d'autre part. Plusieurs résultats présentés dans cette thèse suggèrent que les conditions environnementales ont influé fortement sur le développement gonadique observé, et ont affecté le déterminisme génétique observé.

Tout d'abord, les résultats de notre première expérimentation (Chapitre II des Résultats) suggèrent un effet de l'hétérogénéité environnementale intra-groupe sur la variabilité de l'allocation à la reproduction des huîtres diploïdes et triploïdes. La procédure d'élevage utilisée avait alors été choisie car elle permettait de calculer des estimateurs des déterminismes génétiques non-biaisés par un éventuel effet de la structure d'élevage, et de maximiser le nombre de familles impliquées dans les croisements. Il est cependant probable qu'elle ait également contribué à amplifier la compétition inter-individuelle et la variabilité phénotypique résiduelle due à des causes non-génétiques telles que l'accès à la nourriture.

L'absence de corrélation génétique observée entre huîtres diploïdes et triploïdes dans notre première expérimentation, et la détection d'une réponse corrélée à la sélection lors de la deuxième expérimentation illustrent également l'influence de l'environnement sur l'expression des déterminismes génétiques. Cette interaction environnementale résulte probablement des conditions expérimentales différentes rencontrées lors de ces deux études.

Les individus étudiés pour la réponse à la sélection étaient ainsi plus âgés que les huîtres échantillonnées lors de notre première étude et les procédures d'élevages adoptées étaient relativement différentes.

D'autre part, il est probable que la forte variabilité de l'allocation à la reproduction débouche sur des estimateurs particulièrement labiles des paramètres génétiques. Ainsi, l'estimation de la réponse à la sélection paraît très dépendante du niveau de maturité gonadique atteint par les individus à la date d'échantillonnage, du fait de la covariation de la dynamique de maturation et de l'intensité du développement gonadique (Chapitre III des Résultats). Le cycle de reproduction saisonnier de l'espèce implique également que l'allocation à la reproduction mesurée n'intègre la variabilité de l'effort de reproduction qu'au cours d'une seule saison de maturation, contrairement à la masse individuelle qui intègre la croissance au cours de toute la vie de l'animal. Cette différence d'échelle (temporelle) entre l'expression de ces deux traits phénotypiques suggère que le développement gonadique est probablement plus affecté par des variations discrètes des conditions environnementales que la masse des individus. Enfin, l'allocation à la reproduction des huîtres triploïdes apparaît particulièrement variable, comme nous le suggérons déjà dans les paragraphes précédents de cette discussion, et probablement plus affectée encore par les conditions environnementales que celle des diploïdes. Cette sensibilité accrue du trait étudié à l'environnement a probablement également contribué à la variation observée des paramètres génétiques entre les différentes expérimentations.

II. Perspectives

L'effort de reproduction important des huîtres creuses diploïdes résulte d'une stratégie d'histoire de vie sélectionnée au cours de l'évolution de l'espèce, ce trait étant un des composants majeur de la fitness. Dans le même temps, l'allocation à la reproduction ne participe pas directement au rendement de production pour l'ostréiculteur (qui intègre essentiellement la croissance et de la survie des adultes) sauf à considérer qu'elle conditionne la proportion commercialisée du naissain naturellement recruté. D'autre part, la moindre qualité gustative des huîtres à pleine maturité réduit l'intérêt lié à l'augmentation de l'indice de condition en période estivale. Les corrélations phénotypiques et génétiques négatives observées entre l'allocation à la reproduction et différents caractères phénotypiques liés à la survie et à la croissance suggèrent donc que l'important effort de reproduction de l'huître creuse constitue un caractère plutôt délétère pour l'éleveur. Les avantages induits par la triploïdie chez l'huître sont directement ou indirectement liés à la réduction du développement gonadique. Indirectement, celle-ci participe très probablement à l'augmentation de la croissance par le biais de la ré-allocation énergétique. Directement, la réduction du développement gonadique améliore la valeur commerciale pendant la période de maturation gonadique des diploïdes et limite très fortement la propagation des individus triploïdes dans les populations naturelles.

La variabilité du développement gonadique observée chez les huîtres triploïdes constitue un problème pour l'ostréiculture puisqu'elle va de paire avec la variation des qualités gustatives du produit. Il faut cependant mentionner que la nature diploïde ou triploïde des huîtres commercialisées est rarement indiquée (car non obligatoire) lors de la commercialisation. Le mélange (ou au moins l'absence de traçabilité) de ces deux types d'huîtres participe sans doute à augmenter l'hétérogénéité de la qualité des huîtres commercialisées. D'autre part, des émissions gamétiques spontanées dans l'environnement ont été observées chez ces individus triploïdes (Shpigel et al., 1992 ; Allen et Downing 1986 ; Allen et Downing, 1990 ; Gouilletquer et al., 1996 ; Annexe I), et ceci constitue actuellement un sujet de préoccupation croissante. En effet, les gamètes des triploïdes donnent naissance à une descendance constituée d'une grande quantité d'aneuploïdes totaux accompagnés de quelques individus diploïdes et polyploïdes. La faible viabilité des aneuploïdes en élevage larvaire laisse présager d'un risque relativement réduit de pollution génétique du naissain recruté. Il demeure toutefois que certains individus présentant des déviations légères de leur nombre de

chromosomes par rapport à la diploïdie ou à la triploïdie se sont avérés viables pendant plusieurs mois en conditions d'écloserie (Gong et al., 2004). Les conséquences de l'augmentation de la proportion d'huîtres triploïdes en élevage sur la quantité de naissain recruté et la surveillance dans l'environnement de la fréquence d'apparition d'aneuploïdes totaux pourraient donc constituer de futurs axes d'étude.

La sélection génétique d'individus diploïdes et/ou tétraploïdes présentant une allocation gonadique réduite pourrait également permettre de limiter le développement gonadique des triploïdes. Notons toutefois que les interactions détectées entre la composante génétique codant pour ce caractère, la triploïdie et l'environnement expérimenté par les individus encouragent une approche précautionneuse (et notamment des campagnes de testage multi-sites et pluri-annuelles) pour l'amélioration par sélection génétique de ce caractère chez les triploïdes.

En dépit de cette variabilité, la réduction de l'allocation moyenne à la reproduction est effective chez les huîtres creuses triploïdes, et les phénomènes de ré-allocation énergétique conditionnent probablement en grande partie la divergence phénotypique observée pour la croissance et la survie. La triploïdie est pourtant connue pour altérer profondément le phénotype exprimé à de nombreux niveaux : depuis l'expression des gènes jusqu'au gigantisme de certains types cellulaires. Elle est d'ailleurs létale chez la plupart des vertébrés. Chez l'huître, la triploïdie entraîne également une réduction drastique de la fitness due à la réduction de la fertilité de ces individus. L'induction de la triploïdie semble toutefois n'avoir que des effets positifs sur la croissance et la survie par le biais de la ré-allocation gonadique, et paraît à cet égard très bien tolérée par *Crassostrea gigas*. Une telle « canalisation » de la réponse phénotypique chez l'huître creuse, indépendante des perturbations « dose-dépendantes » induites, suggère l'existence de mécanismes de régulation puissants, capables de tempérer les effets délétères de la triploïdie sur la physiologie. L'étude de ces mécanismes constitue un champ d'investigation fondamental en biologie puisqu'ils sont probablement impliqués dans la variabilité entre espèces pour la tolérance à la polyploïdie. Comme l'écrit Mable (2004) « A somewhat more fruitful approach for understanding the limits to polyploidization is to ask: 'Why is polyploidy more common in some animal groups than in others?' ». Les travaux actuellement menés pour étudier le génome et le transcriptome de l'huître diploïde permettront très probablement l'identification de gènes marqueurs de la gamétogenèse (projet ANR « GametoGenes » en cours). L'utilisation de ces marqueurs chez les individus triploïdes devrait permettre d'identifier des perturbations de l'expression des

gènes telles que celles observées pour *Oryz* (Raguenès, 2006), susceptibles d'être impliquées dans la divergence phénotypique observée entre individus diploïdes et triploïdes.

Enfin, l'allocation à la reproduction est connue pour covarier chez les huîtres diploïdes avec de nombreux traits phénotypiques. Chez les triploïdes, il est probable que la réduction de l'allocation à la reproduction résulte en une « réduction » des trade-offs. La divergence phénotypique observée chez les huîtres triploïdes (c'est-à-dire l'amélioration de la croissance, et peut être de la survie) pourrait ainsi résulter de la ré-allocation énergétique vers ces deux traits. Il est donc probable que la variabilité du développement gonadique des huîtres triploïdes contrôle prioritairement l'allocation aux autres traits et aboutisse à la variation des traits phénotypiques. La quantification de l'effort de reproduction des triploïdes constitue donc une première étape de l'exploration de la réponse phénotypique multivariée des huîtres triploïdes. Nous devons insister ici sur la rareté des études disponibles s'intéressant à la caractérisation physiologique des huîtres triploïdes. Les données publiées suggèrent des budgets énergétiques équivalents ou peu différents entre huîtres diploïdes et triploïdes, et ne permettent donc pas d'expliquer les différences de phénotype exprimé.

Pour une première approche, nous avons testé l'influence de la diminution d'effort de reproduction observée chez les triploïdes sur la croissance. Nous avons utilisé pour ce faire un modèle écophysiological de type « DEB-huître » validé pour des huîtres diploïdes (Pouvreau et al., 2006, Bourlès et al., sous presse). Parcimonieusement, nous n'avons changé que le paramètre correspondant à la quantité d'énergie allouée à la reproduction, et nous l'avons diminué de 53 % conformément aux observations réalisées lors de notre première étude. D'après ces simulations, l'avantage à la croissance des triploïdes s'exprime après un épisode d'émission gamétique des huîtres diploïdes (Figure 42), ce qui est très cohérent avec les données publiées de la littérature, et les résultats obtenus chez les salmonidés. Les huîtres triploïdes qui investissent moins dans leur reproduction n'atteignent pas ici le seuil de remplissage gonadique déclenchant dans le modèle l'émission des gamètes, et ne perdent donc pas de poids lors de la fraie. Cette « économie » réalisée résulte en une croissance annuelle globalement accélérée, et accroît l'avantage des triploïdes pour les saisons ultérieures puisque les capacités de filtration, de prise alimentaire, et donc de croissance sont positivement corrélées avec la taille chez de jeunes individus. D'après la littérature, les performances de croissance semblent particulièrement améliorées par la triploïdie chez *Crassostrea gigas*, contrairement par exemple au cas des ormeaux chez qui la triploïdie ne se traduit pas par une amélioration sensible de la croissance. Il est possible que l'effort de reproduction particulièrement élevé des huîtres creuses diploïdes, se traduise chez les

triploïdes de cette espèce par un potentiel de ré-allocation énergétique d'autant plus élevé.

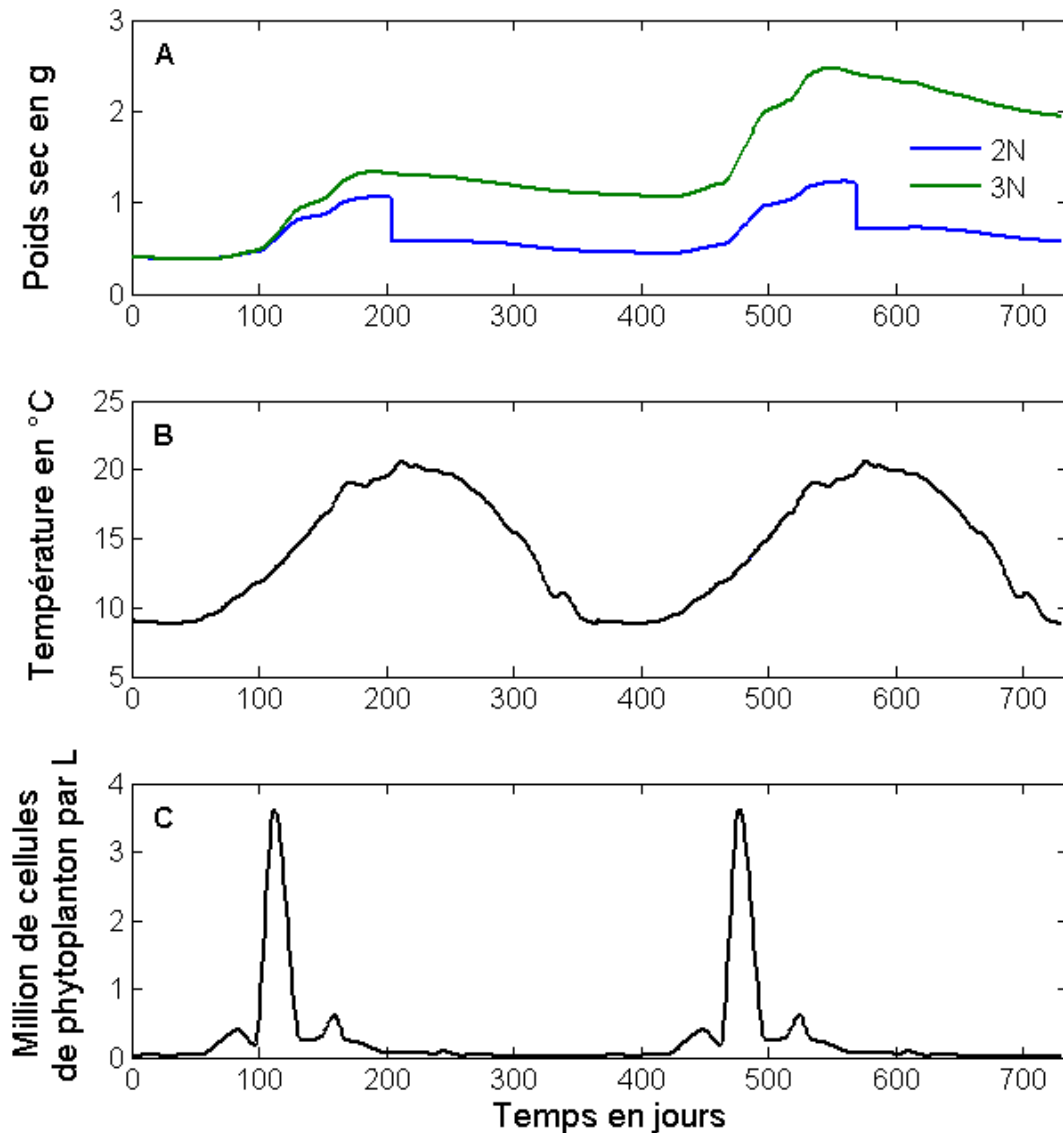


Figure 42 : A. Simulation de la croissance en masse fraîche d’huîtres diploïdes et triploïdes au cours de deux années réalisées à l’aide du modèle DEB-huître (Pouvreau et al., 2006 ; Bourles et al., sous presse). Seul le paramètre correspondant à l’effort de reproduction varie entre les modèles « huître 2n » (2N : courbe bleue) ($\kappa = 0.45$) et « huître 3n » (3N : courbe verte) ($\kappa = 0.71$). Les forçages utilisés pour la simulation sont figurés en B (Température en °C) et C (Nourriture : Million de cellules de phytoplancton / L) et correspondent aux valeurs mesurées au cours de l’année 2005 à Oléron, dupliqués pour les besoins de la simulation (I. Bernard, non-publié).

Remarquons ici que l'intensité du développement gonadique et le déclenchement ou non de l'émission gamétique conditionnent grandement les performances physiologiques des huîtres triploïdes. L'étude de l'influence des conditions environnementales sur le développement gonadique de ces individus constitue la prochaine étape pour appréhender pleinement la divergence phénotypique observée entre diploïdes et triploïdes. Le développement gonadique des huîtres diploïdes est en effet très dépendant des facteurs environnementaux, et il est probable que ce soit également le cas chez les huîtres triploïdes. Les travaux de Shpigel et al. (1992) ainsi que les nôtres (Annexe I) suggèrent par exemple que des températures élevées pourraient accélérer ou favoriser la maturation des huîtres triploïdes.

La résorption des tissus gonadiques non-émis par l'atrésie pourrait également contribuer à la ré-allocation énergétique. Il n'existe à notre connaissance aucune estimation publiée du rendement de celle-ci qui est certainement très inférieur à la ré-allocation directe. En effet, une part de l'énergie allouée à la reproduction est probablement dissipée sous la forme d'un coût de construction du tissu gonadique, tandis qu'une autre part est dépensée pour le transport et la conversion de l'énergie d'une forme de stockage à l'autre (Kooijman, 2000). Une étude précise des facteurs responsables du déclenchement de l'atrésie pourrait s'avérer riche d'enseignements, puisque la résorption conditionne l'accès des individus triploïdes à la maturité gonadique, et que son déclenchement est probablement dépendant des conditions environnementales.

La réduction du développement gonadique pourrait également se traduire par une meilleure survie des huîtres triploïdes aux phénomènes de mortalité estivale qui affectent *C. gigas* comme cela a été suggéré par différents travaux antérieurs. L'amélioration des performances de survie chez les triploïdes reportée dans la littérature semble toutefois modérée en général et n'est pas constante (Ascencio Michel, 2008). Remarquons que la variation de la survie des huîtres triploïdes intègre très probablement des composantes environnementales, physiologiques, et génétiques en plus des effets stricts de la ploïdie : l'analyse de la contribution de ces différents effets requiert donc des approches expérimentales précautionneuses considérant plusieurs variables physiologiques de l'hôte. Cette démarche a été employée lors de travaux réalisés parallèlement à cette thèse (Castagnet, 2008, thèse de Sophie De Decker en cours) et fera l'objet d'une publication à venir.

L'étude de la réponse multi-variée de la survie, l'allocation à la reproduction et à la croissance des lignées divergentes produites au cours de nos travaux constitue également une voie de recherche prometteuse pour la caractérisation de la divergence phénotypique entre huîtres diploïdes et triploïdes. Des analyses sont d'ores et déjà prévues pour étudier ces traits en

deuxième et troisième année de reproduction (2009-2010) (programme « OxyGenes », GIS Europôle Mer).

Annexe I



Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave

Julien Normand ^{a,b}, Marcel Le Pennec ^{b,1}, Pierre Boudry ^{a,c,*}

^a Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), Station de La Tremblade, Avenue du Mus du Loup, 17390 La Tremblade, France

^b Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Place Copernic, Technopole Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^c Ifremer - UMR M100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Technopole de Brest-Iroise, BP 70, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2007

Received in revised form 27 May 2008

Accepted 6 June 2008

Keywords:

Gametogenesis

Oyster

Crassostrea gigas

Triploidy

ABSTRACT

We compared the temporal dynamics of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) using histology. Oysters were reared in an estuarine farming site in Brittany over 3 years and their gametogenesis was monitored over the exceptionally hot summer of 2003. Both diploids and triploids showed active gametogenesis, but a high proportion of triploids remained at early stages of gonad development. Gametogenesis of triploids was characterized by the simultaneous occurrence of gonias and immature cytes together with mature gametes rather than overall retardation, though some triploids showed complete gonad maturation. Evidence of spawning was seen in both groups, and the quantity of germinal products emitted appeared to be similar in triploids and diploids, though triploids were much heavier than diploids. Our study supports previously reported experimental observations and suggests that gonad development in triploid Pacific oysters can be enhanced when these oysters are reared in the field under unusually warm conditions.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Genetic improvement of *Crassostrea gigas* through triploidy leads to faster growth (Nell and Perkins, 2005; Garnier-Géré et al., 2002) and reduced gametogenesis (Allen and Downing, 1986, 1990; Goulletquer et al., 1996). Faster growth rates have been reported for both chemically induced triploid oysters and those produced by diploid × tetraploid crosses. Triploid oysters appear to be at a particular advantage in sites with high trophic richness (Eudeline, 2004). It is very likely that the reduction in gametogenesis contributes directly to the faster growth of triploids compared to diploids, allowing a reorientation of the energetic allocation from reproduction to growth (Allen and Downing, 1986; Hawkins et al., 2000; Honkoop, 2003). The reduction of gametogenesis during the reproductive period also improves marketability of these oysters during the reproductive period (i.e. summer) and limits the propagation of these individuals in the natural environment. It should, however, be noted that triploidy is not considered as an efficient method of genetic confinement in

oysters (Anderson et al., 2004) since it only leads to partial sterility and because triploids can revert to a diploid stage (Allen et al., 1996, 1999).

Triploid oysters are only partially sterile and retarded gametogenesis of such oysters has been observed in both Humbolt Bay (USA) (Allen and Downing, 1990) and in Tasmania (Gardner et al., 1994). Guo and Allen (1994) estimated that relative fecundity of triploid females was around 2% of the level in their diploid control, with an average of 2.261 million stripped eggs per female in 2-year-old triploid oysters. Despite the lower reproductive potential of triploids relative to diploids, these authors noticed a high variation in reproductive effort between triploid females. While some triploid females had no mature oocytes, others had up to 21 million oocytes that was equivalent to the mean fecundity of the diploid female controls.

In diploid Pacific oysters, gametogenesis is under control of both exogenous signals from environment and endogenous physiological factors. Temperature and photoperiod drive the internal clock of Pacific oysters, while body condition also influences reproductive development via feedback from other metabolic compartments (Pouvreau et al., 2006; Fabioux et al., 2005; Enriquez-Díaz, 2004; Ren and Ross, 2001). Temperature has long been known as a major factor controlling gametogenesis (Mann, 1979; Chávez-Villalba et al., 2002a,b; Fabioux et al., 2005) and elevation of water temperature stimulates oocyte growth (Chávez-Villalba et al., 2002b). The effect of environmental factors known to control gametogenesis in diploid oysters should be considered in any

* Corresponding author. Ifremer, UMR M100 Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Technopole de Brest-Iroise, BP 70, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 2 98 22 44 02; fax: +33 2 98 22 46 53.

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

¹ New address: Laboratoire BIOTEM, Université de la Polynésie française, Tahiti, Polynésie Française.

study of gametogenesis in triploid oysters because effective gametogenesis can occur in triploid Pacific oysters and that individuals exhibit a high variation in reproduction effort.

Following the recent paper by Duchemin et al. (2007), focussing on seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, the present study further documents the temporal dynamics of gametogenesis in triploid oysters raised in an estuarine rearing site (Aber Belon, South Brittany, France). Our study was performed during the particularly hot and dry summer of 2003, which potentially favoured gametogenesis in triploid oysters.

2. Materials and methods

2.1. Biological material and sampling

Diploid oysters were collected from natural settlement and triploid oysters were purchased from a commercial hatchery thus representing the usual sources of these types of seed cultivated by oyster farmers in France. The triploid oysters had been produced by chemical induction using cytochalasin-B (Allen et al., 1989). Both groups of oysters were 3 years old at the beginning of the study (May 2003) and presented a very similar initial mean dry meat weight (DMW) (1.46 ± 0.44 and 1.56 ± 0.59 g for diploids and triploids respectively). Oysters were cultured in Aber Belon (South Brittany, France) following local practices, off-bottom, using iron frames ('tables') onto which the oyster mesh bags are attached (Fig. 1). More than fifty individuals from each of the groups were randomly sampled from a very large number of commercially farmed oysters twice a month during the intensive gonad maturation period (i.e. from May to July), then monthly from August 2003 to April 2004.

2.2. Environmental monitoring

Environmental monitoring was performed during the sampling period by a temperature sensor localized in Riec-sur-Belon close to the farming site where the experimental oysters were reared. The relevant dataset was extracted from the Quadrigé database developed by Ifremer (<http://www.ifremer.fr/delao/francais/valorisation/quadrige/index.htm>) and reflected the exceptional heat experienced in the study area in summer 2003 and its effect on seawater temperature.

2.3. Biometrical measures

Dry meat weight and shell weight of 30 individuals randomly sampled out of the 60 oysters from each group (diploid and triploid) were measured to estimate their Walne and Mann condition index (C.I.):

$$C.I. = (\text{dry meat weight} \times 1000) / \text{shell weight.}$$

Individual shell weight was checked to insure that no significant difference in flesh or shell growth could reveal a sampling bias.

2.4. Ploidy analysis

Chemical induction of triploidy rarely produces 100% triploid batches (Allen et al., 1989). In order to determine the ploidy of individual oysters sampled in the triploid group and exclude diploid individuals from further histological analyses, up to thirty oysters from this group were individually tested by flow cytometry using the propidium iodide method, as described by Utting and Child (1994), until twenty triploid oysters were obtained for histology.

2.5. Histological analysis and cell diameter measurement

At each sampling point, 20 individuals per group were sampled following the ploidy analysis for histological analysis. A piece of the visceral mass was placed in Bouin's fixative for 48 h before routine histological processing. Paraffin embedded pieces of tissue were cut into 5 μm sections and then coloured with Masson trichrome.

C. gigas is normally a protandrous alternate hermaphrodite. Microscope observation allowed us to classify individuals as males, females or undetermined. Reproductive stage was determined following a qualitative classification (5 stages: 0 to 4) adapted from Mann (1979) and Lango Reynoso et al., (2000) (Table 1). These guidelines were based on those originally described for *Crassostrea virginica* (Kennedy and Battle, 1964 in Mann, 1979).

In order to describe female reproductive stages more precisely, the diameter of germinal cells (Lango Reynoso et al., 2000) was measured for 60 cells per female on 10 randomly sampled females of each group in June 2003. Histological slides were observed under a microscope at 100 \times and pictures were recorded with a digital camera (Sony). The pictures were then processed on a Silicon Graphics station using Visilog



Fig. 1. Localization of the sampling site.

Table 1
Classification of reproductive stages based on Mann (1979) and Lango Reynoso et al., (2000)

Stage	Histological description
0 (resting stage)	No trace of sexuality; follicles are non-existent or elongated and consist of undifferentiated germinal epithelium.
1 (early growth stage)	Follicles are small and isolated with numerous spermatogonia or oogonia.
2 (late growth stage)	Follicles are actively developing with primary gametocytes and some free (secondary) spermatozoa and oocytes.
3 (mature)	Near ripe or ripe follicles, densely packed with maturing gametes; presence of mature gametes.
4 (spawning and reabsorption stages)	Follicles distended, numerous gametes remain.

5.1 Software. Cell diameter was measured on cells displaying a well defined germinal vesicle, so as to ensure that the section passed through their centre (Lango Reynoso et al., 2000). The surface of each cell was measured by drawing its diameter on the digital picture in order to calculate its theoretical circular diameter in pixels, and these were then transformed to millimetres following a standard calibration procedure.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were computed using Systat 9. Analysis of frequencies and percentages were treated using Fisher exact tests (two-tails), as described by Sokhal and Rohlf (1995). Comparisons of CI and DMW were made using ANOVA, after testing for normality of the dataset with the Levene preliminary test (ANOVA on the absolute values of the residuals, SPSS Inc. 1999). Kruskal–Wallis non-parametric tests were used to compare the germline cell diameters between ploidy groups where the assumption of equal variances was violated (Sokhal and Rohlf, 1995).

3. Results

3.1. Seawater temperature

The summer of 2003 was the hottest on record throughout much of Europe (Black and Sutton, 2007). As illustrated in Fig. 2, the temperature of sea water recorded in 2003 at Belon–Rosbraz (i.e. very close to our study site) was higher than usual. Mean water temperature in August reached 22.4 °C and was above 16 °C (considered as the lowest temperature in which a complete maturation can be observed) (Chávez-Villaiba et al., 2002b) from June to early September.

3.2. Temporal dynamics of sex ratio

The temporal dynamics of sex ratio were similar in the two groups (Fig. 3). Both diploid and triploid oysters showed high rates of sexuate

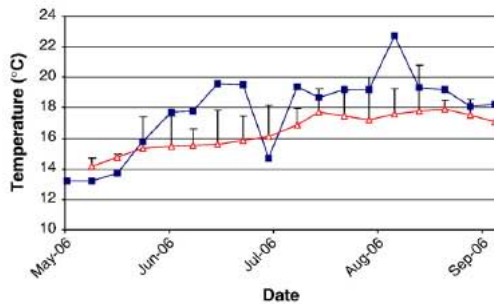


Fig. 2. Seawater temperature in 2003 (■) and mean and the coefficient of variation for 1994–2002 (Δ).

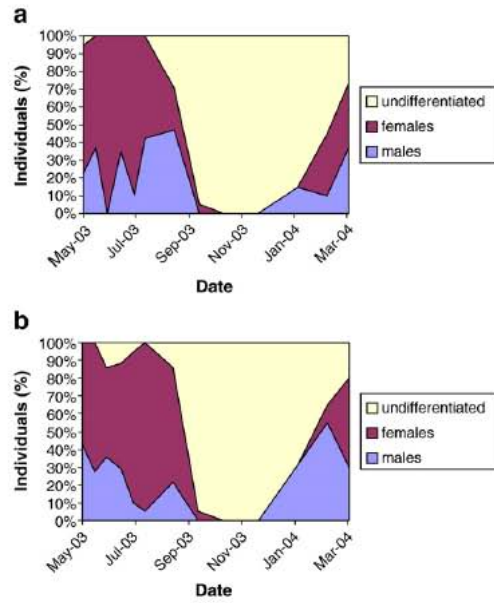


Fig. 3. Percentage of males, females and undifferentiated individuals from May 2003 to March 2004 in the diploid (a) and triploid (b) groups (n=20 individuals/group/sampling point).

individuals from May to September 2003. A resting period (September to December 2004) of low sexual activity followed this period and a new gemetogenic cycle started in January 2004. The percentage of

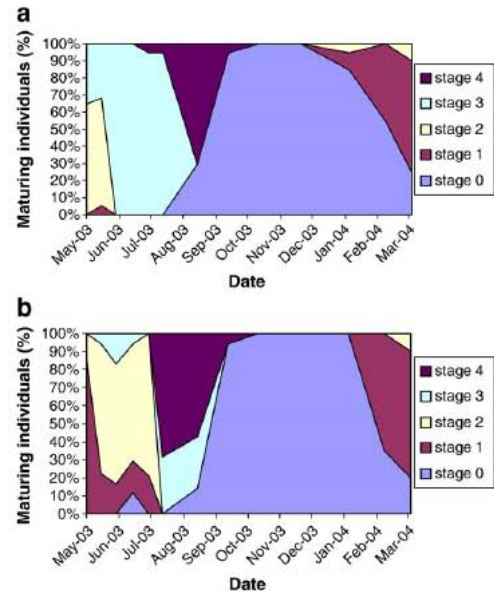


Fig. 4. Percentage of individuals observed at stages 0 (resting stage) to 4 (spawning and reabsorbing stages) from May 2003 to March 2004 in the diploid (a) and triploid (b) groups (n=20 individuals/group/sampling point). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

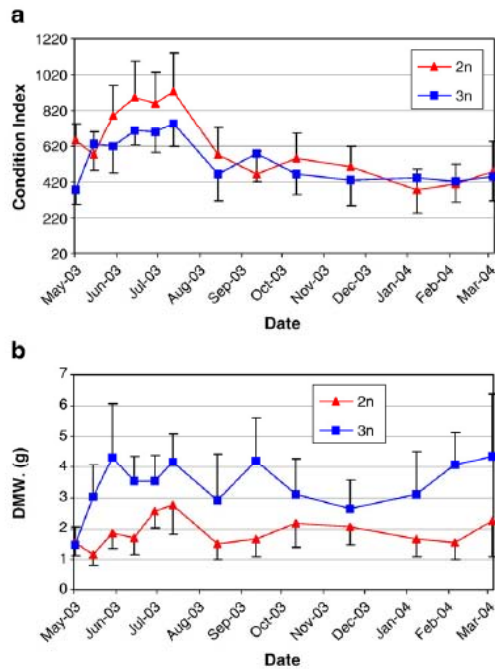


Fig. 5. Mean and coefficient of variation of (a) condition index and (b) dry meat weight (in grams) of diploid (red triangles) and triploid (blue squares) oysters from May 2003 to March 2004 ($n=30$ individuals/group/sampling point). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

sexually differentiated individuals was not significantly higher in diploid oysters than in triploids over the total sampling period (68% in the diploids v. 63% in the triploids).

There were no significant differences in mean sex ratio when considering the whole study period, but diploid oysters included a higher percentage of males in summer 2003 (33 versus 15.7%; $P<0.05$; between July 2nd and September 1st) whereas the triploid group had more males in winter 2004 (16 versus 43%; $P<0.0001$; between January 26th and March 22nd).

3.3. Temporal dynamics of gonad stages

The temporal dynamics of the percentage of individuals at the 5 defined reproductive stages (Table 1) is presented in Fig. 4. Although the general gonad maturation dynamics were simultaneous for the two types of oyster, triploids showed significantly higher percentages of individuals at early stages of gametogenesis during spring and summer 2003. Indeed, stages inferior to 3 (premature) represented 68.7% in diploids but 92.2% in triploids during spring ($P<0.0001$), and 6.7% versus 53.6% in summer ($P<0.0001$). Surprisingly, a high proportion of triploids reached stages of maturation characterized by the presence of mature gametes. In July, 78.9% of the triploid oysters simultaneously showed gonias, maturing gametocytes and variable proportions of fully matured spermatozooids or oocytes (stage 2) whereas 95% of the diploid oysters were at stage 3.

In the triploid group, between mid-July and early August, the percentage of maturing oysters (stage 2) decreased, only a few reached stage 3, and a majority of individuals (68%) were found to be at stage 4 (reabsorbing stage). At this period, only a few diploids (5%) were at stage 4.

Between August and September, the two groups included both ripe and spent individuals (stages 3 and 4), but by the end of September no individuals were found at the mature, pre-spawning stage. As expected, sexual activity was low in winter (i.e. samples were characterized by the predominance of stage 0) and a new reproductive cycle began as early as January 2004 for both groups.

3.4. Condition index evolution and growth

Whereas both groups showed similar DMW in May 2003, triploid oysters later reached significantly higher values ($P<0.0001$) after a strong increase between May and June 19th. The differences between the two groups for DMW diminished and were not significant between June 2nd, and June 16th. This could correspond to partial spawning during this period, whereas the decrease recorded in August is related to the mass spawning detected by the analysis of the temporal CI changes. Finally, DMW of triploid oysters decreased from 4.2 ± 1.40 g in October to 2.63 ± 0.94 g in December and then increased to reach 4.35 ± 2.05 g in March 2004. Between November and February, DMW of diploid oysters decreased from 2.17 ± 0.77 g to 1.57 ± 0.56 g before increasing to 2.26 ± 1.17 g in March. Although the high temporal variation in DMW and the relatively short length of our study do not allow us to build a growth model capable of comparing growth rate between the two groups, triploid oysters did show a higher growth potential. Triploid oysters showed an increase of 2.9 g of their mean DMW between May 2003 and March 2004, compared with an increase of only 0.7 g in diploid oysters.

As expected, the condition index (CI) of diploid oysters increased in spring during their gonad maturation (Fig. 5a). A similar trend was also

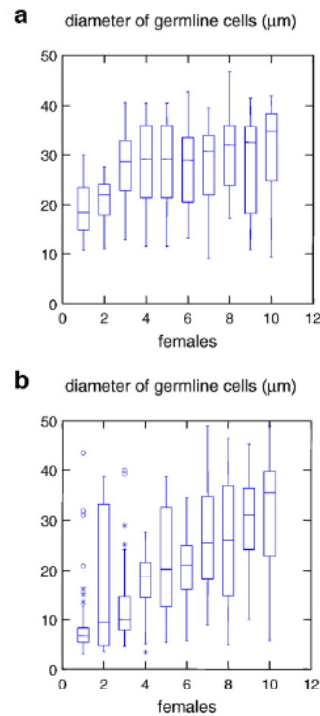


Fig. 6. Within-individual variation of the diameter of the oocytic germline cells, sized for ten individuals in June (a) in diploids and (b) in triploids.

observed in triploid oysters. Mean CI was only significantly higher in diploids than in triploids between May and September (812.6 ± 231 in diploids versus 651.6 ± 155 ; $P < 0.05$). Following this period, CI decreased to 459.2 ± 131 and 578.6 ± 155 in diploid and triploid oysters respectively. This decrease of CI is characteristic of spawning. Histological analysis also revealed signs of spawning and germ cell resorption.

Although meat weight was not significantly different between the two groups in May 2003 (Fig. 4b) (1.56 ± 0.44 g in diploid versus 1.46 ± 0.59 g in triploid oysters; $P > 0.05$), shell weight of triploids was heavier than that of diploid oysters (40.53 ± 9.48 g versus 24.17 ± 6.12 g; $P < 0.0001$) which suggests that allocation to shell growth could be higher in triploid oysters. This particular pattern of energy allocation was previously observed by Landau and Guo (1999) and Scarpa et al. (1996), and strongly contributed to the reduction of CI in triploids compared with diploid oysters.

3.5. Diameter of oocytic germline cells

Measurement of cell diameter of the oocytic germ cells revealed some differences in gonad maturation between diploid and triploid oysters in the first sampling in June 2003 (Fig. 6). Average diameters were lower in triploid females ($P < 0.0001$), with a mean of 21 ± 12 versus 27 ± 8 μm in diploids (Fig. 5) because of retarded maturation. According to Lango Reynoso et al. (2000), this range of values, represents coexistence of mature oocytes with germline cells in oogenesis and vitellogenesis in the follicles, and is characteristic of early vitellogenesis. Variation in the cell diameters was however much greater in triploid females than in diploids ($P < 0.0001$), revealing a more heterogeneous size distribution.

4. Discussion

4.1. Comparative temporal dynamics of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters

Our results suggest that the initiation of gametogenesis was simultaneous in triploid and diploid oysters. Histological analyses show that the proliferation of gonias (stage 1) began as early as December 2003 in the two groups (Fig. 4). The percentage of sexually differentiated individuals was higher in triploid than in diploid oysters in January 2004 (65% versus 45% respectively, non-significant difference). The observed dynamic of gametogenesis of the diploid individuals was very similar to the one described by Enriquez-Diaz (2004) for diploid oysters in Marennes-Oleron Bay France). Despite the fact that the first steps of gametogenesis appeared to be normally induced in triploids, the next stages were characterized by incomplete maturation with a high level of inter- and intra-individual variation. First, some triploid oysters presented retardation of the gametogenesis, remaining at early stages of maturation at a time when all diploid oysters had reached full gonad maturation (in June 2003, 17% of the triploids were at stage 1 whereas 100% of the diploids were at stage 3). Second, the majority of the ripening triploid oysters simultaneously showed gonias, maturing gametocytes and variable proportions of fully matured spermatozooids or oocytes, exhibiting high intra-individual variation. Third, gametogenesis of some triploid oysters (5.6% in June, to 31.6% in August) led to complete maturation of all their germline cells (i.e. stage 3). Finally, both diploid and triploid oysters showed evidence of spawning. Our results suggest that most triploid oysters show normal gametogenesis at the early stages (i.e. the proliferation of gonias at the beginning of the annual reproductive cycle) but not at later stages.

It remains unclear whether the long term persistence of gonias and immature cytes in triploid oysters was the result of temporal heterogeneity in maturation of primary germ cells within a single cohort or if this resulted from several successive cohorts of germ cells (see Fabioux et al., 2004 for diploid oysters). As early gametogenesis

seemed to occur normally in these individuals, the partial sterility of triploid oysters may be a result of perturbation occurring during the differentiation of gonias to cytes.

The qualitative descriptors of gonad maturity used in the present study allowed us to compare the temporal dynamics of gonad maturation between diploid and triploid individuals; however, the use of these descriptors in triploid oysters raises some questions. The classification of reproductive stages was initially developed in *C. gigas* by Mann (1979). The classes were intended to describe gonad maturation of diploid bivalves in which the ultimate stage of gametogenesis is stage 3, characterized by the maturity of a high proportion of germ cells. Triploid oysters rarely reach stage 3, and early germline cells were found in the gonad tissues over a much longer period than in diploids. This suggests that the observed irregular gametogenesis, leading to a partial development of germ cells, is characteristic of the gametogenesis of triploid oysters. Our data also suggests that spawning can be observed in maturing triploids if the proportion of mature gametes is sufficient, even if some gonias or immature cytes subsist in the reproductive tissues (and led to the determination of stage 2 for these individuals). Consequently, stage 3 should not be considered as the ultimate stage of gonad maturation in triploid oysters because spawning is possible without reaching this stage.

Due to limited sample size, temporal variations of sex ratio along the reproductive period cannot be precisely described in our study. It is however of interest to highlight the overall similarity in sex ratio between the diploid and triploid groups (Fig. 2). The absence of hermaphroditic triploid individuals, unlike previously reported (15% in Allen and Downing, 1990; 29% in Guo and Allen, 1994), might be related to the unusually high reproductive allocation observed in the triploid oysters in our study.

4.2. Effect of environmental conditions on maturation of triploid oysters

Temperature has been demonstrated to play a major role not only in the induction of gametogenesis but also in oocyte growth rate (i.e. the dynamics of maturation, Chávez-Villalba et al., 2002b). It is therefore likely that the exceptionally high water temperatures recorded during summer 2003 could have enhanced the reproductive effort in triploids by allowing an unusually high percentage of premature individuals to reach complete gonad maturation. This hypothesis could explain the high percentage of mature triploid oysters observed in our study, and is fully consistent with the results published by Shpigel et al. (1992), who showed that triploid *C. gigas* can achieve a full gametogenic cycle at elevated temperature (87% of their triploid individuals were either spawned out or undergoing resorption after a 35-day exposure period at 30 °C). The elevated temperatures of summer 2003 might not, however, be the only factor responsible for the very high proportion of ripening triploid oysters. In fact, triploid Pacific oysters are commonly cultured in areas warmer than South Brittany in other parts of the world, such as Australia and North America (Nell, 2002) without evidence of maturation such as that we describe here (Nell and Perkins, 2005; Allen and Downing, 1990). The high phytoplankton productivity of our study site could also have favoured the phenomenon, but more studies are needed to further examine the relative importance of environmental factors.

4.3. Reproductive allocation in triploid oysters

The hypothesis that triploid oysters we monitored spawned during summer 2003 is supported by the strong decrease of their condition index and the observation of post post-spawning histological stages. Previous authors have reported spontaneous emissions of gametes by triploid oysters (Gouletquer et al., 1996; Shpigel et al., 1992; Allen and Downing, 1990), but this phenomenon remains poorly documented for oysters in natural conditions. Although our results are limited by

the lack of quantitative data, the amount of emitted gametes inferred by the decrease in condition index was surprisingly high for triploid oysters. In our study, the presumed spawning corresponded to an average mass of 1.24 g of gametes per oyster, which represents a loss of 30% of the Dry Meat Weight (versus 1.22 g or 44.4% of DMW for the diploid oysters). The mean quantity of gametes emitted would therefore have been similar for the two groups, but it should be underlined that the triploid individuals were considerably heavier than the diploids (Fig. 5b). We can therefore assume that triploid oysters would have shown a lower mean gamete production than diploid oysters at the same total size. In any case, our results suggest a much higher allocation to reproduction by triploid oysters than previously published studies: Guo and Allen (1994) and Gong et al. (2004) obtained estimates of 2% and 13.4% respectively for total egg number produced by triploid compared to diploid oysters.

4.4. Triploidy and genetic confinement of oysters

The viability of the progeny of triploid oysters has been studied by crossing triploid genitors with diploid and triploid individuals. Gametes from triploids appeared to be fully viable but the progeny resulting from these crosses was mostly composed of aneuploids with a very low viability (Guo and Allen, 1994; Gong et al., 2004). Diploid, triploid and tetraploid offspring were also found in the progeny of these crosses (Guo and Allen, 1994). Overall, the viability of the progeny of triploid oysters was very low relative to diploids, ranging from 0.007 to 0.314%, respectively for diploid (female)×triploid (male), and triploid (female)×diploid (male) crosses (Gong et al., 2004). These studies suggest that the potential for triploid *C. gigas* to produce viable progeny in the wild is low but not null. The relative fitness of triploid individuals is obviously much lower than that of diploids, essentially because of the aneuploid nature of most of their progeny. Thus, triploidy should not be considered as a mean of genetic confinement in that species.

Acknowledgements

The authors thank Jean-Claude Martinez, Alain Le Mercier, Christian Tartu and Alain Marhic, for the support they provided during the sampling. They are grateful to Yves-Marie Paulet, Denis Saulnier, Arnaud Huvet, Caroline Fabioux and Sophie De Decker for their helpful comments on this manuscript and to Stephane Guesdon for providing the environmental monitoring data. We are indebted to Helen McCombie for her help with English language editing. This work was supported by the CONCHPOL/RITMER (02 G 0534) grant, funded by the Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation Nationale et de la Recherche (MJENR).

References

- Allen Jr, S.K., Downing, S.L., 1986. Performance of triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 102, 197–208.
- Allen, S.K., Downing, S.L., Chew, K.K., 1989. Hatchery Manual for Producing Triploid Oysters. University of Washington Press, Seattle, Washington, USA. 27 pp.
- Allen Jr, S.K., Downing, S.L., 1990. Performance of triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*: gametogenesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1213–1222.
- Allen Jr, S.K., Guo, X., Burreson, G., Mann, R., 1996. Heteroploid mosaics and reversion among triploid oysters, *Crassostrea gigas*. Fact or artifact. *J. Shellfish Res.* 15 (2), 514 (abstract).
- Allen Jr, S.K., Howe, A., Gallivan, T., Guo, X., Debrosse, G., 1999. Genotype and environmental variation in reversion of triploid *Crassostrea gigas* to the heteroploid mosaic state. *J. Shellfish Res.* 18 (1), 293 (abstract).
- Anderson, J., Hedgecock, D., Berrigan, M., Criddle, K., Dewey, B., Ford, S., Gouletquer, P., Hildreth, R., Paoletto, M., Targett, N., Whotlatch, R., 2004. Nonnative oyster in Chesapeake Bay. Committee on Nonnative Oysters in the Chesapeake Bay, Ocean Studies Board Division on Earth and Life Studies, National Academies Press, 344 pp.
- Black, E., Sutton, R., 2007. The influence of oceanic conditions on the hot European summer of 2003. *Clim. Dyn.* 28 (1), 53–66.
- Chávez-Villalba, J., Barret, J., Mingant, C., Cochard, J.-C., Le Pennec, M., 2002a. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. *Aquaculture* 210, 171–186.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J.-C., Le Pennec, M., 2002b. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture* 214, 115–130.
- Duchemin, M.B., Fournier, M., Auffret, M., 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 264, 73–81.
- Eudeline, B., 2004. La tétraploidie chez les Mollusques Bivalves: Application à la production de triplétoïdes chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Etude comparée de la gamétogenèse et des métabolismes associés chez les diploïdes, triplétoïdes et tétraploïdes. PhD thesis. Université de Rennes I, 183 p.
- Enriquez-Diaz, M.R., 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. PhD thesis. Université de Bretagne Occidentale, 193 p.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250, 458–470.
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., Huvet, A., 2004. The oyster *vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 897–904.
- Gardner, N.C., Smith, M.S.R., Maguire, G.B., Kent, G., Nell, J.A., 1994. Studies on triploid oysters in Australia: III. Gametogenesis of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Tasmania. In: Nell, J.A., Maguire, G.B. (Eds.), Evaluation of triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) and Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) on commercial leases in New South Wales and Tasmania. Final Report to FRDC, September 1994, NSW Fisheries, Port Stephens Research Centre, Taylors Beach, NSW and University of Tasmania, Launceston, Tas, pp. 178–193.
- Garnier-Géré, P., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Héral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A., Gérard, A., 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol. Ecol.* 11, 1499–1514.
- Gong, N., Yang, H., Zhang, G., Landau, B.J., Guo, X., 2004. Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Heredity* 93, 408–415.
- Gouletquer, P., Joly, J.-P., Gérard, A., Le Gagneur, E., Moriceau, J., Peignon, J.-M., Heurtebise, S., Phélipot, P., 1996. Performance of triploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem: survival, growth and proximate biochemical composition. *Haliotis* 25, 1–12.
- Guo, X., Allen Jr, S.K., 1994. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Biol. Bull.* 187, 309–318.
- Hawkins, A.J.S., Magoulas, A., Héral, M., Bougrier, S., Naciri-Graven, Y., Day, A.J., Kotoulas, G., 2000. Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet. Res. Camb.* 76, 273–284.
- Honkoop, P.J.C., 2003. Physiological costs of reproduction in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. How expensive is reproduction? *Oecologia* 135, 176–183.
- Landau, B., Guo, X., 1999. Growth characteristics in triploid Pacific oysters – a new dimension. *J. Shellfish Res.* 18, 270–271.
- Lango Reynoso, F., Chavez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 190, 183–199.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 59, 95–110.
- Nell, J.A., Perkins, B., 2005. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port-Stephens, New South Wales, Australia. *Aquacult. Res.* 36, 530–536.
- Nell, J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210, 69–88.
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., Alunno-Bruscia, M., 2006. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *J. Sea Res.* 56 (2), 156–167.
- Ren, J.S., Ross, A.H., 2001. A dynamic energy budget model of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecol. Model.* 142, 105–120.
- Shpigel, M., Barber, B.J., Mann, R., 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161, 15–25.
- Scarpa, J., Sturmer, L., Quesenbury, E., Longley, R., Vaughan, D., 1996. Performance of triploid oysters *Crassostrea virginica*, grown by project OCEAN participants. *J. Shellfish Res.* 15, 512–513.
- SPSS Inc., 1999. SYSTAT® 9 Statistics I. SPSS Inc., 660 pp.
- Sokal, R.R., Rohlf, J.F., 1995. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research, third edition. W.H. Freeman and company, 887 pp.
- Utting, S.D., Child, A., 1994. Genetic manipulation of the Manila clam (*Tapes philippinarum*) using cytochalasin B to induce triploidy. *Aquaculture* 44, 133–144.

Annexe II

Valorisation des travaux de thèse

Publication

Normand J., Ernande B., Haure J., McCombie H., Boudry P. accepté pour publication dans Aquatic Biology le 11 octobre 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of intensively reared 5-month-old diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction.

Présentations orales

Septembre 2009:

ICSR (12th International Congress of Shellfish Restoration – Charlottetown, Prince Edward Island, Canada) **Présentation orale:** Normand J., Ernande B., Haure J., Boudry P. Genetic basis of the variation of gonad development in diploid and triploid Pacific oysters.

Mars 2009: Annual Meeting and Technical Workshop of the National Reference Laboratories for Mollusc Diseases –(La Tremblade, France). **Présentation orale:** De Decker S., Normand J., Castagnet S., Haffner P., Boudry P., Saulnier D. What's new between *Vibrio* and *Crassostrea gigas* ?

Septembre 2008: Physiomar08 (Physiological aspects of reproduction, nutrition and growth "Marine molluscs in a changing environment"– Brest, France).

Présentation orale: Normand J., Ernande B., Boudry P. Genetic basis of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*.

Présentation orale: Fabioux C., Fleury E., Normand J., Quilien V., Boudry P., Huvet A. The partial sterility of triploid oysters investigated at cellular and molecular levels.

Novembre 2007: ICSR (10th International Congress of Shellfish Restoration – Vlissingen, Netherlands). **Présentation orale:** Normand J., Huvet A., Fabioux C., Ragenès M. Physiological and molecular basis of gametogenesis in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*.

Novembre 2006: Physiological aspects of reproduction and nutrition in Mollusks (La Paz, Mexico). **Présentation orale:** Boudry P., Degrémont L., Bédier E., Pouvreau S., Normand J., Ernande B. Genetic variation and trade-offs for reproduction and survival in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

Mars 2006: Groupe de Recherche "Ecophysiologie de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* » Ifremer-LEMAR. **Présentation orale:** Normand J., Boudry P. Perspectives à l'étude des bases Génétiques et Ecophysiologiques de l'allocation à la reproduction des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) triploïdes.

Posters

Mai 2009 : ICPHB (International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, St-Malo). **Poster:** Normand J., Ernande B., Boudry P. Phenotypic and genetic analysis of the variation in reproductive effort of triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*).

Novembre 2007 : Vibrio 2007 (Meeting Pasteur Institute, 28-30 Novembre 2007, Paris). **Poster :** De Decker S., Normand J., Dupertuy M., Boudry P., Saulnier D. Modulations of the interactions between pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* and *Vibrio* according to bacterial virulence and to genetic and physiological status of the host : Methodology and first results

Références

- Akashige S., 2005. History, current state, and the future of oyster cultivation in Hiroshima Prefecture UNITAR Hiroshima Office for Asia and the Pacific, Series on Sea and Human Security *Training Workshop on Food Security* 26 to 30 September, 2005 Hiroshima, Japan.
- Allen SK., Stanley JG., 1978. Reproductive sterility in polyploid brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Trans Am Fish Soc*, 107: 474-478.
- Allen SK., Hidu H., Stanley JG., 1986. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol Bull*, 170(2): 198-210.
- Allen SK., Downing SL., 1986. Performance of Triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), I., Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J Exp Mar Biol Ecol*, 102: 197-208.
- Allen SK., Downing SL., Chew KK., 1989. *Hatchery manual for producing triploid oysters*. University of Washington Press (ed), Seattle, Washington, USA, 27 p.
- Allen SK., Downing SL., 1990. Performance of Triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* : Gametogenesis. *Can J Fish Aquat Sci*, 47: 1213-1222.
- Allen SK., Guo X., 1996. Triploids for biological containment. The risk of heteroploid mosaics. Dans: Proceedings of the third international conference on risk assessment methodologies. Levin et al. (ed.). Available via <http://www.nbiap.vt.edu/brarg/brasym96/allen96.htm> (accédé le 08/01/09).
- Allen SK., Downing SL., 1997. Consumers and "experst" alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793). *J Shellfish Res*, 10(1): 19-22.
- Allen SK., Howe A., Gallivan T., Guo X., DeBrosse G., 1999. Genotype and environmental variation in reversion of triploid *Crassostrea gigas* to the heteroploid mosaic state. *J Shellfish Res*, 18: 293.
- Amemiya I., 1929. On the sex changes of the Japanese Common Oyster, *Ostrea gigas* (Thunberg). *Proc Imp Acad Tokio*, 5: 284-286.
- Amiard JC., Perrein-Ettajani H., Gérard A., Baud J.P., Amiard-Triquet, C., 2005. Influence of ploidy and metal-metal interactions on the accumulation of Ag, Cd, and Cu in oysters *Crassostrea gigas* Thunberg. *Arch Environ Contam Toxicol*, 48: 68-74.
- Arnaud-Haond S., Vonau V., Rouxel C., Bonhomme F., Prou J., Goyard E., Boudry P., 2008. Genetic structure at differential spatial scales in the pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) in French Polynesian lagoons: beware of sampling strategy and genetic patchiness. *Mar Biol*, 155: 147-157.
- Ascencio Michel R., 2008. Analisis comparativo del crecimiento y superviviencia del ostion *Crassostrea gigas* diploide y triploide en diferentes medios ambientes del noroeste mexicano. Thèse de l'Université de Basse Californie – La Paz, Mexique, 89 p.

- Auger DL., Dogra Gray A., Ream TS., Kato A., Coe EH., Birchler JA., 2005. Nonadditive gene expression in diploid and triploid Hybrids of Maize. *Genetics*, 169: 389-397.
- Bacca H., Huvet A., Fabioux C., Daniel JY., Delaporte M., Pouvreau S., Van Wormhoudt A., Moal J., 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comp Bioch Physiol B*, 140:635-646.
- Bacher C., Baud JP., 1992. Intensive rearing of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in an upwelling system: optimization of biological production. *Aquat Living Resour*, 5: 89-98.
- Baghurst BC., Mitchell JG., 2002. Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquac Res*, 33: 1253-1263.
- Barber BJ., Ford SE., Wargo RN., 1991. Genetic variation in the timing of gonadal maturation and spawning of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol Bull*, 181: 216-221.
- Batista FM., Leitao A., Fonseca VG., Ben Hamadou R., Ruano F., Henriques MA., Guedes-Pinto H., Boudry P., 2007. Individual relationship between aneuploidy of gill cells and growth rate in the cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their reciprocal hybrids. *J Exp Mar Biol Ecol*, 352: 226-233.
- Beaumont A.R., Fairbrother J., 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J Shellfish Res*, 10: 1-18.
- Benfey TJ., Solaar II., 1986. Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. *Trans Am Fish Soc*, 115: 838-840.
- Bernay B., Baudy-Floc'h M., Zanuttini B., Zatylny C., Pouvreau S., Henry J., 2006. Ovarian and sperm regulatory peptides regulate ovulation in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Reprod Dev*, 73: 607-616.
- Berthollet Marolle E., 2007. *Amélioration du modèle individuel de croissance et de reproduction de type "Dynamic Energy Budget" chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et application au cas particulier des huîtres triploïdes*. Rapport de MII de l'Université de Bretagne Occidentale, 32 p.
- Birchler JA., Yao H., Chudalayandi S., 2007. Biological consequences of dosage dependent gene regulatory systems. *Biochim Biophys Acta*, 1769: 422-428.
- Blanc JM., Poisson H., Vallée F., 2001. Covariation between diploid and triploid progenies from common breeders in rainbow trout *Onchroynchus mykiss*. *Aquac Res*, 32:507-516.
- Blanc J.M., Maunas P., Vallée F., 2005. Effect of triploidy on paternal and maternal components of variance in brown trout. *Aquac Res*, 36 : 1026-1033.
- Bonnet S., Haffray P., Blanc JM., Vallée F., Vauchez C., Fauré A., Fauconneau B., 1999. Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid

- freshwater rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*). *Aquaculture*, 173: 359-375.
- Boudry P., Collet B., Cornette F., Herouet V., Bonhomme F., 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, 204(3-4): 283-296.
- Boudry P., Dégremont L., Taris N., McCombie H., Haffray P., Ernande B., 2004. Genetic variability and selective breeding for traits of aquacultural interest in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Bull Aquacul Assoc Can*, 104(2):12-18.
- Boudry P., 2007. "First class oysters" : progress and constraints in genetic improvement of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Actes de congrès, International Shellfish Conference, Vlissingen, Netherlands, 15-16 November 2007.
- Boudry P., Dégremont L., Haffray P., 2008. Etude des bases génétiques de la mortalité estivale du naissain et des possibilités d'amélioration par la sélection. Dans: Samain JF., McCombie, H. (ed) Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Ed. Ifremer/Quae, pp 153-196.
- Boudry P., sous presse. Genetic variation and selective breeding in hatchery-propagated molluscan shellfish. Dans: New technologies in aquaculture - Improving production efficiency, quality and environmental management. Burnell G & Allan G (ed). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. pp 87-108.
- Bouquet AL., 2000. L'élevage des huîtres des « Quatre saisons ». Rapport interne du CREAA, 16 p.
- Bourelès Y., Alunno-Bruscia M., Pouvreau S., Tollu G., Leguay D., Arnaud C., Gouletquer P., Kooijman SALM. Modelling growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Advances in the oyster-DEB model through application to a coastal pond. *J Shellfish Res*, sous presse.
- Bourelès Y., Maurer D., Le Moine O., Geairon P., Mazurié J., Gangnery A., Alunno-Bruscia M., Pouvreau S., 2009. Multi-site application of the DEB model to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* along the French Atlantic coast. Actes du symposium AQUADAB, Brest, 2009. Disponible prochainement sur : <http://www.ifremer.fr/aquadeb>
- Boutet I., Moraga D., Marinovic L., Obreque J., Chavez-Crooker P., 2008. Characterization of reproduction-specific genes in a marine bivalve mollusc : influence of maturation stage and sex on mRNA expression. *Gene*, 407:130-138.
- Brake J., Davidson J., Davis J., 2004. Field observations on growth, gametogenesis, and sex-ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 236: 179-91.
- Brandt G., Wehrmann A., Wirtz KW., 2008. Rapid invasion of *Crassostrea gigas* into the German Wadden Sea dominated by larval supply. *J Shellfish Res*, 59: 279-296.

- Bruvo R., Michiels NK., D'Souza TG., Schulenberg H., 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distance irrespective of ploidy level. *Mol Ecol*, 13: 2101-2106.
- Burton TL., Husband BC., 2000. Fitness differences among diploids, tetraploids, and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium*: mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. *Evolution*, 54(4): 1182-1191.
- Buteler MI., LaBonte DR., Macchiaveli RE., 1997. Determining paternity in polyploids : Hexaploid simulation studies. *Euphytica*, 96: 353-361.
- Cal RM., Vidal S., Gomez C., Alvarez-Blazquez B., Martinez P., Piferrer F., 2006. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 251: 99-108.
- Cardoso JFMF., Langlet D., Loff JF., Martins AR., Witte JJJ., Santos PT., Van der Veer HW., 2007. Spatial variability in growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) along the west European coast. *J Sea Res*, 57: 303-315.
- Castagnet S., 2008. *Les facteurs écophysiologiques et génétiques ainsi que la ploïdie influencent-ils la réponse de l'huître creuse, Crassostrea gigas, à une infection par des Vibrio ?* Rapport de MII de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, 48 p.
- Chavez-Villalba J., Cochard JC., LePennec M., Barret J., Enriquez-Diaz M., Caceres-Martinez C., 2003. Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Shellfish Res*, 22(3): 721-731.
- Chen ZJ., 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 377-406.
- Cheney DP., MacDonald BF., Elston RA., 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J Shellfish Res*, 19:353-359.
- Chippindale AK., Leroy AM., Kim SB., Rose R., 1993. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction. *J Evol Biol*, 6: 171-193.
- Coe WR., 1934. Alternation of sexuality in oysters. *Am Nat*, 68(716): 213-251.
- Collet B., Boudry P., Thebault A., Heurtebise S., Morand B., Gérard A., 1999. Relationship between pre- and post-metamorphic growth in the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 175(3): 215-226.
- Comai L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature review in genetics*, 6: 836-845.
- Comai L., Tyagi AP., Winter K., Holmes-Davis R., Reynolds SH., Stevens Y., Byers B., 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *The Plant Cell*, 12: 1551-1567.

- Cornette F, Grouhel S, Sharbel T, Boudry P, Gouilletquer P, Lapègue S, (2004) *Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage Marennes-Oléron et Arcachon*, Réseau Biovigilance. Rapport Interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer, 67p.
- Cox ES., Smith MSR., Nell JA., Maguire GB., 1996. Studies on triploid oysters in Australia. VI. Gonad development in diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). *J Exp Mar Biol Ecol*, 197:101-120.
- Crane CF., Sleeper DA., 1989. A model of meiotic chromosome association in tetraploids. *Genome*, 32: 691-707.
- Crooks JA., 2002. Characterizing ecosystem level consequences of biological invasions: the role of ecosystem engineers. *Oikos*, 97: 153–66.
- D'Souza T., Storhas M., Michiels N.K., 2005. The effect of ploidy level on fitness in parthenogenetic flatworm. *Biol J Linn Soc*, 85: 191-198.
- Davenel A., Quéllec S., Pouvreau S., 2006. Noninvasive characterization of gonad maturation and determination of the sex of Pacific oyster by MRI. *Magnetic Resonance Imaging*, 24(8): 1103-1110.
- De Paepe M., Taddei F., 2006. Viruses' life history: Towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLoS Biol*, 4(7): e193.
- Degrémont L., 2003. *Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Caen/Basse Normandie, 333 p.
- Degrémont L., Bédier E., Soletchnik P., Ropert M., Huvet A., Moal J., Samain JF., Boudry P., 2005. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 249: 213-229.
- Delaporte M., Soudant P., Lambert C., Jegaden M., Moal J., Pouvreau S., Dégremont L., Boudry P., Samain JF., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. *J Exp Mar Biol Ecol*, 353(1): 45-57.
- Deslous-Paoli JM., Héral M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat Living Resour* 1, 239-249.
- Deslous-Paoli JM., Héral M., Berthomé JP., Razet D., Garnier J., 1982. Reproduction naturelle de *C. gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981 : aspects biochimiques et énergétiques. *Rev Trav Inst Pech Marit*, 45(4) : 319-327.

- Devlin RH., Nagahama Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Dorange G., Le Pennec M., 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the bay of St. Brieuc. *Mar Biol*, 103: 339-348.
- D'Souza T., Storhas M., Michiels N.K., 2005. The effect of ploidy level on fitness in parthenogenetic flatworm. *Biol J Linn Soc*, 85: 191-198.
- Duchesne P., Godbout M.H., Bernatchez L., 2002. PAPA (package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Mol Ecol Notes*, 2, 191-193.
- Dunham RA., 2004. *Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 386 p.
- Dunstan GA., Elliott NG., Appleyard SA., Holmes BH., Conod N., Gruber MA., Cozens MA., 2007. Culture of triploid greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) to market size: commercial implications. *Aquaculture*, 271: 130-141.
- Enriquez-Diaz MR., 2004. *Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse Crassostrea gigas*. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, 193 p.
- Ernande B., 2001. *Développement, plasticité phénotypique et évolution*. Thèse de l'Université de La Rochelle, 274p.
- Ernande B., Clobert J., McCombie H., Boudry P., 2003. Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): A quantitative genetics study. *J Evol Biol*, 16: 399-411.
- Ernande B., Boudry P., Clobert J., Haure J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J Evol Biol*, 17: 342-356.
- Esselink G.D., Nybom H., Vosman B., 2004. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA counting -peak ratios) method. *Theor Appl Genet*, 109: 402-408.
- Estoup A., Gharbi K., SanCristobal M., Chevalet C., Haffray P., Guyomard R., 1998. Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) hatchery populations. *Can J Fish Aquat Sci*, 55:715-725.
- Etterson JR., Keller SR., Galloways LF., 2007. Epistatic and cytonuclear interactions govern outbreeding depression in the autotetraploid *Campanulastrum americanum*. *Evolution*, 61-11: 2671-2683.

- Eudeline B., Allen SK., Guo X., 2000. Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid production. *J Exp Mar Biol Ecol*, 248: 151-161.
- Eudeline, B., 2004. *La tétraploïdie chez les mollusques bivalves : Application à la production de triploïdes chez l'huître creuse Crassostrea gigas. Etude comparée de la gamétogenèse et des métabolismes associés chez les diploïdes, triploïdes et tétraploïdes*. Thèse de l'Université de Rennes I, 183 p.
- Evans S., Langdon C., 2006. Effects of Genotype x environment interactions on the selection of broadly adapted Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 261: 522-534.
- Fabioux C., 2004. *Origine et développement des cellules germinales chez l'huître Crassostrea gigas : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion*. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, 193 p.
- Fabioux C., Pouvreau S., Le Roux F., Huvet A., 2004. The oyster *vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun*, 315: 897-904.
- Fabioux C., Huvet A., Le Souchu P., Le Pennec M., Pouvreau S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250: 458-470.
- Fankhauser G., 1945. The effects of changes in chromosome number on amphibian development. *Q Rev Biol*, 20(1):20-78.
- FAO, 2009. Fishery Statistical Collections, Global Aquaculture Production. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production> (accédé le 28/04/09).
- Fleury E., Fabioux C., Lelong C., Favrel P., Huvet A., 2008. Characterization of a gonad-specific transforming growth factor- β superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*, 410: 187–196.
- Fleury E., Moal J., Boulo V., Daniel JY., Mazurais D., Hénaut A., Corporeau C., Boudry P., Favrel P., Huvet A.. Microarray based identification of new genes differentially expressed between lines selected to be resistant or sensitive to summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Soumis à *Genomics*.
- Gagnaire B., Soletchnik P., Madec P., Geairon P., Le Moine O., Renault T., 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocytes parameters, *Aquaculture*, 254: 606-616.
- Galindo-Sanchez C., Gaffney PM., Perez-Rostro CI., De La Rosa-Vélez J., Candela J., Cruz P., 2008. Assesment of genetic diversity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in Veracruz, Mexico, using microsatellite markers. *J Shellfish Res*, 27(4): 721-727.

- Gallais A., 1989. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson (ed), Paris, 588 p.
- Galstoff PS., 1964. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *US Fish Wildl Serv Fish Bull*, 64: 1-480.
- Garnier-Géré P., Naciri-Graven Y., Bougrier S., Magoulas A., Héral M., Kotoulas G., Hawkins A., Gérard A., 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol Ecol*, 11: 1499-1514.
- Gérard A., Ledu C., Phélipot P., Naciri-Graven Y., 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture*, 174: 229-242.
- Gérard A., Naciri Y., Peignon JM., Ledu C., Phélipot P., Heurtebise S., Garnier J., Baud JP., Nourry M., Haure J., Martin AG., Claude S., Langlade A., Joly JP., Gouletquer P., Ruelle F., Coatanea D., Oheix J., Vercelli C. Chabirant JM., Maurer D., Borel M., Cardinal M., Cornet J., Le Pennec M., Le Mercier A., 1993. *Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation*. Rapport Interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer, 78p.
- Ghiselin MT., 1969. The evolution of hermaphroditism among animals. *Q Rev Biol*, 44(2): 198-208.
- Gmitter FG., Ling XB., De,g XX., 1990. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. *Theor Appl Genet*, 80: 785-790.
- Gong N., Yang H., Zhang G., Landau BJ., Guo X., 2004. Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Heredity*, 93: 408-415.
- Gouletquer P., Joly JP., Gérard A., Le Gagneur E., Moriceau J., Peignon JM., Heurtebise S., Phélipot P., 1996. Performance of triploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem: survival, growth and proximate biochemical composition. *Haliotis*, 25: 1-12.
- Gregory TR., 2001. Coincidence, coevolution or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biol Rev*, 76:65-101.
- Grizel H., Héral M., 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J Cons Int Explor Mer*, 47 : 399-403.
- Guo X., Cooper K., Hershberger WK., Chew KK., 1992. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Ploidy of resultant embryos. *Biol Bull*, 183: 381-386.
- Guo X., Allen SK., 1994a. Reproductive potential and genetics of triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Biol Bull*, 187: 309-318.

- Guo X., Allen SK., 1994b. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(1): 42-50.
- Guo X., Allen SK., 1994c. Sex determination and polyploid gigantism in the dwarf surfclam (*Mulinia lateralis*, Say). *Genetics*, 138(4): 1199-1206.
- Guo M., Davis D., Birchler JA., 1996a. Dosage effects on genes expression in a maize ploidy series. *Genetics*, 142: 1349-1355.
- Guo X., DeBrosse G., Allen SK., 1996b. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142: 149-161.
- Guo X., Allen SK., 1997. Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genome*, 40, 397-405.
- Guo X., Hedgecock D., Hershberger WK., Cooper K., Allen SK., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution*, 52(2): 394-402.
- Hand RE., Nell JA., Thompson PA., 2004. Studies on triploid oysters in Australia. XIII. Performance of diploid and triploid Sydney Rock Oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) progeny from a third generation breeding line. *Aquaculture*, 233, 93-107.
- Haure J., Fortin A., Dupuy B., Nourry M., Palavadeau H., Papin M., Pénisson C., Martin JL., 2003. *Etude comparative des caractéristiques écophysiologiques et des performances de croissance de l'huître creuse Crassostrea gigas diploïde et triploïde en milieu contrôlé*. Rapport Interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer, 78p.
- Hawkins AJS., Day AJ., Gérard A., Naviri Y., Ledu C., Bayne BL., 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*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 184(1):21-40.
- Hawkins AJS., Magoulas A., Héral M., Bougrier S., Naciri-Graven Y., Day AJ., Kotoulas G., 2000. Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet Res Camb*, 76: 273-284.
- Heino M., Kaitala V., 1999. Evolution of resource allocation between growth and reproduction in animals with indeterminate growth. *J Evol Biol*, 12: 423-429.
- Henry IM., Dilkes BP., Young K., Watson B., Wu H., Comai L., 2005. Aneuploidy and genetic variation in the *Arabidopsis thaliana* triploid response. *Genetics*, 170: 1979-1988.
- Héral M., Deslous-Paoli JM., Prou J., 1986. Influence du climat sur le recrutement et sur la production d'huîtres cultivées (*C. angulata* et *C. gigas*) dans le Bassin de Marennes-Oléron. *Haliotis*, 15 :193-207.

- Herbinger CM., Doyle RW., Taggart CT., Lochman SE., Brooker AL., Wright JM., Cook D., 1997. Family relationships and effective population size in a natural cohort of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Can J Fish Sci*, 54(1): 11-18.
- His E., 1976. *Contribution à l'étude biologique de l'huître dans le Bassin d'Arcachon, activité valvaire de Crassostrea angulata et Crassostrea gigas : application à l'étude de la reproduction de l'huître japonaise*. Thèse de l'Université de Bordeaux I, p.
- His E., Robert R., Dinet A., 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol*, 100: 455-463.
- Honkoop PJC., 2003. Physiological costs of reproduction in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. How expensive is reproduction ? *Oecologia*, 135: 176-183.
- Hulata G., 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111: 155-173.
- Husband BC., 2004. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biol J Linn Soc*, 82: 537-546.
- Huvet A., Lapègue S., Magoulas A., Boudry P., 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Cons Genet*, 1(3): 251-262.
- Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C., Bonhomme F., 2000. Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the other cupped oyster species. *Anim Genet*, 31: 71-72.
- Huvet A., 2008. *La biologie de l'huître aborde sa révolution en -omique*. Habilitation à diriger des recherches de l'Université de Caen/Basse Normandie, 75p.
- Huvet A., Jeffroy F., Fabioux C., Daniel JY., Quillien V., Van Wormhoudt A., Moal J., Samain JF., Boudry P., Pouvreau S., 2008a. Association among growth, food consumption related traits and amylase gene polymorphism in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Anim Genet*, 39(6): 662-665.
- Huvet A., Royer J., Moal J., Burgeot T., Lapègue S., Boulo V., Nicolas JL., Lambert C., Van Wormhoudt A., Samain JF., 2008b. Caractérisation phénotypique des souches R résistantes et S Susceptibles à la mortalité estivale. Dans: Samain JF., McCombie, H. (ed) Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Ed. Ifremer/Quae, pp 153-196.
- Huvet A., Normand J., Fleury E., Quillien V., Fabioux C., Boudry P. Lines selected to be resistant or sensitive to summer mortality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* displayed difference in reproductive investment. *En preparation*.
- IFREMER, CNC, 2008. Plaquette de présentation du projet Velyger :Observer, Analyser et Gérer la Variabilité du Recrutement de l'Huître Creuse sur les Côtes Françaises. http://wwz.ifremer.fr/index.php/velyger_en (accédé le 28/04/09).

- Jerry DR., Preston NP., Crocos PJ., Keys S., Meadows JRS., Li Y., 2006. Application for DNA parentage analyses for determining growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds. *Aquaculture*, 254: 171-181.
- Jonhson RM., Shrimpton JM., Cho GK., Heath DD., 2007. Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon. *Heredity*, 98:303-310.
- Jonhston IA., Strugnell G., McCracken ML., Jonhston R., 1999. Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid atlantic salmon. *J Exp Biol*, 202: 1991-2016.
- Kermani MJ., Sarasan V., Roberts AV., Yokoya K., Wentworth J., Sleber VK., 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theor Appl Genet*, 107: 1195-1200.
- Kesarcody-Watson A., Klumpp DW., Lucas JS., 2001a. Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) II. Influence of food concentration and tissue energy distribution. *Aquaculture*, 203: 195-216.
- Kesarcody-Watson A., Lucas JS., Klumpp DW., 2001b. Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) I. Effects of oyster size. *Aquaculture*, 203: 177-193.
- Kohen RK., Milkman R., Mitton JB., 1975. Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution*, 30(1): 2-32.
- Komaru A., Uchimura Y., Ieyama H., Wada K.T., 1988. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture*, 69: 201-209.
- Kooijman, S.A.L.M., 2000. *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 424 p.
- Lambert C., Moal J., Le Moullac G., Pouvreau S., 2008. Les risques associés à la physiologie de l'huître en période de reproduction. Dans: Samain JF., McCombie, H. (ed) Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Ed. Ifremer/Quae, pp 153-196.
- Langdon C., Evans F., Jacobson D., Blouin M., 2003. Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. *Aquaculture*, 220: 227- 244.
- Lango-Reynoso F., 1999. *Détermination de la sexualité chez l'huître creuse Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)*. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 139 p.

- Le Dantec J., 1968. Ecologie et reproduction de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata*, Lamarck) dans le Bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. *Rev Trav Inst Pech Marit*, 32(3) : 237-362.
- Levin DA., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *Am Nat*, 122(1): 1-25.
- Linhart O., Rodina M., Flajshans M., Mavrodiev N., Nebesarova J., Gela D., Kocour M., 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquac Int*, 14: 9-25.
- Li Y., Qin JG., Li X., Benkendorff K., 2009a. Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture*, 286: 64-71.
- Li XC., Barringer BC., Barbash DA., 2009b. The pachytene checkpoint and its relationship to evolutionary patterns of polyploidization and hybrid sterility. *Heredity*, 102: 24-30.
- Li G., Hubert S., Bucklin K., Ribes V., Hedgecock D., 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Ecol Notes*, 3: 228-232.
- Lippman ZB., Zamir D., 2007. Heterosis: revisiting the magic. *Trends in Genetics*, 23(2): 60-66.
- Liu W., Heasman M., Simpson R., 2009. Growth and reproductive performance of triploid and diploid blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach, 1814). *Aquac Res*, 40:188-203.
- Littell RC., Miliken GA., Stroup WW., Wolfinger RD., 1996. *SAS System for mixed models*. SAS Institute Inc (ed.), Cary, NC, USA, 663p.
- Littell RC., Stroup WW., Freund JR., 2002. *SAS for Linear Models, Fourth Edition*. SAS Institute Inc (ed.), Cary, NC, USA, 446p.
- Lohrmann KB., Von Brand E., 2005. Histological study in triploid scallops, *Argopecten purpuratus*. *J Shellfish Res*, 24(2): 369-375.
- Lucas T., Macbeth M., Degnan SM., Knibb W., Degnan BM., 2006. Heritability estimates in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture*, 259: 146-152.
- Lynch M., Walsh B., 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates Inc. (ed), Sunderland, Massachusetts, USA, 980 p.
- Mable BK., 2004. 'Why polyploidy is rarer in animal than in plants': myths and mechanisms. *Biol J Linn Soc*, 82: 453-466.
- Magoulas A., Gjetjav B., Terzoglou V., Zouros E., 1998. Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Anim Genet*, 29: 69-70.

- Maldonado-Amparo R., Ramirez JL., Avila S., Ibarra AM., 2004. Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby): growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. *Aquaculture*, 235: 105-205.
- Mallia JV., Palaniyappan M., Palahani CT., 2006. Growth of triploid oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston). *Aquac Res*, 37: 718-724.
- Mann R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. *J Mar Biol Ass UK*, 59: 95-110.
- Marie V., Gonzalez P., Baudrimont M., Boutet I., Moraga D., Bourdineaud JP., Boudou A., 2006. Metallothionein gene expression and protein levels in triploid and diploid oysters *Crassostrea gigas* after exposure to cadmium and zinc. *Environ Toxicol Chem*, 25(2): 412-418.
- Marks GE., 1966. The enigma of triploid potatoes. *Euphytica*, 15: 285-290.
- Marteil L., 1976. La conchyliculture française, 2^o partie. Biologie de l'huître et de la moule. *Rev Trav Inst Pech Marit*, 40(2) :149-346.
- Mason KM., Shumway SE., Allen SK., Hidu H., 1988. Induced triploidy in the soft-shell clam *Mya arenaria*: energetics implications. *Mar Biol*, 98: 519-528.
- Maxime V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparison with diploid fish. *Fish and fisheries*, 9:67-78.
- McCombie H., Ledu C., Phelipot P., Lapègue S., Boudry P., 2005a. A complementary method for production of tetraploid *Crassostrea gigas* using crosses between diploids and tetraploids. *Mar Biotechnol*, 7(4): 318-330.
- McCombie H., Lapègue S., Cornette F., Ledu C., Boudry P., 2005b. Chromosome loss in biparental progenies of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 247(1-4): 97-105.
- McCouston F., Elmstrom GW., 1993. Identifying polyploids of various cucurbits by stomatal guard cell chloroplast number. *Proc Fla State Hort Soc*, 106: 155-157.
- Meistertzheim AL., 2008. *Capacité d'adaptation d'une espèce invasive, l'huître creuse du Pacifique Crassostrea gigas, en région Bretagne*. Thèse de l'université de Bretagne Occidentale, 258 p.
- Melaragno J.E., Mehrotra B., Coleman A.W., 1993. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of Arabidopsis. *Plant Cell*, 5: 1661-1668.
- Mitton J.B., 1997. *Selection in Natural Populations*. Oxford University Press (ed), Oxford, 240 p.

- Moal J., Lambert C., Pouvreau S., Le Moullac G., Samain JF., 2008. Le facteur de risque température. Dans: Samain JF., McCombie, H. (ed) *Mortalités estivales de l'huître creuse Crassostrea gigas*. Défi Morest. Ed. Ifremer/Quae, pp. 153-196.
- Moran NA., 1992. The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *Am Nat*, 139: 971-989.
- Mori K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol*, 53: 361-369.
- Naimi A., Martinez AS., Specq ML., Mrac A., Diss B., Mathieu M., Sourdain P., 2009. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol A*, 152: 180-196.
- Nell J.A., 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture*, 210 : 69-88.
- Nell JA., Perkins B., 2005. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port-Stephens, New South Wales, Australia. *Aquac Res*, 36: 530-536.
- Nimierko A., 1975. Induction of triploidy in the mouse by cytochalasin B. *J Embryol Exp Morph*, 34(2): 279-289.
- Normand J., 2005. *Etude de la reproduction d'huîtres creuses triploïdes Crassostra gigas (Thunberg) : transmission des chromosomes et potentiel reproducteur*. Rapport de stage de MII de l'Université de Bretagne Occidentale, 70p.
- Normand, J., Le Penneç, M., Boudry, P., 2008. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture*, 282: 124-129.
- Norris BJ., Reston NP., 2003. Triploid induction in the tropical abalone, *Haliotis asinina* (Linné), with 6-diméthylaminopurine. *Aquac Res*, 34:261-264.
- Orr HA., 1990. Why polyploidy is rarer in animals than in plants. *Am Nat*, 136(6): 759-770.
- Otto SP., Whitton J., 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet*, 34: 401-437.
- Palacios E., Racotta IS., Ibarra AM., Ramirez JL., Millan A., Avila S., 2004. Comparison of biochemical composition and muscle hypertrophy associated with the reproductive cycle of diploid and triploid scallops, *Argopecten ventriculosus*. *J Shellfish Res*, 23(2): 483-489.
- Panopoulou G., Poutska AJ., 2005. Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications – the adventure of a hypothesis. *Trends in Genetics*, 21(10): 559-567.
- Paterson AH., 2005. Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. *Genetica*, 123: 191-196.

- Pierce LR., Palti Y., Silverstein JT., Barrows FT., Hallerman EM., Parsons JE., 2008. Family growth response to fishmeal and plant-based diets shows genotype \times diet interaction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 278:37-42.
- Piferrer F., Beaumont A., Falguière JC., Colombo L., 2007. Performance improvements by polyploidization, gene transfer and DNA vaccination in aquaculture. I. Performance improvements by polyploidization in aquaculture, pp100-103, Dans: Svasand T., Crosetti, D., Garcia-Vazquez, E., Verspoor, E. (ed). *Genetic impact of aquaculture activities on native populations. Genimpact final scientific report* (EU contract n. RICA-CT-2005-022802). <http://genimpact.imr.no/>
- Pouvreau S., Bourles Y., Lefebvre S., Gangnery A., Alunno-Bruscia M., 2006. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *J Sea Res*, 56 (2): 156-167.
- Purdom CE., 1972. Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity*, 29: 11-24.
- Racotta IS., Palacios E., Ibarra AM., Ramirez JL., Arcos F., 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusc's growth in food-rich environments. *Mar Biol*, 153(6): 1245-1256.
- Raguenès M., 2006. *Développement des cellules germinales chez les huîtres Crassostrea gigas triploïdes ; relation avec leur faible activité gamétogénétique*. Rapport de stage de Master II de l'Université de Bretagne Occidentale, 24p.
- Ramsey J., Schemske D., 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst*, 29: 467-501.
- Ramsey J., Schemske DW., 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst*, 33:589-639.
- Reece KS., Cordes JF., Stubbs JB., Hudson KL., Francis EA., 2008. Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. *Mar Biol*, 153:709-721.
- Ren JS., Schiel D., 2008. A dynamic energy budget model: parameterisation and application to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand waters. *J Exp Mar Biol Ecol*, 361: 42-48.
- Reiznick D., 1985. Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos*, 44(2): 257-267.
- Riddle N., Kato A., Birchler JA., 2006. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays* L. *Theor Appl Genet*, 114: 101-111.
- Robert R., Trintignac P., 1997. Microalgues et nutrition larvaire en éclosion de mollusques. *Haliotis*, 26 : 1-13.

- Robert R., Gérard A., 1999. Bivalve hatchery technology : The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat Living Resour*, 12(2): 121-130.
- Rodriguez-Munoz R., Nicieza AG., Brana F., 2003. Density-dependent growth of Sea Lamprey larvae: evidences for chemical interference. *Funct Ecol*, 17: 403-408.
- Rohfritsch A., Bierne N., Boudry P., Heurtebise S., Lapègue S., 2008. Scanning the genome of the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, for adaptative differentiation during geographic range expansion. *Actes de Congrès*, World Conference on Marine Biodiversity, Valence, Espagne 13 Novembre 2008.
- Rothschild BJ., Ault JS., Gouletquer P., Héral M., 1994. Decline of the Chesapeake Bay oyster population: A century of habitat destruction and overfishing. *Mar Ecol Prog. Ser*, 111(1-2): 29-39.
- Royer J., Segueineau C., Park KI., Pouvreau S., Choi KS., Costil K., 2008. Gametogenetic cycle and reproductive effort assessed by two methods in 3 age classes of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, reared in Normandy. *Aquaculture*, 277: 313-320.
- Ruesink JL., Lenihan HS., Trimble AC., Heiman KW., Micheli F., Byers JE., Kay MC., 2005. Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 2005. 36:643–89.
- Ruiz-Verdugo CA., Ramirez JL., Allen SK., Ibarra AM., 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventriculosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture*, 186: 13-32.
- Ruzzante DE., Doyle RW., 1991. Rapid behavioural changes in Medaka (*Oryzias latipes*) caused by selection for competitive and non-competitive growth. *Evolution*, 45(8): 1936-1946.
- Samain JF., Dégremont L., Soletchnik P., Haure J., Bédier E., Ropert M., Moal J., Huvet A., Bacca H., Van Wormhoudt A., Delaporte M., Costil K., Pouvreau S., Lambert C., Boulo V., Soudant P., Nicolas JL., Le Roux F., Renault T., Gagnaire B., Géret F., Boutet I., Burgeot T., Boudry P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. *Aquaculture*, 268: 227-243.
- Sand-Jensen K., 2007. How to write consistently boring scientific literature. *Oikos*, 116: 723-727.
- Schranz ME., Osborn TC., 2004. De novo variation in life-history traits and response to growth conditions of resynthesized polyploid *Brassica napus* (Brassicaceae). *Am J Bot*, 91(2): 174-183.
- Schwarzkopf L., Blows MW., Caley J., 1999. Life-history consequences of divergent selection on egg size in *Drosophila melanogaster*. *Am Nat*, 29(6): 333-340.

- Sheridan AK., Smith IR., Nell JA., 1996. Reducing the impact of environmental variation in a growth rate improvement program for the Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis*. *Aquaculture* 143: 145-154.
- Sheridan AK., 1997. Genetic improvement of oyster production – a critique. *Aquaculture*, 153: 165-179.
- Shpigel M., Barber BJ., Mann R., 1992. Effects of elevated temperature on growth, gametogenesis, physiology, and biochemical composition in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Exp Mar Biol Ecol*, 161: 15-25.
- Small SA., Benfey TJ., 2005. Cell size in triploid salmon. *J Exp Zool*, 241(3): 339-342.
- Smith GA., Hecher RJ., Martin SS., 1979. Effects of ploidy level on the component of sucrose yield and quality in sugarbeet. *Crop Sci*, 19: 319-323.
- Sokalh RR., Rohlf JF., 1995. *Biometry : the principles and practises of statistics in biological research*, third edition. W.H. Freeman and company (ed.), New York, USA, 887 p.
- Soletchnik P., Razet D., Geairon P., Faury N., Gouilletquer P., 1997. Ecophysiologie de la maturation sexuelle et de la ponte chez l’huître creuse *Crassostrea gigas* : réponses métaboliques (respiration) et alimentaires (filtration, absorption) en fonction des différents stades de maturation. *Aquat Living Resour*, 10 : 177-185.
- Soletchnik P., Faury N., Gouilletquer P., 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes-Oléron bay (France). *Aquaculture*, 252(2-4): 328-338.
- Soltis DE., Soltis PS., 1999. Polyploidy : recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology*, 14(9): 348-352.
- Song K., Ping L., Tang K., Osborn TC., 1995. Rapid genome changes in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA Evol*, 92: 7719-7723.
- Sreekumari MT., Jos JS., Nair SG., 1999. ‘Sree Harsha’ a superior triploid hybrid in cassava. *Euphytica*, 106: 1-6.
- Stanley JG., Allen SK., Hidu H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin-B. *Aquaculture*, 23:1-10.
- Stanley JG., Hidu H., Allen SK, 1984. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture* 37, 147-155.
- Stearns SC., 1976. Life-history tactics: A review of the ideas. *Q Rev Biol*, 51:3-47.
- Stearns, S. C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Funct Ecol*, 3:259–268.
- Stearns SC., 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press (ed.), New York, USA, 249 p.

- Steele S., Mulcahy MF., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J Mar Biol Assoc UK*, 70: 673-686.
- Stiles S., Choromanski J., 2002. Trends in genetics of bivalve molluscs: a review. Dans: *ICES Statutory Meeting Proceedings 2002*, Copenhagen, Denmark, Octobre 2002. ICES Copenhagen, Denmark. C.M. 2002/U:11, 28 p.
- Sultan SE., Spencer HG., 2002. Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *Am Nat*, 160(2) :271-283.
- Suzuki M., Shimada T., Yokoyama T., Kobayashi M., 1999. The influence of triploidy on gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity*, 82: 661-667.
- Swarup, H. 1959. Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J Genet*, 56 : 129-142.
- Taberini CL., 1984. Induced polyploidy in the bay scallop, *Argopectens irradians*, and its effects on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42: 151-160.
- Taris N., 2005. *Conséquences génétiques de la production intensive de larves d'huîtres en éclosion : étude des processus de dérive et de sélection liés aux pratiques d'élevage*. Thèse de l'Université de la Rochelle, 205 p.
- Taris N., Baron S., Sharbel TF., Sauvage C., Boudry P., 2005. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquac Res*, 36(5): 516-518.
- Taris N., Ernande B., McCombie H., Boudry P., 2006. Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J Exp Mar Biol Ecol*, 333(1): 147-158.
- Thorne MH., Collins RK., Sheldon BL., 1991. Triploidy and other chromosomal abnormalities in a selected line of chickens. *Genet Sel Evol*, 23(1): 212-216.
- Todd CD., Havenhand JN., 1983. Reproductive effort: its definition, measurement, and interpretation in relation to molluscan life-history strategies. *J Moll Stud* (suppl.), 12A: 203-208.
- Tran D., Massabuau JC., Vercelli C., 2008. Influence of sex and spawning status on oxygen consumption and blood oxygenation status in oysters *Crassostrea gigas* cultured in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Aquaculture*, 277 : 58-65.
- Vandeputte M., Dupont-Nivet M., Haffray P., Chavanne H., Cenadelli S., Parati K., Vidal MO., Vergnet A., Chatain B., 2009. Response to domestication and selection for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in separate and mixed tanks. *Aquaculture*, 286: 20-27.
- Valenti RJ., 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. *J Fish Biol*, 7(4): 519-528.

- Van de Castele T., Galbusera P., Matthysen E., 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Mol Ecol*, 10 : 1539-1549.
- Van der Veer HW., Cardoso JFMF., Van der Meer J., 2006. The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *J Sea Res*, 56: 107–124.
- Vandenhout H., Ortiz R., Vuylsteke D., Swennen R., Bai KV., 1995. Effects of ploidy on stomatal size and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. *Euphytica*, 83: 117-122.
- Wang Z., Guo X., Allen SK., Wang R., 1999. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. *Aquaculture*, 173: 347-357.
- Wang Z., Guo X., Allen SK., Wang R., 2002. Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploids. *Aquaculture*, 204: 337-348.
- Wang J., Tian L., Hyeon-Se L., Wei NE., Jiang H., Watson B., Madlung A., Osborn TC., Doerge RW., Comai L., Chen JZ., 2006. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* Allotetraploids. *Genetics*, 172: 507-517.
- Warner RR., 1997. Evolutionary ecology: how to reconcile pelagic dispersal with local adaptation? *Coral reefs* (suppl.), 16: S115-120.
- Wendell J.F., 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol*, 42: 225-249.
- Withler RE., Beacham TD., Solar II., Donaldson EM., 1995. Freshwater growth, smelting and marine survival and growth of diploid and triploid coho salmon (*Onchorynchus kisutch*). *Aquaculture*, 136: 91-107.
- Wu R., 1995. A quantitative genetic model for mixed diploid and triploid hybrid progenies in tree breeding and evolution. *Theor Appl Genet*, 90: 683-690.
- Wylie C., 2000. Germ Cells. *Curr Op Genet Dev*, 10(4): 410-413.
- Yusa Y., 2007. Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca – an overview. *Am Malacol Bull*, 23: 89-98.
- Zang Q., Arai K., 1999. Distribution and reproductive capacity of natural triploid individuals and occurrence of unreduced eggs as a cause of polyploidization in the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Ichthyol Res*, 46(2): 153-161.
- 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. *Genetical research*, 68: 109-116.

Titre : Déterminismes génétiques de l'allocation à la reproduction chez les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) triploïdes.

Résumé : L'huître creuse *Crassostrea gigas* présente à l'état diploïde un développement gonadique qui peut être très important en terme d'investissement énergétique. L'observation de corrélations phénotypiques et génétiques négatives entre l'allocation à la reproduction et des traits liés à la survie et la croissance suggère que ce caractère est plutôt délétère pour l'élevage de cette espèce. La triploïdie peut être induite artificiellement à des fins d'amélioration génétique chez l'huître creuse. Elle entraîne en effet une diminution de la quantité moyenne de tissus gonadiques, quoique celle-ci reste très variable. Dans ce contexte, les travaux entrepris au cours de cette thèse avaient pour objectif de qualifier et quantifier le développement gonadique chez les triploïdes, et d'étudier les déterminismes génétiques impliqués dans sa variabilité.

La variation de l'allocation à la reproduction et à la croissance a d'abord été étudiée chez 3 x 96 familles obtenues par plan de croisement factoriel puis élevées en mélange et comprenant des individus diploïdes, triploïdes obtenus par croisement $4n \times 2n$, ou par induction chimique. Chez les huîtres triploïdes, le développement gonadique est apparu réduit d'un peu plus de la moitié par rapport aux huîtres diploïdes. La maturation des tissus reproducteurs a montré des signes évidents de perturbation, avec une forte occurrence d'hermaphrodites et des individus présentant des stades variés de maturation gonadique. Le déterminisme génétique pour l'allocation à la reproduction s'est avéré modéré pour les trois lots, probablement en raison de l'influence d'une forte composante environnementale due à la compétition inter-individuelle. Des interactions significatives ont été détectées entre la triploïdie et la composante génétique familiale pour la masse de tissus frais et l'occupation gonadique. Une seconde étude des déterminismes génétiques a ensuite été menée par l'analyse de la réponse d'huîtres diploïdes et triploïdes à une sélection divergente. Des géniteurs diploïdes présentant un développement gonadique contrasté ont été choisis afin de générer une pression de sélection directionnelle. L'allocation à la reproduction, mesurée dans leur descendance diploïde et triploïde, a alors montré une réponse forte à la sélection pour ces deux groupes.

Les causes possibles de la variabilité chez les huîtres diploïdes et triploïdes de l'allocation à la reproduction et ses conséquences sur les traits phénotypiques corrélés, ainsi que la sensibilité de l'ensemble de ces traits phénotypiques et des estimateurs des génétiques associés à différents facteurs environnementaux sont discutés à la lumière de ces résultats.

Mots-clés : huître, triploïde, allocation à la reproduction, gamétogenèse, dimorphisme sexuel, déterminisme génétique, interaction triploïdie x génétique, corrélation phénotypique, hétérogénéité spatiale, environnement.

Title: Genetic determinisms for the allocation to reproduction in triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*).

Abstract : In diploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*, gonadic development can be important in terms of energetic investment. Phenotypic and genetic negative correlations have also been observed between gonadic occupation and traits related to survival and growth, and this fact suggests that this trait could be deleterious for its aquaculture production. Triploidy can be artificially induced to improve the production of Pacific oysters as it results in a general diminution of mean gonadic development. This trait is however highly variable. In this context, this study aimed to quantify and qualify the allocation to reproduction in triploid oysters and to study its genetic bases.

Variability for allocation to reproduction and growth was first studied in 3 sets of 96 families produced following a factorial crossing design and reared together under common condition, including diploids, triploids obtained by $4n \times 2n$ crosses or chemical induction. Gonadic development in triploid oysters was divided by two compared with diploids. The maturation of gonadic tissues showed perturbations characterized with high occurrence of hermaphroditism, and high inter-individual variation in maturation stage. A moderate genetic determinism has been found for the allocation to reproduction in the three groups, probably influenced by environmental heterogeneity due to competition between individuals. Significant interactions have been detected between triploidy and genetic familial value for soft-tissue weight and allocation to reproduction.

The genetic basis for the variation of the allocation to reproduction in diploid and triploid oysters was then studied with the analysis of the response to a divergent selection experiment. Diploid breeders showing contrasted gonadic development were chosen to induce a directional selective pressure. Allocation to reproduction measured in diploid and triploid offspring showed a clear response to selection in these two groups.

The possible causes of the observed variation of allocation to reproduction in diploid and triploid oysters, and its consequences on correlated phenotypic traits, as well as the sensibility of phenotypic traits and related genetic parameters estimates to environmental heterogeneity are discussed in the light of our results.

Key-words: oyster, triploid, allocation to reproduction, gametogenesis, sexual dimorphism, genetic determinism, triploidy x genetic interaction, phenotypic correlation, spatial heterogeneity, environment.