

THESE DE DOCTORAT

UNIVERSITE DE PAU
ET
DES PAYS DE L'ADOUR

ECOLE DOCTORALE 211
SCIENCES EXACTES ET LEURS APPLICATIONS

par

Benjamin Geffroy

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité :

PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES-POPULATIONS-INTERACTIONS

Déterminisme environnemental du sexe chez l'anguille
européenne (*Anguilla anguilla* L.)

Jury

Dr Marie-Laure Bégout *IFREMER* - Rapporteur
Dr Marc Legendre *IRD* - Rapporteur

Examineurs

Dr L. Beaulaton *ONEMA*
Dr F. Daverat *IRSTEA*
Dr Y. Guiguen *INRA*
Dr A. Bardonnnet *INRA* - Directeur de thèse

A Vinc

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Agnès Bardonnnet pour m'avoir donné, en premier lieu, l'opportunité de devenir Docteur. Je la remercie également pour son encadrement, pour toutes les discussions que l'on a pu avoir ces 3 années, pour la transmission de son savoir, pour sa gentillesse et pour m'avoir aidé à trouver (je l'espère) le fameux fil rouge ;-).

Merci aussi à mes deux co-encadrants de fait (même s'ils ne figurent pas administrativement comme tels) :

- Alexis Fostier, pour sa patience, et m'avoir transmis sa capacité à analyser les résultats avec recul et pour tout le temps qu'il a su me consacrer.
- Yann Guiguen, pour son encadrement, sa rigueur, la pertinence de ses conseils et pour nos discussions constructives.

Un merci tout particulier à mes deux acolytes, Emmanuel Huchet *aka* Pascal Bieber et Jacques Rives *aka* TBTPIC (le Toulousain Basquisé Tenant des Propos Inappropriés en toutes Circonstances). Les blagues redondantes (Pour manu : type wagonnets) et les blagues scabreuses (Pour Jacques : type ...) me manqueront. Merci à vous deux pour avoir été là pendant les moments personnels les plus difficiles.

Merci à Jacques Labonne qui, outre les analyses statistiques, a toujours été de bon conseil. Merci à Cédric Tentelier et Olivier Lepais qui, outre les bons conseils, ont rarement été présents pour les analyses statistiques ;-). Merci à Valérie Bolliet pour m'avoir transmis son savoir concernant, en particulier, le métabolisme. Merci à Noëlle Bru pour les moments conviviaux partagés autour des statistiques.

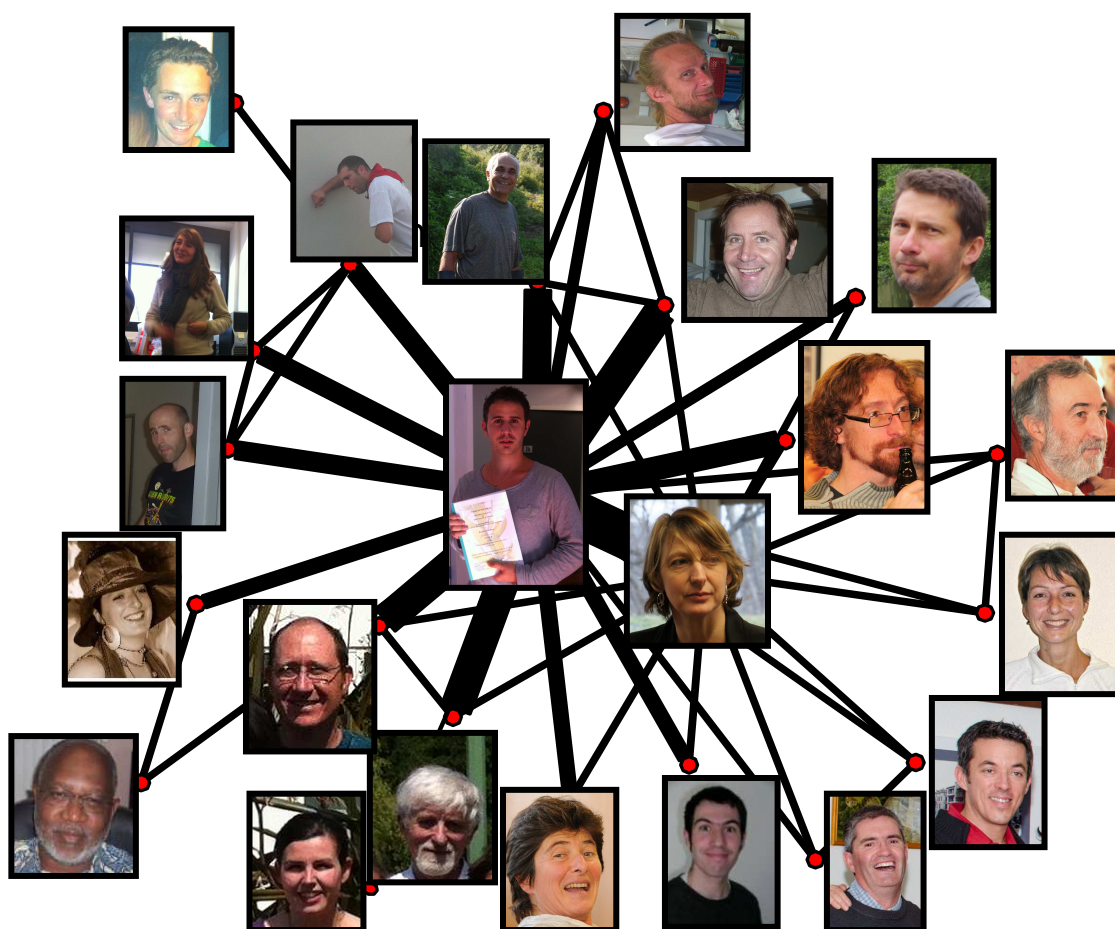
Une pensée pour les différents colocataires de mon bureau, à commencer par Thomas qui, outre une odeur « *podale* » pestilentielle, m'a beaucoup appris dans différents domaines scientifiques et pour tous les moments partagés hors de la sphère INRA. Il en va de même pour GuiGui et ses talents de « geek R ». Enfin, comme le dit le vieil adage, la meilleure pour la fin ;- Merci à Zozo pour les moments partagés intra et extra muros!

Un nouveau merci à Jacques Labonne, Pantxo et Cédric Tentelier pour les moments passés hors du labo, à la pala, à la venta ou dans n'importe quel truc finissant en « A ».

Merci à Pantxika Dufau-Iribarren, Julie Claveau, Marie-Christine, Pascale Coste, Philippe Laborde, Pascale Avril et Ester Carlut pour leur bonne humeur en toutes circonstances et l'aide fournie à différentes étapes de la thèse.

Merci à tous mes amis qui ont suivi mon cheminement depuis le début et qui ont contribué largement à mon développement intellectuel et moral: Raph, Chris, Bobo, Benous, Dondon, Clemou, Mimi, GG, Nono, Miky, Bastien, Seb et Marine.

Merci à mes grands parents, Papy Li, Mamie Yvette, Papy Neness et Mamie Simone. Merci aux Philippes pour les multiples corrections et pour avoir été les témoins privilégiés de mon parcours. Merci à mon petit frère pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir donné la force de continuer malgré son absence. Merci à mes parents qui m'ont également toujours soutenu dans ma passion et sans qui, je ne serais probablement pas là où je suis aujourd'hui.



Le Réseau Social de la Thèse

Les civelles menacées de disparition

Elles survivent de moins en moins dans nos estuaires et se reproduisent peu dans la mer des Sargasses

Civelliers : fin de saison difficile

La campagne de pêche à la civelle se termine. Selon les professionnels, elle dure depuis vingt-cinq ans.

Chaude ambiance, hier, devant l'école de la marine marchande de Nantes, étroitement gardée par les CRS. À l'initiative du Comité régional des pêches des Pays de la Loire, une réunion était organisée pour trouver une parade à l'effondrement du marché de la civelle, espèce protégée. En cause, une interdiction scientifique et européenne d'exporter vers la Chine. L'an dernier, un quota de 14,5 tonnes à destination de l'Asie avait permis aux professionnels de sauver les meubles.

Cette année, ils tablaient sur 12 tonnes. L'autorisation n'est pas venue : zéro quota à l'export. Conséquence, le mareyage, qui dit ne pas avoir d'autres débouchés, n'achète plus. Depuis dix jours, les bateaux sont donc restés à quai, mettant à mal les finances des marins. « On veut notre peau. Sans l'export vers l'Asie, notre activité n'est pas viable et certains d'entre nous sont au bord du dépôt de bilan », scandaient les pêcheurs devant les grilles de l'école de la marine marchande.

Situation d'urgence

... nan... mener. Cet arrêt sera la base de 20 kg maxi (soit avec une aide forfaitaire de accordée par équipage. La Di par ailleurs pris « l'engagement soutenir la création de civelle avec un apport d'aides publi Comité

Ouest-France
Mardi 1^{er} février 2011

Civelle : réunion le 4 février à Bruxelles

direction des pêches et civelliers vont tenter de convaincre l'Europe de rouvrir l'export vers la Chine.

Record mondial de consommation de poisson

« La consommation de poisson a atteint des records, en 2008 (17 kg par habitant) » relèvent les experts de la FAO. « Il assure 15 % des besoins en protéines animales de plus de 3 milliards de personnes, note l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Cet accroissement s'explique par

la situation des stocks halieutiques : « 32 % doivent être restaurés d'urgence ». Selon elle, « les produits de la pêche continuent d'être les produits alimentaires de base les plus échangés, pour une valeur record de 102 milliards de dollars en 2008 (+ 9 %) ». Au total, pêche et aquaculture font vivre 540 millions

La clé de tout, c'est l'export vers la Chine. Si nos actions et nos politiques ne nous accordent pas à convaincre les autres, nous ne pouvons rien faire.

Dégradation du milieu
En cause, « la forte dégradation du milieu », estime le scientifique. multiplication des ouvrages sur les rivières, mais surtout la détérioration des estuaires, récentes pollutions agricoles.



Espèce protégée, la civelle fait l'objet d'une gestion européenne très stricte

« Alerte écarlate ! Depuis les années 1970, le déclin est constant à cause de la surpêche et de la dégradation du milieu. Nous avons réclamé un moratoire, il a été refusé », s'alarment Guenaël Artur et Alexandre Le Borgne, de l'association des pêcheurs amateurs d'Ille-et-Vilaine. « Le stock de civelles est excessivement bas », confirme Patrick Prouzat, directeur de recherche à Ifremer. « Elles ont disparu de la mer Baltique et on n'en trouve quasiment plus en Allemagne et au Danemark.

l'unité. « C'est notre seul véritable espoir de sauver cette filière. »

plan de sortie de flotte. Et, « à la fin de l'année, il n'y aura plus que 780 droits de pêche », indique Nicolas Michelat, du comité national des pêches. Parallèlement, les pêcheurs adhèrent au plan de repeuplement. Il consiste à pré-

Civelles : espoir pour le repeuplement

Une convention entre les civelliers du bassin Loire-Bretagne et l'État pourrait permettre de débloquer le quota de civelles autorisé pour le repeuplement des rivières entre la baie du Mont Saint-Michel et la Sèvre Niortaise. Le veto de l'Agence de l'eau Loire-Bretagne, mesure de rétorsion aux fraudes de l'année dernière, priverait la pêcherie de son quota de 3 tonnes. Les civelliers craignent que les autres agences emboîtent le pas et annulent ainsi le quota national de 4 tonnes. « Un accord est en cours de négociation avec la Direction des pêches. Il doit permettre de dégager un mode de financement, hors agence de l'eau, pour ouvrir et financer le quota Loire-Bretagne », explique Louis Vilaine, président de la Commission des estuaires au Comité national des pêches.

« Une enveloppe de 1,8 million est attribuée aux pêcheurs pour le repeuplement des rivières françaises (soit 4,4 tonnes). »

Sur ce point, le mareyage, qui s'est engagé à acheter sur la base de 300 € pour revendre 400 €, attend une garantie de paiement rapide.

L'étude a porté sur 606 pêcheurs amateurs ou membres de leur foyer et seize pêcheurs professionnels dans différentes zones : « Quatre contaminées (Seine, Somme, Rhône et Rhin) et deux non contaminées (Loire et Garonne) », a précisé la Fédération de pêche, qui a collaboré. Elle a disséqué les habitudes alimentaires des participants et déterminé leur niveau d'imprégnation aux PCB grâce à un prélèvement sanguin.

Résultat : consommer ces espèces augmente le taux de PCB dans le corps. Mais, « très peu de participants dépassent le seuil critique », en dessous duquel il n'y a pas de risques. Car seuls 13 % des pêcheurs

Évitez les poissons chargés en PCB

Femmes enceintes et enfants doivent manger très peu d'anguille ou de carpe, qui concentrent cette substance chimique.

Création de civelleries

Convaincus que les quotas 2012 « risquent d'être encore à la baisse » et que l'exportation vers la Chine sera à nouveau bloquée, les professionnels misent sur la création de civelleries. « Elles nous permettraient de lisser la mise en marché de la production et de maintenir ainsi les cours à un niveau acceptable », estime José Jouneau.

Autre espoir, ces civelleries pourraient aussi « donner la possibilité de développer une filière anguilles.



L'anguille peut concentrer les PCB si elle est en zone contaminée.

Ouest-France
13-14 novembre 2010



Scandinavie. L'espoir ? Que le cycle naturel se reconstitue et que les anguilles retournent se reproduire dans la mer des Sargasses.

Sur le plan économique, la pêche est menacée. L'export vers l'Asie, marché porteur, est conditionné à des quotas fixés par l'Europe. « Les discussions en cours nous préoccupent », souligne Nicolas Michelet. « L'Europe veut conditionner son autorisation à une nouvelle diminution de notre quota de pêche. »

La filière dit ne pas y survivre. L'an dernier, sur un quota de 61,5 tonnes, « nous en avons pêché 40,5 t, dont dix pour le repeuplement. Pour nous, la solution, c'est de renforcer le plan de repeuplement », rémunéré par l'État à hauteur de 350 € le kilo.

Chaque année, hier, devant l'école de la marine marchande de Nantes, étroitement gardée par les CRS. À l'initiative du Comité régional des pêches des Pays de la Loire, une réunion était organisée pour trouver une parade à l'effondrement du marché de la civelle, espèce protégée. En cause, une interdiction scientifique et européenne d'exporter vers la Chine. L'an dernier, un quota de 14,5 tonnes à destination de l'Asie avait permis aux professionnels de sauver les meubles.

Cette année, ils tablaient sur 12 tonnes. L'autorisation n'est pas venue : zéro quota à l'export. Conséquence, le mareyage, qui dit ne pas avoir d'autres débouchés, n'achète plus. Depuis dix jours, les bateaux sont donc restés à quai, mettant à mal les finances des marins. « On veut notre peau. Sans l'export vers l'Asie, notre activité n'est pas viable et certains d'entre nous sont

trois tonnes de civelles représentent un potentiel de 200 tonnes d'anguilles ». Fleete à trouver les partenaires pour financer ces installations estimées en 3,5 et 4 millions d'euros

// ANGUILLES LE PLAN... D'EXTERMINATION ?

La FNPF le clame après que l'Europe a validé le plan français de gestion de l'anguille : « Ce plan condamne cette espèce à la disparition de nos cours d'eau. » La FNPF avait proposé un moratoire de 5 ans ; avait proposé des mesures fortes pour aider les anguilles à franchir les ouvrages et accomplir ainsi plus facilement son cycle biologique en eau douce ; avait lancé une pétition (13200 signatures), remise à la Commission, tout cela en vain. Point d'orgue de l'incohérence : l'exportation vers la Chine et le Japon des civelles européennes reste autorisée...



BIEN malménée!

29-30 janvier

5/AVRIL 2010

l'unité. « C'est notre seul statut...
D'après...

ODE TO ANGUILLA

There once was an elver named Sam,
Who decided to climb Cornwall Dam.
He squiggled and squirmed, under willows he wormed,
'Til he reached the top and abruptly was stopped,
Doused in a bucket of 222,
He was tagged in the jaw by Peter Liew.

Then off like a dog with a can on his tail,
He headed upstream 'til he found a large nail.
Then off with a twist, came the tag from his lip,
And on up the river he proceeded to slip.

It was hard to eat with a jaw split in two,
But when you're an eel, you have to make do.
Insects and fish added length to his frame,
Developing gonads forced a change in his name!!

Samantha continued to grow leaps and bounds,
'Til universal yearnings turned her around.
She headed downstream, one thing on her mind,
And found herself in a terrible bind.
In the blades of the turbine, I may breathe my last,
So I'll go through the locks to save my ass!!

Down Lake St. Francis, she twirls and she dances,
Past Montreal with no backward glances.
A Québec elle ira comme il pourra,
Pour chercher un homme comme il ne s'en trouve pas.

In their search for a mate, the girls became frantic,
So they headed on out to the North Atlantic.
At Prince Edward Island, they all hung a right,
And the next thing we knew, they were right out of sight!

Of their mating behaviour we can scarce speculate,
'Cause nobody knows how eels copulate!!!!

Editor's Note:

The above was prepared during the course of the meeting, as a tribute to Dr. Vladykov, by an international group of meeting attendees who were impressed by the presence and knowledge of Canada's senior authority on eels.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

<u>1 INTRODUCTION</u>	2
<u>1.1. GENERALITES SUR L'ANGUILLE</u>	2
1.1.1. MYTHES ET LEGENDES	2
1.1.2. CYCLE DE VIE DE L'ANGUILLE EUROPEENNE	2
1.1.3. DIADROMIE CHEZ L'ANGUILLE	4
<u>1.2. LES DIFFERENTES PHASES DE VIE CHEZ L'ANGUILLE</u>	5
1.2.1. PHASE LEPTOCEPHALE	5
1.2.2. PHASE CIVELLE	6
1.2.3. PHASE ANGUILLETTE/ANGUILLE JAUNE	7
1.2.4. PHASE ANGUILLE ARGENTEE	8
<u>1.3. DECLIN DU STOCK</u>	10
<u>1.4. IMPORTANCE COMMERCIALE</u>	11
<u>1.5. DETERMINISME DU SEXE</u>	12
1.5.1. LE DETERMINISME GENOTYPIQUE DU SEXE	12
1.5.2. LE DETERMINISME ENVIRONNEMENTAL DU SEXE	13
<u>1.6. CAS DE L'ANGUILLE</u>	16
1.6.1. UN DETERMINISME GENOTYPIQUE ?	16
1.6.2. UN DETERMINISME ENVIRONNEMENTAL DU SEXE?	16
1.6.2.1. Evolution des sex-ratios dans la nature	16
1.6.2.2. Evolution des sex-ratios dans les conditions experimentales	18
<u>1.7. PROBLEMATIQUE ET PRESENTATION DES TRAVAUX DE THESE</u>	20

PARTIE I : COMPORTEMENT ET CROISSANCE

<u>2 MATERIEL ET METHODES I</u>	23
<u>LE COMPORTEMENT ANIMAL ET LA PERSONNALITE</u>	31
<u>CHAPITRE 1</u>	39
<u>CHAPITRE 2</u>	56
<u>CHAPITRE 3</u>	69
<u>CHAPITRE 4</u>	80
<u>CHAPITRE 5</u>	91

PARTIE II : CROISSANCE ET SEXE

<u>DIFFERENCIATION SEXUELLE ET ALLOCATION SEXUELLE</u>	104
<u>3 MATERIEL ET METHODES II</u>	107
<u>CHAPITRE 6</u>	116
<u>CHAPITRE 7</u>	129

DISCUSSION

4 DISCUSSION GENERALE..... 150

1. MORTALITE..... 150

2. L'ALLOCATION SEXUELLE, L'EXPRESSION CONDITIONNELLE DU SEXE (CSE) ET LE « SIZE-ADVANTAGE »
MODELE CHEZ L'ANGUILLE..... 151

2.1. Cadre Théorique..... 151

2.2. Le size-advantage modèle chez l'anguille 152

2.2.1. L'avantage d'être femelle :..... 152

2.2.2. Conséquence d'être femelle : L'avantage d'être grand..... 154

2.2.3. Coûts associés au fait d'être femelle..... 154

2.3. Expression Conditionnelle du sexe chez l'anguille 155

2.4. Conclusion sur l'expression conditionnelle du sexe..... 162

2.4.1. Chez l'anguille..... 162

2.4.2. Chez d'autres espèces ? 165

2.4.3. Cas d'intersexualité tardive chez l'anguille : hermaphrodisme simultané ? 165

3. PERSPECTIVES 166

3.1. ROLE DES PHEROMONES ?..... 166

3.2. ROLE DU CORTISOL DANS LA DETERMINATION DU SEXE DE L'ANGUILLE ? 167

4. CONSERVATION ET MESURES DE GESTION 168

5. CONCLUSION GENERALE..... 172

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 174

ANNEXES 192

CV 196

Introduction

1 Introduction

1.1. Généralités sur l'Anguille

1.1.1. Mythes et légendes

L'anguille a fasciné les scientifiques depuis plus de 2000 ans (Aristote, *Historia animalium* 343 BC). Aristote avait déjà noté l'ambiguïté du sexe chez les anguilles « On préfère parmi les Anguilles, celles que l'on appelle femelles, quoiqu'elles ne le soient pas » (Aristote, *Historia animalium* Livre 8, Chapitre 30). Cependant, il avait essayé de différencier les mâles des femelles sur des critères macroscopiques et donné comme caractéristique aux mâles d'avoir la tête plus grosse et plus allongé et aux femelles d'avoir la tête plus aplatie (Aristote, *Historia animalium* Livre 4, Chapitre 2). Il était également stupéfait par le fait que ces poissons ne produisaient ni lait, ni œufs et n'engendraient pas, ce qui l'avait amené à conclure que cette espèce mystérieuse naissait des entrailles de la terre (Aristote, *Historia animalium* Livre 6, Chapitre 13,14,16). Ce caractère énigmatique de l'anguille a également conduit les philosophes de l'époque à considérer ce poisson comme une espèce médiatrice. En effet, en Grèce antique, le profil littéralement et métaphoriquement insaisissable de l'anguille lui avait conféré des pouvoirs de réconciliation (Cochin, 1986).

Dans la croyance Polynésienne, l'anguille est le poisson qui donna naissance à certaines îles de l'archipel mais également aux cocotiers, emblèmes de la Polynésie.

A l'heure actuelle, les mystères qui entourent le cycle de vie de l'anguille servent de soutien aux thèses créationnistes (L'anguille, un défi à l'Evolutionnisme, 26/03/2008, <http://www.theonoptie.com/spip.php?article1885>).

1.1.2. Cycle de vie de l'anguille européenne

L'anguille européenne *Anguilla anguilla* (Linné, 1758), qui fait partie de la famille des *Anguillidae* (18 espèces), est une espèce Thalassotoque, dans la mesure où elle effectue la majeure partie de sa vie en eau douce et se reproduit en mer (Fig. 1).

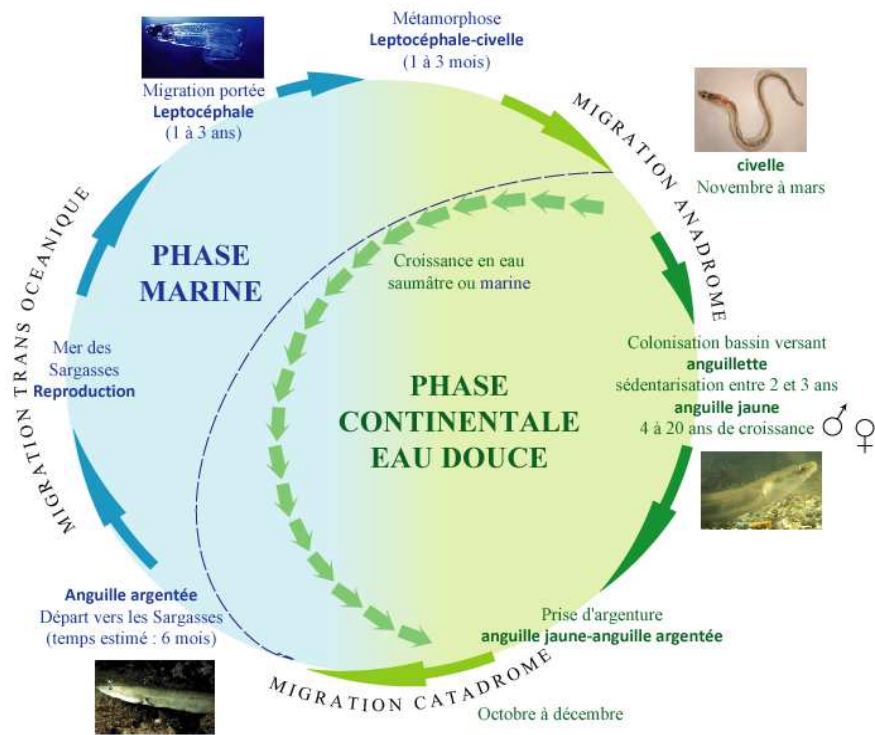


Fig. 1. Cycle de vie de l'anguille européenne *Anguilla anguilla*, caractérisé par deux métamorphoses précédant chaque migration.

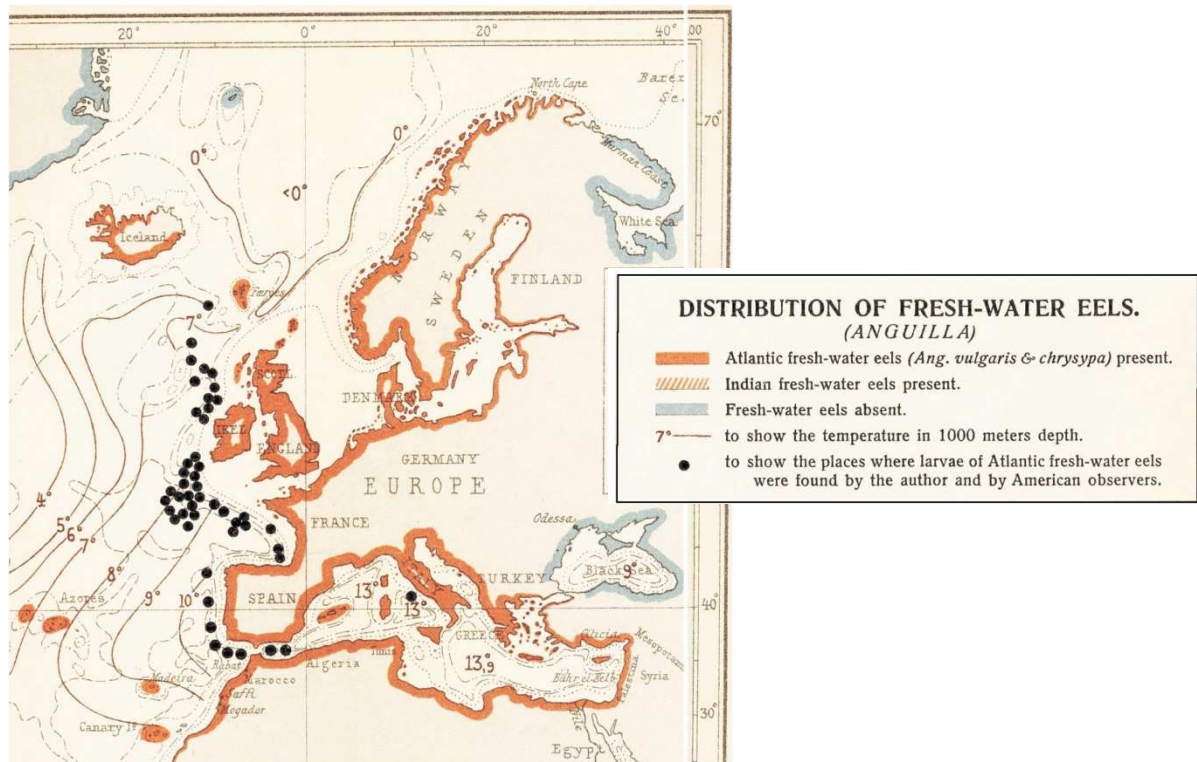


Fig. 2. Aire de répartition de l'anguille Européenne *Anguilla anguilla* représentée en orange, d'après Schmidt (1909)

Actuellement, l'espèce est considérée comme panmictique, car une seule aire de reproduction a été identifiée (Schmidt, 1922), au large de la Floride. L'identification du lieu de reproduction repose uniquement sur l'échantillonnage de larves (leptocéphales) de taille décroissante à mesure que l'on approche de la mer des sargasses (McCleave *et al.* 1987).

Des études génétiques ont remis en cause cette panmixie (Wirth et Bernatchez, 2001 ; Maes et Volckaert, 2002), mais les travaux les plus récents tendent à la confirmer (Dannewitz *et al.* 2005 ; Palm *et al.* 2009 ; Als *et al.* 2011).

Les larves leptocéphales se laisseraient porter par le Gulf Stream puis le courant Nord Atlantique pour atteindre les côtes Est (Power et McCleave, 1983; Kettle et Haines, 2006). L'aire de répartition de l'anguille a été établie par Schmidt en 1909 (Fig.2) et n'a que très peu changée depuis (Dekker, 2003b).

Une fois le plateau continental atteint, les larves leptocéphales se métamorphosent en civelles (1 à 3 mois) et acquièrent progressivement leur forme définitive. La progression dans l'estuaire est accompagnée d'une pigmentation progressive du corps. Par la suite, les individus colonisent le bassin versant pour croître, c'est le stade d'anguille jaune.

Enfin les anguilles subissent une seconde métamorphose pour atteindre le stade argenté. C'est à ce stade que les individus entreprennent leur dévalaison puis leur migration océanique pour se reproduire et vraisemblablement mourir (Schmidt, 1925). Il est important de noter que les mâles partent en mer plus tôt que les femelles et à une taille inférieure. L'anguille constitue donc un excellent modèle pour comprendre comment la valeur sélective¹ peut contraindre les comportements, puisqu'elle effectue deux longues migrations dans deux buts ultimes : croître et se reproduire.

Dans les chapitres suivants, il sera souvent fait état d'autres espèces d'anguilles (Fig. 3), telle que l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*), qui partage le même site de ponte que l'Européenne (McCleave *et al.* 1987), l'anguille japonaise (*Anguilla japonica*) et la grande anguille Marbrée (*Anguilla marmorata*) qui partagent également un site de ponte commun proche de la fosse des Mariannes dans le pacifique (Tsukamoto, 2006 ; Tsukamoto *et al.* 2011) et deux espèces d'anguilles endémiques d'Océanie (*Anguilla dieffenbachii* et *Anguilla australis*). Toutes ces espèces partagent de nombreux points communs, que ce soit sur le plan physiologique et/ou écologique.

¹ Valeur sélective, en anglais fitness, décrit la capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire.

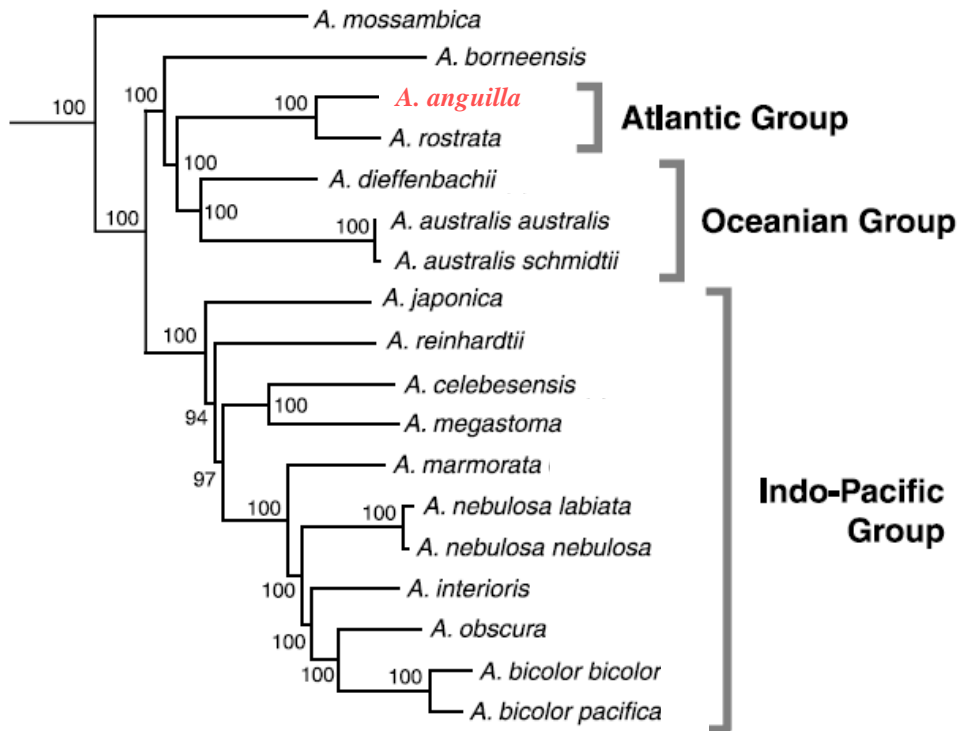


Fig. 3 Arbre Phylogénétique des *Anguillidae* construit à partir des séquences d'ADN mitochondrial de toutes les espèces du genre *Anguilla*, d'après Minegishi *et al.* 2005.

1.1.3. Diadromie chez l'anguille

La diadromie est apparue chez des groupes de poissons phylogénétiquement distants (McDowall, 1997). Ces poissons diadromes ont une importance écologique non négligeable dans la mesure où ils sont à l'origine de flux énergétiques entre l'eau douce et l'eau de mer (Helfman, 2007) et de ce point de vue, pourraient être considérés comme des espèces clefs (« keystone species » Willson et Halupka, 1995). D'un point de vue théorique la sélection naturelle devrait contraindre les animaux vers les lieux où leur valeur sélective est maximisée (Barash, 1982). Chez les poissons migrateurs amphihalins, cette stratégie d'utilisation de l'habitat devrait être conditionnée par le gain apporté par cette migration (Werner et Gilliam, 1984 ; Jonsson et Jonsson, 1993). Néanmoins, il a été montré que dans les zones tempérées la production en mer outrepassait largement la production en eau douce (Gross *et al.* 1988). Ceci rend la stratégie de migration anadrome de l'anguille Européenne paradoxale, d'autant qu'il a été montré que la croissance en eau salée/saumâtre était nettement supérieure à la croissance en eau douce (Naismith et Knights, 1993 ; Acou *et al.* 2003 ; Daverat et Tomas, 2006 ; Melia *et al.* 2006). Ces différences de croissance associées à l'habitat ne sont pas obligatoirement liées à la production du milieu et pourraient directement être dues à l'appétence (Edeline *et al.* 2005a) et/ou la production d'hormones de croissance dues aux propriétés intrinsèques de l'eau de mer (Beckman *et al.* 1998 ; Kalujnaia *et al.* 2007a, b). Néanmoins, les stress physiologiques associés à une vie en eau douce seraient moins conséquents que ceux associés à la vie en mer (Spittka, 1985) et pourraient expliquer l'émergence de cette stratégie.

L'hypothèse d'une mortalité supérieure en mer a également été proposée pour expliquer ce comportement migratoire, mais aucun élément n'a permis de mettre en évidence une mortalité différentielle en fonction du milieu (Cairns *et al.* 2009).

L'hypothèse d'un ancêtre commun tropical a donc été avancée pour expliquer la migration vers un milieu dulçaquicole (Gross *et al.* 1988 ; Edeline *et al.* 2007). En effet, la production océanique dans les milieux tropicaux est au contraire plus faible que la production en eau douce (Tzeng *et al.* 2002). Selon Aoyama *et al.* (2001), l'espèce la plus ancestrale serait *A. borneensis* alors que pour Minegishi *et al.* (2005), l'ancêtre commun serait *A. mossambica* (Fig. 3). D'après ces derniers auteurs, la spéciation entre ces *Anguillidae* aurait commencé il y a 20 millions d'années. Bien que des désaccords soient apparus quant aux mécanismes qui ont conduit à ces spéciations, l'origine d'un ancêtre commun tropical ne semble faire aucun doute.

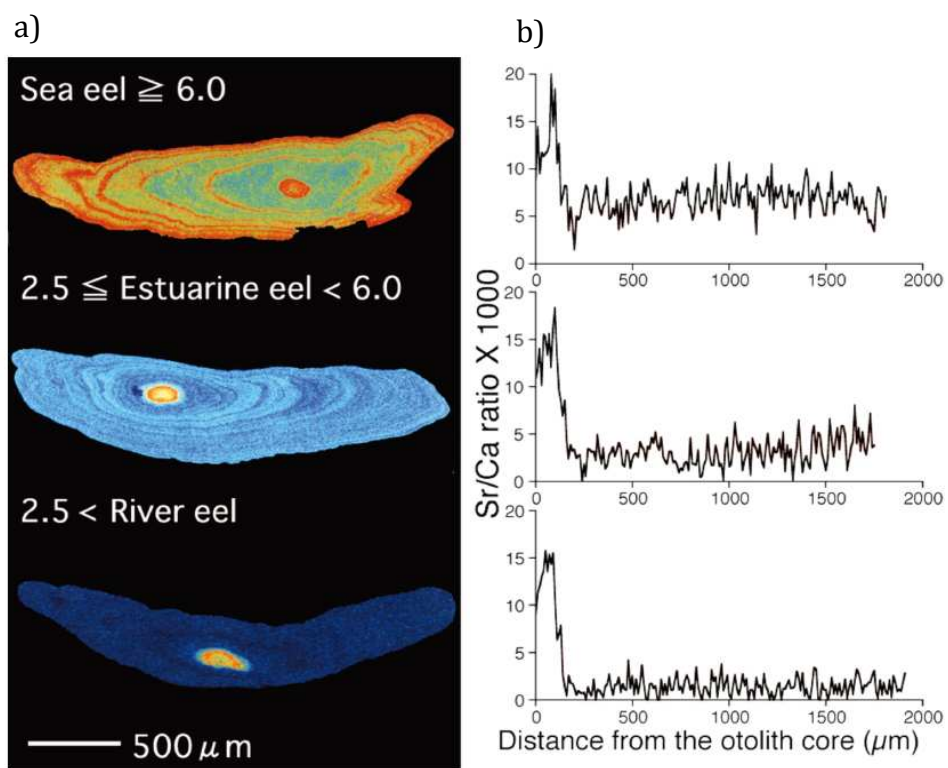


Fig. 4 a) Otolithes représentant les 3 types d'habitat utilisé. En bleu, un habitat peu salin, jaune et orange pour de plus fortes salinités et b) le rapport strontium sur calcium (Sr :Ca) de ces otolithes. D'après Aoyama (2009)

Les études récentes liées à l'émergence d'un nouvel outil (microchimie des otolithes) ont permis de remettre en cause la diadromie comme étant une phase obligatoire chez *A. anguilla*, *A. Japonica*, *A. australis*, *A. dieffenbachii* et *A. rostrata* (Jessop et al. 2002 ; Daverat et al. 2006 ; Thibault et al. 2007 ; Tzeng et al. 2000, 2002, 2003 ; Tsukamoto et Arai, 2001 ; Arai et Chino, 2012). Daverat et al. (2006) ont distingué trois groupes d'individus chez chacune des trois espèces principales de l'hémisphère nord :

- ceux qui passent toute leur phase de croissance en eau douce,
- ceux qui passent toute leur phase de croissance en eau salée,
- les nomades.

Le rapport Strontium sur Calcium (Sr:Ca) des otolithes permettrait de discriminer ces groupes (Fig. 4a,b). Ces différentes stratégies soulèvent la question d'une possible augmentation de la proportion d'individus exclusivement marins et nomades ces dernières années, compte tenu des difficultés rencontrées pour coloniser les rivières, de l'assèchement des zones humides et des risques de mortalités associés à cette migration.

1.2. Les différentes phases de vie chez l'anguille

1.2.1. Phase Léptocéphale

C'est à Grassi (1896) que l'on doit l'identification des larves leptocéphales comme étant les premiers stades juvéniles d'anguilles. La larve leptocéphale consommerait moins de 50 % de l'énergie généralement utilisée par les autres larves de Téléostéens (Lecomte-Finiger et al. 2004), ce qui pourrait être à l'origine de leur plus grande survie à l'issue de leur migration (0,18 %) comparativement à beaucoup d'autres larves de téléostéens (Bonhommeau et al. 2009). La durée de la traversée est une question très controversée. En effet, Lecomte-Finiger (1992) a estimé cette traversée à 7-9 mois et Kettle et Haines (2006) l'ont estimé à plus de deux ans. Bonhommeau et al. (2009) ont estimé la traversée à 21 mois en se basant sur la modélisation des courants à partir de la mer des Sargasses. Ces auteurs considèrent comme très peu probable le fait que les individus utilisent une nage active lors de cette traversée, car les larves n'auraient que très peu de muscles (Bonhommeau et al. 2009). Néanmoins, Castonguay et McCleave (1987) ont montré que les larves effectuaient une migration verticale circadienne, possiblement pour éviter les prédateurs et/ou se nourrir. L'utilisation récente du barcoding a permis d'identifier le type de proies présentes dans les tractus digestifs

des leptocephales (Riemann *et al.* 2010). D'après cette étude, les hydrozoaires constitueraient la ressource la plus abondante pour ces larves (55%). Cependant, la très récente étude de Miller *et al.* (2012) dont les conclusions sont basées sur des analyses isotopiques conclue à une prise de nourriture à partir de neige marine. La période de métamorphose entre le stade leptocephale et le stade civelle serait comprise entre 32 et 80 jours (Wang et Tzeng 1998).

1.2.2. Phase Civelle

Dans les pays d'Europe occidentale, les civelles arrivent au niveau des estuaires principalement entre Octobre et Mars. Ce stade de vie constitue une étape clef du développement de l'anguille car les individus font face à de grands changements morphologiques, physiologiques et éthologiques lors de la transition entre l'eau de mer et l'eau douce (Elie et Rochard, 1994). Pendant cette métamorphose, les individus perdent un fort pourcentage d'eau (80%), qui les contraint probablement à une vie benthique (Otake, 2003). Les individus raccourcissent et se pigmentent progressivement à mesure qu'ils colonisent l'estuaire (Vilter, 1945 ; Elie *et al.* 1982). Lors de cette phase, la plupart des civelles cessent de se nourrir (Charlon et Blanc, 1983 ; Desaunay et Guerault, 1997), bien qu'un certain pourcentage (\approx 10-15%) puissent s'alimenter, peut être en lien avec une sédentarisation estuarienne (Bardonnnet et Riera, 2005b).

Pour traverser l'estuaire, les civelles utilisent le transport tidal sélectif (McCleave et Kleckner, 1982 ; Gascuel, 1986 ; Forward et Tankersley, 2001), en montant dans la colonne d'eau lors du flot pour se déplacer vers l'amont et en redescendant pour éventuellement s'enfouir dans le substrat lors du jusant. Ce type de transport permet de rejoindre la limite de marée dynamique en limitant les dépenses énergétiques (Hickman, 1981). Selon Weihs (1978) cette migration spécifique permettrait d'économiser plus de 80% d'énergie chez les petits poissons. Il a également été observé que certains poissons migraient vers l'amont pendant le jusant (Creutzberg, 1961), une stratégie potentiellement plus coûteuse en énergie. Une récente étude (Bolliet et Labonne 2008) reproduisant les conditions d'inversion du courant de marée en laboratoire a permis d'identifier ces deux types d'individus (rhéotaxie positive et négative). Les individus qui montrent une préférence pour la nage à contre courant présentent des caractéristiques physiologiques et biométriques particulières, avec des niveaux d'hormones thyroïdiennes élevés et un facteur de condition supérieur à celui des autres individus (Edeline *et al.* 2004, 2005b, 2006). Outre les facteurs physiologiques qui influenceraient les différents types de comportements migratoires, l'environnement semble également jouer un rôle

primordial. En effet, l'apparition de longs « cordons » de civelles autrefois observés par les pêcheurs, semblait conditionnée par l'obscurité (Creutzberg, 1961 ; Jellyman, 1977 ; Gascuel, 1986). En conditions expérimentales, le crépuscule induirait également la migration (Bardonnnet *et al.* 2003, 2005) de même que les odeurs portées par les eaux continentales (Creutzberg, 1959). Une fois la limite de marée dynamique franchie, les individus recommencent à se nourrir de manière généraliste, ce qui se traduit par une augmentation rapide du facteur de condition (Peterson et Martin-Robichaud, 1994).

1.2.3. Phase Anguilette/Anguille Jaune

Bien que cette phase soit déterminante pour la colonisation du bassin versant (Moriarty, 1987 ; Legault, 1996 ; Laffaille *et al.* 2000) et la valeur sélective des individus (en conditionnant la croissance), elle est paradoxalement la moins étudiée. Une fois la limite de marée dynamique franchie, des anguillettes d'une taille moyenne de 13 cm colonisent le bassin versant (Laffaille *et al.* 2000) et la température de l'eau serait le facteur majeur influençant cette montaison avec un seuil déclenchant compris entre 14-16°C (White et Knights, 1997). La recherche d'un habitat propice (faibles courants associés et une faible profondeur) contribuerait également à la décision de migrer (Feunteun *et al.* 2003). Les cycles lunaires (avec des pics de migration à la nouvelle lune) pourraient également avoir le rôle de stimulus (Tzeng, 1985 ; Sugeha *et al.* 2001). Cependant, comme évoqué précédemment, cette migration pourrait être facultative et certains individus resteraient en mer ou en estuaire, participant ainsi au gradient de densité qui diminue en allant vers l'amont (Edeline *et al.* 2009). A contrario, certains petits individus seraient capables de parcourir de très longues distances en un laps de temps très court (plus de 250 km en amont de l'estuaire Loire, Legault, 1996). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer la mise en place d'un gradient de densité le long du bassin versant (Ibbotson *et al.* 2002) :

- 1) Les anguilles pourraient migrer progressivement en étant « poussées » vers l'amont à mesure que les différentes cohortes arrivent, ce qui aurait pour conséquence directe l'absence de vieilles anguilles à l'aval.
- 2) les individus se disperseraient dans toutes les directions de sorte qu'à chaque arrivée de cohorte la proportion d'individus diminuerait en allant vers l'amont.

Pour Ibbotson *et al.* (2002), c'est cette seconde hypothèse qui prévaudrait sur la première et se décomposerait en deux phases distinctes : 1) phase de dispersion rapide des anguillettes vers

l'amont qui serait influencée par des facteurs externes tels que la densité, et 2) phase où les jeunes anguilles jaunes se disperseraient dans tous les sens.

Feunteun *et al.* (2003) proposent quant à eux 2 stratégies majeures chez les anguillettes :

- Les individus « pionniers » qui migreraient vers l'amont indépendamment des conditions de densité locale et des conditions environnementales.
- Les individus « fondateurs » qui migreraient vers l'amont jusqu'à ce qu'ils trouvent un habitat favorable et libre (potentiellement avec de faibles densités).

Par la suite les anguilles jaunes auraient également 2 types de comportements :

- Territorial : avec de faibles déplacements autour d'une zone (exemple : dans la rivière du Frémur, plus de 95 % des anguilles marquées et recapturées pendant 4 ans étaient dans un rayon de 100 m autour de leur emplacement initial, Guillouët *et al.* 2000).
- Les nomades qui utiliseraient différentes zones (de la mer à l'eau douce)

Les relations intra-spécifiques et les risques de prédation pourraient également influencer ce schéma de dispersion. En effet, exception faite de l'homme, le plus grand prédateur naturel de l'anguille pourrait bien être l'anguille elle-même. Le cannibalisme a été constaté à de nombreuses reprises chez cette espèce (Dagani et Levanon, 1983 ; Edeline *et al.* 2005a). En conditions d'aquaculture il a été observé que le cannibalisme augmente (de 19% à 42%) à mesure que la densité d'individus augmente (0.3 kg/m^2 à 1 kg/m^2). Ce résultat serait probablement lié aux différences de croissance accentuées dans des conditions de forte densité (Dagani et Levanon, 1983).

1.2.4. Phase Anguille argentée

Les processus qui déclenchent l'argenture et la dévalaison sont encore mal connus, bien qu'une convergence d'éléments puisse permettre d'expliquer ces phénomènes. La dévalaison s'effectuerait principalement entre août et décembre dans l'hémisphère nord et serait conditionnée par des variables développementales (sexe, taille, âge/croissance, contenu énergétique) et environnementales ($T^\circ\text{C}$, photopériode, condition hydrologiques) (Oliveira, 1999 ; Haro, 2003). En effet la majorité des individus dévalent quand les températures chutent, en période de hautes eaux et préférentiellement de nuit (Haro, 2003). Les processus physiologiques qui accompagnent la prise d'argenture sont multiples. La masse des ovaires augmente et le rapport gonadosomatique (RGS : poids des gonades rapporté au poids total)

passé d'environ 0.3 chez l'anguille jaune à 1.5 chez l'anguille en début d'argenture (Durif *et al.* 2000).

Les femelles de plus de 65 cm seraient capables de produire entre 6 et 14 millions d'œufs (Tremblay, 2009). La peau s'épaissit (Saglio *et al.* 1988) et le diamètre oculaire augmente (Pankhurst, 1982). L'accroissement de la taille des yeux est proportionnel à l'accroissement de la gonade (Boëtius et Boëtius, 1967 ; Olivereau et Olivereau, 1985). Les mâles partent se reproduire plus tôt que les femelles (mâles : 2.5-9.1 ans *vs* femelles 3.4-12.3) et à des poids inférieurs (mâles : 78 et 410 gr *vs* femelles 309 et 830 gr) (Beullens *et al.* 1997 a,b).

L'utilisation récente de traqueurs (pop-up) satellite a permis de suivre des individus se dirigeant vers la mer des sargasses à ~6000 km de nos côtes (Aarestrup *et al.* 2009), sans toutefois atteindre leur but (arrêt des enregistrements après 2000 km de migration). Les données accumulées ont néanmoins permis de mettre en évidence l'existence d'une migration verticale nyctémérale où les individus passent de -200 m de nuit à -1000 de jour. Aarestrup *et al.* (2009) suggèrent que cette migration verticale permettrait d'éviter les prédateurs et d'augmenter le temps de nutrition. Ces hypothèses sont très controversées car les individus ne se nourriraient pas pendant leur migration et il a été montré que l'énergie accumulée avant le départ serait suffisante pour effectuer la migration (Van Ginneken et Van den Thillart 2000). Ces migrations verticales journalières engendreraient une augmentation massive de la taille de la vessie natatoire sous l'effet de la décompression (la vessie natatoire devrait atteindre 1 m³, P. Sebert, communication personnelle). Elle pourrait vraisemblablement être la conséquence de la prédation, puisque ce schéma de migration nyctémérale est très proche de celui des cétacés. En effet, les marques pop-up pourraient avoir rendu les anguilles très vulnérables à la prédation en diminuant les capacités de nage des anguilles (Burgerhout *et al.* 2011).

Néanmoins, la plupart des auteurs s'accordent sur le fait que les anguilles migrent en profondeur. La seule photo existante d'anguille a été prise à -2000 m au large des Bahamas (Robins *et al.* 1979). La migration à de telles profondeurs permettrait la maturation des gonades sous l'effet de la pression (Dufour et Fontaine, 1985 ; Sebert *et al.* 2007). L'étude récente d'otolithes de larves pré-léptocéphales d'anguilles japonaise a permis d'établir que la reproduction interviendrait peu avant la nouvelle lune (Tsukamoto, 2006). Cependant, les mécanismes d'orientation vers le lieu de reproduction demeurent inconnus. La température et l'olfaction pourraient jouer un rôle dans l'orientation des anguilles (Westin, 1990). Mais la piste la plus probable est sans doute celle du champ magnétique terrestre (Tesch et Rohlf, 2003).

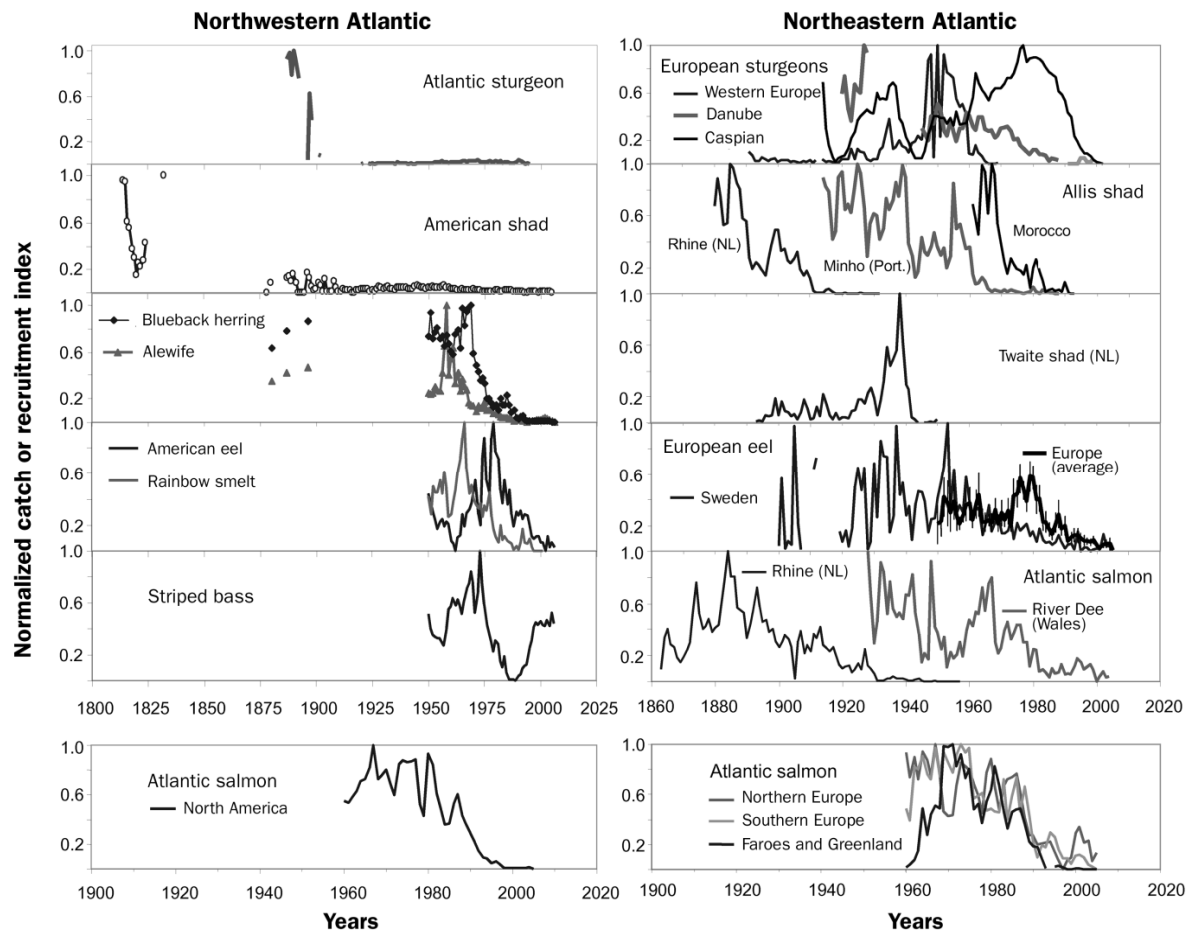


Fig. 5. Séries temporelles des indices d'abondance de plusieurs espèces diadromes d'Atlantique Nord. D'après Limburg et Waldman (2009).

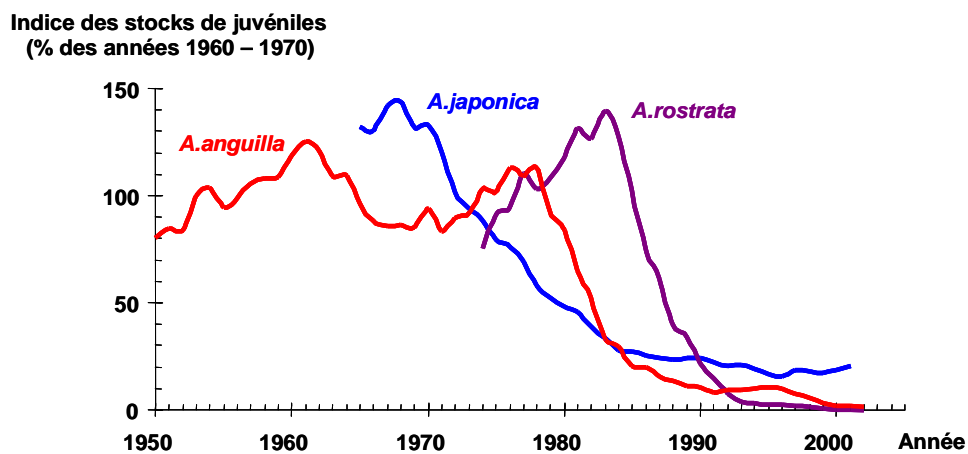


Fig. 6. Déclin des trois principaux stocks d'anguilles tempérées, l'anguille européenne *Anguilla anguilla*, l'anguille japonaise *Anguilla japonica* et l'anguille américaine *Anguilla rostrata*, d'après Dekker et al. (2003b).

La sensibilité au champ magnétique a été montrée chez les civelles, les anguilles jaune et les anguilles argentées (Nishi *et al.* 2004 ; Nishi et Kawamura, 2005). L'organe sensoriel permettant cette détection n'a pas été précisément localisé, mais il se situerait dans la zone de l'organe olfactif (Nishi *et al.* 2005). Les avancées récentes chez les oiseaux, et notamment les pigeons, pourront peut être permettre d'élucider le mystère (Wu et Dickman, 2012).

1.3. Déclin du stock

Il y a quelques dizaines d'années, l'anguille était considérée comme une espèce nuisible (Bruslé, 1990). Cependant, ce statut a rapidement changé et elle est à l'heure actuelle placée sur la liste rouge des espèces en danger critique d'extinction (UICN France, MNHN, SFI et ONEMA, 2010). De plus, l'anguille européenne est inscrite sur l'annexe II de la CITES, ce qui permet une bonne traçabilité et l'établissement de quotas d'exportation hors Union Européenne. Cette chute des abondances est à mettre en parallèle avec l'écroulement des stocks de nombreux poissons diadromes en Atlantique Nord, ces dernières années, suggérant un fort impact anthropique (Fig. 5, Limburg et Waldman, 2009).

Ce déclin touche les 3 grandes populations d'anguilles tempérées que sont :

A. anguilla, *A. japonica* et *A. rostrata* (Dekker, 2003a,b ; Tatsukawa, 2003) (Fig. 6).

A titre d'exemple la pêche de l'anguille américaine dans le St Laurent est passée de 400 tonnes en 1990 à moins de 72 tonnes en 2007 (ICES, 2008). Cette diminution des stocks se traduit directement à l'échelle du bassin versant, par une diminution des densités de civelles (Fig. 7) mais également au niveau du nombre de dévalantes (Verbiest *et al.* 2012). Ces auteurs ont constaté récemment que seuls 15 % des anguilles préalablement marquées parvenaient à rejoindre la mer.

Différentes causes ont été invoquées pour expliquer le déclin de l'espèce. Parmi ces raisons on peut citer la raréfaction des habitats favorables, la surpêche, la pollution, l'introduction de parasites (Haro *et al.* 2000 ; Dekker, 2004) et les changements de conditions océaniques (Friedland *et al.* 2007 ; Bonhommeau *et al.* 2009). L'introduction accidentelle dans les années 80 du parasite *Anguillicolla crassus* (en provenance de l'anguille japonaise), a probablement aussi contribué au déclin du stock. En effet, ce parasite induit de nombreux dommages (réduction de la concentration en oxygène dans la vessie natatoire, hémorragies) (Kennedy, 2007) et pourrait largement compromettre la migration et la reproduction des anguilles argentées (Van Ginneken *et al.* 2005a ; Palstra *et al.* 2007b).

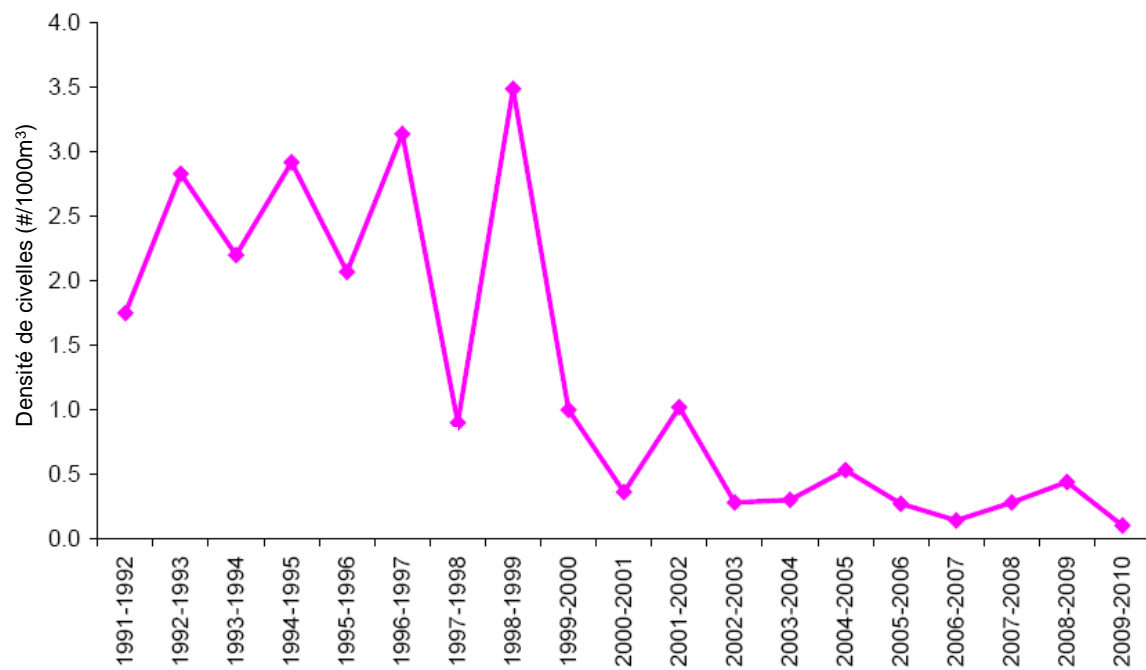


Fig. 7. Densité de civelles dans la Gironde en fonction de l'année de pêche. D'après EIFAC/ICES WGEEL 2011.

- Plan de gestion

En 1983 le Conseil Européen (composé des chefs d'Etats et du président de la Commission Européenne) a décidé que la gestion des pêches serait traitée au niveau de l'Union Européenne. Cette politique commune des pêches a fait l'objet d'une réforme en 2002. L'objectif est de mieux concilier le principe d'une gestion équilibrée des ressources halieutiques avec les impératifs socio-économiques et territoriaux des activités de pêche. Dans la mesure où les anguilles sont exploitées par plusieurs pays européens, sa gestion nécessite des mesures de sauvegarde à grande échelle.

En ce qui concerne l'anguille, l'UE a institué plusieurs mesures en 2007, dont le but était de parvenir à augmenter le nombre d'anguilles qui partent se reproduire en mer. Dans chaque bassin, le nombre d'anguilles repartant vers la mer ne devra pas être inférieur à 40% des effectifs observés en 1980. Pour y parvenir l'UE propose à chacun des 19 Etats membres de :

- Limiter la pêche et les sources de mortalité directe
- Rendre la migration accessible
- Développer l'aquaculture
- Repeupler avec de jeunes anguilles

Parmi ces mesures, l'article 7 du règlement du Conseil de l'Union Européenne n°11000/2007 propose notamment que 35% des captures d'anguilles de moins de 12 cm soit réservé au repeuplement dans des lieux exempts de menaces directs (pollutions, parasites, virus). Ce chiffre devra passer à 60% en juin 2013.

Ce sont les deux derniers points qui nous interpellent dans le cadre de cette thèse, points sur lequel nous reviendrons par la suite.

1.4. Importance commerciale

Les premiers élevages d'anguilles sont apparus dans les années 50 au Japon et les années 70 en Europe. Ces élevages consistaient et consistent encore à élever des civelles car la reproduction de l'espèce n'est pas totalement maîtrisée. La maîtrise de la reproduction est en effet un enjeu majeur et beaucoup de scientifiques se sont intéressés au sujet. Les recherches Françaises et Japonaises ont largement contribué aux différentes avancées dans le domaine (citons notamment, pour la partie Française, les travaux de Fontaine YA, Fontaine M et

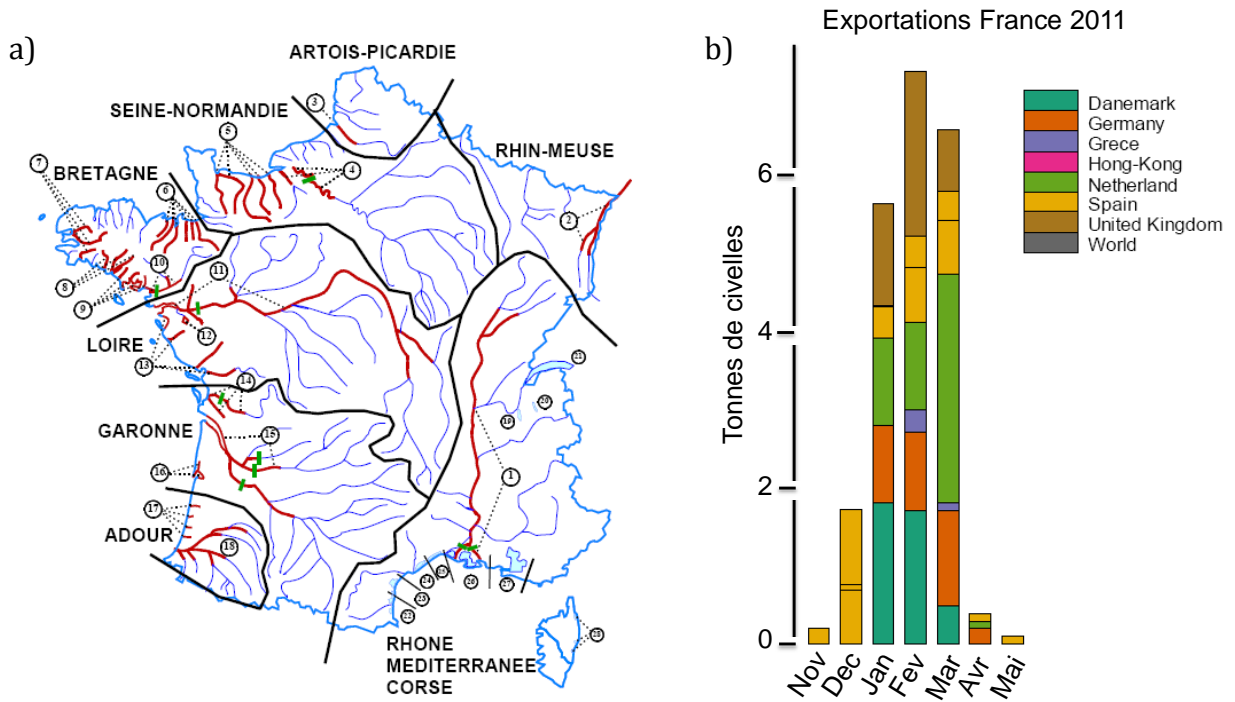


Fig. 8. a) Réseaux hydrographiques de France. Zones de pêche d'anguille indiquées en rouge et limites de marée dynamique en vert. Les zones délimitées par des traits noirs représentent les différentes unités de gestion. Les nombres correspondent à des zones de pêche et b) Exportations de civelles pêchées en France dans les différents pays en 2011. Source ICES 2011, country reports.

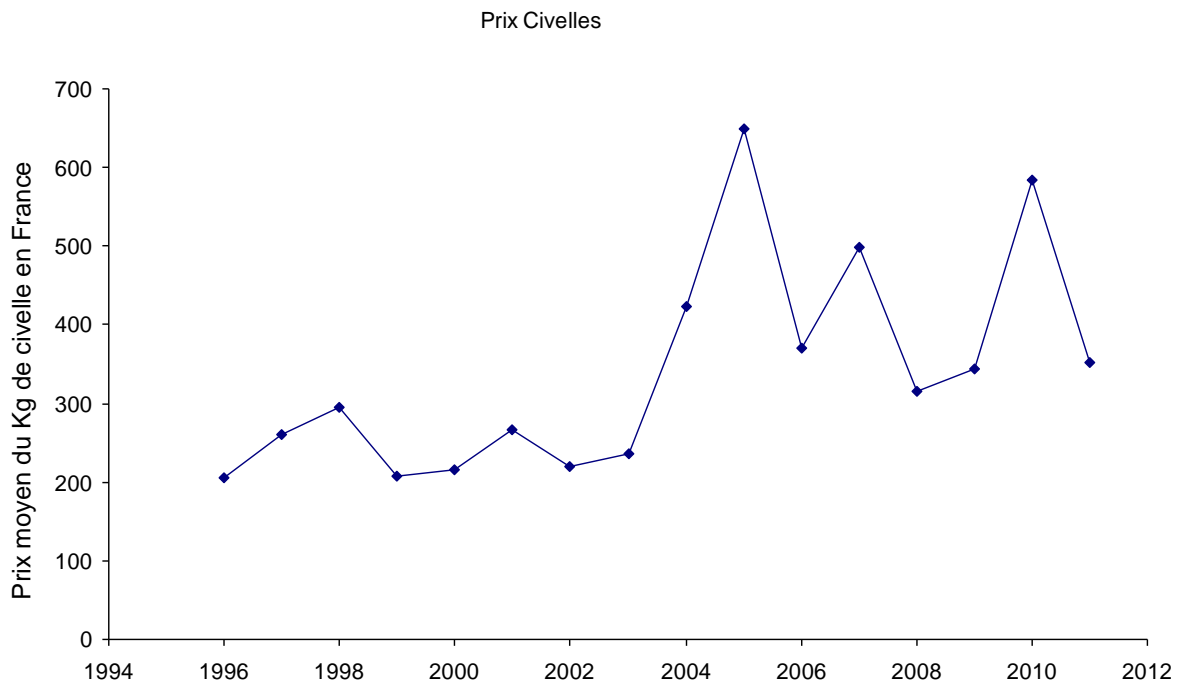


Fig. 9. Evolution du prix moyen du Kg de civelle en France depuis 15 ans. Source. Source ICES 2011, country reports.

Dufour S) sans doute portées et stimulées par la demande Européenne et Japonaise (le Japon est plus gros consommateur mondial avec 130000 tonnes par an). A titre de comparaison l'Europe consomme 10 fois moins d'anguilles et l'Allemagne, l'Italie et les Pays Bas représentent 80% de cette consommation (Ottolenghi *et al.* 2004, FAO).

Les premiers travaux sur le développement des gonades et l'émissions de gamètes chez l'anguille Européenne ont été conduit par M. Fontaine. Cet auteur fut en effet le premier à induire la maturation et l'ovulation de façon artificielle par l'administration de traitements gonadotropes (Fontaine, 1936 ; Fontaine *et al.* 1964). A l'heure actuelle, la plus grosse difficulté réside dans le grossissement des premiers stades et dans le manque de connaissances sur les nourritures adaptées. En 2001, Liao et Chang ont réussi à obtenir des larves de 31 mm à 209 jours. Mais le premier vrai succès concernant la reproduction et la survie des larves est arrivé en 2005 (Kagawa *et al.* 2005). Il faudra encore beaucoup d'années pour que le transfert de technologies puisse s'effectuer.

La pêche d'anguille est présente dans de nombreuses régions de France (Fig. 8 a) et constitue une des rares pêcheries dont les exportations dépassent les importations (FranceAgriMer2008), en particulier pour la pêche à la civelle (Fig. 8 b).

Ces dernières années on constate une diminution croissante des importations. En 2007, l'Europe fournissait 50 à 60 tonnes de civelles par an, alors qu'elle en fournissait entre 250 et 1000 tonnes les années précédentes (Rapport EIFAC/ICES, WGEEL 2008 ; Ottolenghi *et al.* 2004, FAO). Cette diminution de la ressource est, de fait, accompagnée d'une augmentation des prix (Fig. 9).

1.5. Déterminisme du Sexe

1.5.1. Le déterminisme génotypique du sexe

L'évolution de la proportion des sexes dans la population est une des questions majeures en biologie de l'évolution. Chez la plupart des espèces, les nombreuses observations ont rendu compte d'un sex-ratio équilibré (1:1). Par contre, les mécanismes sous-jacents sont restés inconnus pendant de nombreuses années. Darwin lui-même concluait sur le sujet: « **the whole problem is so intricate that it is safer to leave the solution for the future** » (Darwin, 1871). Soixante années ont été nécessaires pour qu'une première hypothèse expliquant ce phénomène soit apportée par Fisher (1930). Il considérait que la sélection naturelle favorisait les individus qui participaient à la production de mâles et de femelles de manière équilibrée.

Le processus aboutissant à ses conclusions tient en 6 étapes (Hamilton, 1967) :

- 1) Si dans une population donnée, on suppose que la naissance de mâles est moins commune que celle de femelles, alors :
- 2) chaque mâle qui naît a plus d'opportunités de se reproduire qu'une femelle.
- 3) De fait, les parents qui produisent des mâles vont avoir, en moyenne, plus de descendants que ceux qui produisent des femelles.
- 4) Les femelles deviennent alors le sexe rare.
- 5) qui est ensuite favorisé par la sélection naturelle. Par conséquent plus de femelles sont produites.
- 6) Le même raisonnement peut s'appliquer aux femelles.

Selon ce processus, l'installation progressive d'un sex-ratio à l'équilibre est en tout point similaire à l'équilibre obtenu suivant la « théorie de jeux » introduite par John Nash (1951).

L'obtention progressive d'un sex-ratio à l'équilibre est donc une stratégie évolutivement stable. En effet si cette stratégie est adoptée par presque tous les membres d'une population, alors aucune stratégie mutante ne peut la détrôner en envahissant la population sous l'influence de la sélection naturelle (Maynard Smith, 1982). Ce cadre théorique convient bien lorsque le déterminisme du sexe a lieu au moment de la conception et a donc un caractère héréditaire transmis selon les lois de Mendel. On parle alors de déterminisme génotypique du sexe (DGS) où le sexe hétérogamétique peut être le mâle (XY/XX) ou la femelle (ZW/ZZ).

A titre d'exemple, le sex-ratio de la population humaine à la naissance est bien en moyenne de 1:1, (http://www.nationmaster.com/graph/peo_sex_rat_at_bir-people-sex-ratio-at-birth),

1.5.2. Le déterminisme environnemental du sexe

Depuis l'introduction du « principe de Fisher », il a été montré que sous certaines conditions la sélection naturelle pourrait favoriser un déséquilibre du sex-ratio (Trivers et Willard, 1973). En effet, à l'échelle locale, il est probable que les conditions environnementales, influençant la condition physique, jouent un rôle sur la production de mâles et de femelles.

Selon Trivers and Willard (1973), la valeur sélective des mâles en bonne condition (produits par des femelles en bonne condition) devrait être supérieure à la valeur sélective des femelles chez les espèces où la condition physique des mâles détermine l'accès aux femelles (*i.e.* les

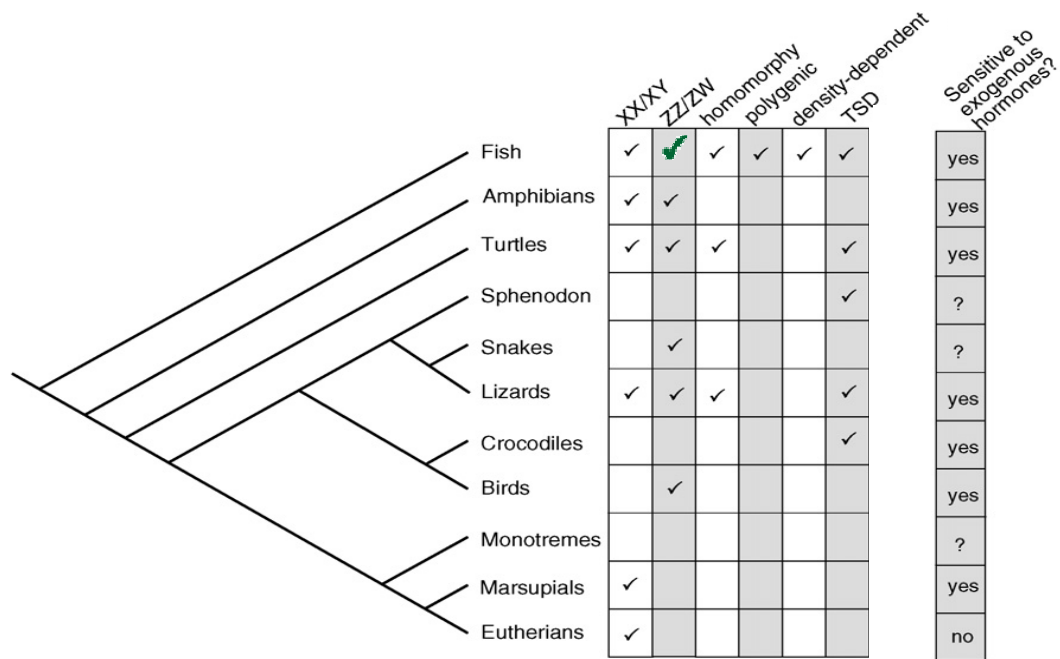


Fig. 10. Schéma modifié à partir de Barske et Capel 2008. ✓ Ajouté car chez de nombreuses espèces de poissons l'hétérogaméité concerne les femelles (voir Baroiller *et al.* 2009a).

gros mâles ont accès à plus de femelles que les petits mâles). Dans ce cas précis, le sex-ratio à la naissance devrait être biaisé vers les mâles.

A partir de ce raisonnement, Charnov et Bull (1977) ont bâti une théorie permettant d'expliquer les cas où un déterminisme du sexe « strictement génotypique » serait contre-sélectionné. Ces auteurs proposent que le déterminisme environnemental du sexe apparaisse si l'un des sexes est avantageux par rapport à l'autre. Cette stratégie se met en place pour assurer aux individus les plus forts (indépendamment de leur sexe) la meilleure valeur sélective (Conover 1984). Dans ce cadre, la protandrie² doit être sélectionnée dans les groupes de 2 individus car le nombre d'œufs produits par le groupe est dépendant de la taille de la femelle (Charnov 1982). A contrario, si le groupe dépasse 2 individus, alors la protogynie³ est la stratégie la plus stable, car les gros individus peuvent fertiliser plusieurs femelles.

Pour les espèces panmictiques, telles que l'anguille, l'évolution vers un système de détermination du sexe liée à l'environnement, prend tout son sens. En effet, les larves produites se dispersent dans un environnement totalement différent de celui des parents au moment de la reproduction, et un sexe pourrait être plus avantageux que l'autre pour s'adapter à ce nouvel environnement (Charnov et Bull, 1977). A la vue des différentes évolutions des espèces au cours du temps on comprend aisément que la sélection naturelle ait favorisé une pléthore de voies conduisant à la mise en place des sexes (Fig. 10).

Parmi les différentes conditions environnementales susceptibles d'influencer le déterminisme du sexe, la température est sans conteste la variable la plus étudiée, on parle alors de déterminisme du sexe température-dépendant (TSD). Un TSD a été détecté pour la première fois chez le lézard *Agama agama* (Charnier, 1966). Depuis, de nombreux cas de déterminisme du sexe température-dépendant ont été découverts chez les tortues, crocodiles et lézards. Il convient de souligner que des cas de déterminisme génotypique du sexe ont été également identifiés dans ces mêmes taxons (revue de Ciofi et Swingland, 1997).

En règle générale, les espèces sensibles aux facteurs environnementaux ne possèdent pas de chromosomes sexuels hétéromorphes, mais il a été montré, notamment chez les poissons, que l'environnement pouvait « supplanter » le sexe génotypique. C'est le cas chez la Capucette, *Menidia menidia*, une espèce gonochorique⁴, chez qui la température d'incubation des œufs

² Protandrie est définie comme le changement de sexe d'un organe mâle fonctionnel vers un organe femelle fonctionnel.

³ Protogynie est définie comme le changement de sexe d'un organe femelle fonctionnel vers un organe mâle fonctionnel.

⁴ Espèce à sexe séparé par opposition aux espèces hermaphrodites chez lesquelles l'ensemble ou une partie des individus pourra produire au cours de sa vie, les 2 types de gamètes, ovules et spermatozoïdes.

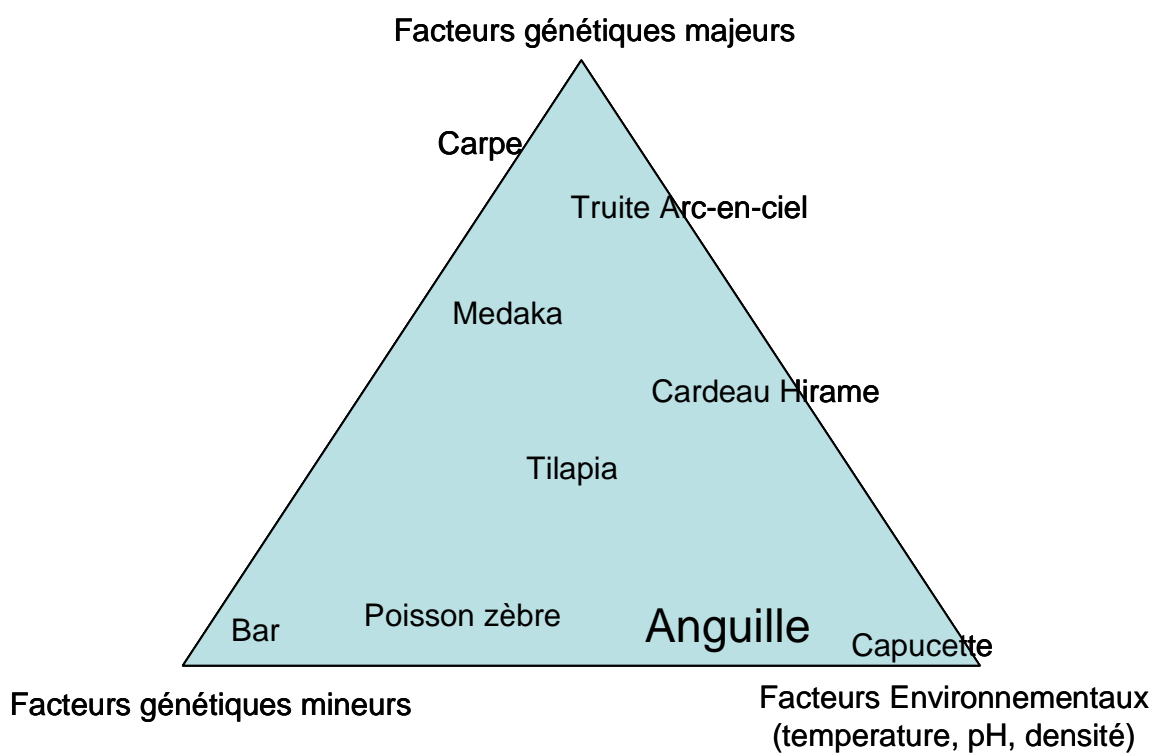


Fig. 11. Triangle schématique représentant les 3 facteurs influençant le sexe des poissons : Facteurs génétiques majeurs (porté par les chromosomes sexuels), facteurs génétiques mineurs et facteurs environnementaux. Quelques espèces considérées comme majeures (aquaculture, expérimentation ...) sont placées à l'intérieur du triangle. D'après Baroiller *et al.* 2009b. La place de l'anguille est choisie en fonction des connaissances actuelles.

est déterminante pour le futur sex-ratio (Conover et Kynard, 1981). En outre, cette espèce présente la particularité d'avoir un déterminisme du sexe dont le niveau de dépendance à la température est variable en fonction des populations et de la latitude (Lagomarsino et Conover, 1993). Plus récemment, il a été montré chez le Tilapia *Oreochromis niloticus*, une espèce hétérogamétique, que la température influence le sexe des poissons (Baroiller *et al.* 2009). De fait, il apparaît que la distinction entre déterminisme environnemental et déterminisme génotypique du sexe, ne serait pas si tranchée. En effet, la labilité du sexe des poissons et leurs différents seuils de sensibilité aux facteurs environnementaux a conduit les chercheurs à placer les espèces au sein d'un continuum qui irait du déterminisme génotypique pur au déterminisme environnemental pur (Fig. 11) (Valenzuela *et al.* 2003 ; Ospina-Alvarez et Piferrer, 2008). On devrait donc parler de **sensibilité aux facteurs externes** lors de la différenciation du sexe plutôt de « déterminisme environnemental du sexe » au sens strict, même si ce terme est largement plébiscité dans les différentes publications scientifiques.

Chez les poissons téléostéens un large panel de types de déterminisme du sexe a été décrit (Fig. 11). Les facteurs environnementaux les plus importants et les plus étudiés sont la température et le pH. Le déterminisme du sexe sous l'influence de la densité n'a été détecté que chez très peu d'espèces. On peut tout de même citer la lamproie marine (Smith, 1971) chez qui le sex-ratio des populations peut passer de 70% à 30% de mâles, lorsque les conditions de densité diminuent. Ce facteur, tout comme la température peut avoir une influence indirecte sur d'autres facteurs qui, en retour, agissent sur le déterminisme du sexe. En effet les conditions de densité peuvent influencer la croissance des individus *via* la compétition mais également les relations sociales.

Chez le poisson Paradis *Macropodus opercularis*, tous les individus passent par une phase juvénile femelle. L'inversion du sexe est liée à la croissance, elle-même étant sous l'influence de la compétition pour la nourriture. Les individus qui se développent le plus vite vont devenir mâles. De plus, la majeure partie des individus élevés en isolement tendent à devenir mâles (89%), tandis que le regroupement conduit à de larges proportions de femelles (66% dans des conditions de fortes densités) (Francis, 1992). La température et la lumière affectent également le déterminisme du sexe chez ces poissons (Francis, 1992). Le cas du poisson Paradis est représentatif de la plasticité sexuelle de la gonade chez les poissons et Yamamoto (1958, 1962) fut le premier à démontrer la plasticité de ce déterminisme chez le Medaka en contrebalançant l'importance du sexe chromosomique, grâce à l'administration d'hormones.

	Espèce	2n	Chromosomes Sexuels	Références
Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	38	ZW ?	Chiarelli <i>et al.</i> 1969
	<i>Anguilla anguilla</i>	38	Non	Sola <i>et al.</i> 1980
	<i>Anguilla anguilla</i>	38	ZW	Passakas, 1981
	<i>Anguilla anguilla</i>	38	ZW	Park et Grimm, 1981
	<i>Anguilla anguilla</i>	38	Non	Wiberg, 1983
				Nishikawa <i>et al.</i> 1971
	<i>Anguilla Japonica</i>	38	Non	
	<i>Anguilla Japonica</i>	38	ZW	Park et Kang, 1979
	<i>Anguilla rostrata</i>	38	Non	Sola <i>et al.</i> 1980
	<i>Anguilla rostrata</i>	38	ZW	Passakas, 1981
	<i>Anguilla rostrata</i>	38	ZW	Park et Grimm, 1981
Congridae	<i>Astroconger myriaster</i>	38	ZW	Park et Kang, 1979
	<i>Conger Japonicus</i>	38	ZW	Takai et Ojima, 1985
	<i>Conger conger</i>	38	Non	Salvadori <i>et al.</i> 1994
Muraenidae	<i>Gymnothorax eurostus</i>	42	XY	Takai et Ojima, 1985
	<i>Muraena helena</i>	42	Non	Cau <i>et al.</i> 1988
	<i>Gymnothorax unicolor</i>	42	Non	Deiana <i>et al.</i> 1990

Tableau 1 : Revue bibliographique des études portant sur l'existence de chromosomes sexuels chez quelques anguilliformes.

1.6. Cas de L'Anguille

Dès 1874, Münter a indiqué avoir disséqué 3000 anguilles sans toutefois détecter un seul mâle, ce qui l'a conduit à penser que l'anguille était parthénogénétique (voir Packard, 1879). Les études scientifiques qui ont suivi, conséquences de nombreuses observations de sex-ratios déséquilibrés dans la nature et en condition d'aquaculture, ont contribué au faisceau d'indications révélant que le déterminisme du sexe des anguilles est influencé par l'environnement. Néanmoins, l'étude de nombreuses variables environnementales a mis au jour certaines incertitudes et controverses quant à l'origine exacte du/des facteur(s) clefs influençant le déterminisme du sexe chez l'anguille.

1.6.1. Un Déterminisme Génotypique ?

Les techniques de coloration des chromosomes sont apparues dans les années 70 ; notons en particulier la technique dite du G-banding (qui utilise du Giemsa) qui produit des bandes sombres sur les chromosomes métaphasiques et du C-Banding (utilisent de l'oxyde de Baryum) qui permet de visualiser de façon très précise les centromères et les bras chromosomiques. Chez les anguilliformes et en particulier chez l'anguille, les techniques de coloration des chromosomes ont donné des résultats pour le moins ambigus et contradictoires concernant l'existence de chromosomes sexuels (Tableau 1). Chez *Anguilla anguilla*, la plupart des études sur le déterminisme du sexe qui ont suivi font référence à Wiberg, (1983) qui ne distingua pas de chromosomes sexuels. Sur des critères d'étude microscopique de la gonade, le sexe des individus ne peut pas être connu avant que les anguilles n'aient atteint **un minimum de 30 cm** (Tesh, 2003). Ceci complique les investigations sur les facteurs externes susceptibles d'influencer le déterminisme du sexe, dans la mesure où la fenêtre de différenciation du sexe est très large (Colombo et Grandi, 1996; Holmgren *et al.* 1997 ; Melia *et al.* 2006).

1.6.2. Un déterminisme Environnemental du sexe?

1.6.2.1. Evolution des sex-ratios dans la nature

Dans un article intitulé « The Breeding Habits of the Eel », Packard (1879) ne constate pas de

sex-ratio biaisé en milieu naturel. Néanmoins, les études produites par la suite ont permis de détecter des différences à l'échelle du bassin versant mais également à l'échelle continentale. De façon générale, les mâles se situent plutôt en zone estuarienne et les femelles en amont des bassins (Bertin, 1956; Vladykov, 1966; Helfman *et al.* 1987 ; Oliveira and McCleave, 2000 ; Oliveira *et al.* 2001).

D'Ancona (1958,1960) fut le premier à suggérer que la distribution des sexes dans le bassin versant était liée aux différentes tactiques migratoires caractérisant chaque sexe. Selon Sinha et Jones (1975), l'utilisation différentielle d'habitats est également due au fait que les femelles ont tendance à quitter les zones de trop fortes densités dans lesquelles, seuls les mâles seraient capables de survivre. Il est en effet possible que les individus aient un sexe génétiquement déterminé et choisissent différents environnements par la suite. Dans leurs exemples (D'Ancona, 1958, 1960 ; Sinha et Jones, 1975) le sexe des anguilles conditionne la tactique migratoire des individus. Néanmoins, des transplantations d'individus supportent plutôt l'hypothèse d'un déterminisme du sexe sous l'influence majeure de facteurs environnementaux (Bertin, 1956). De plus, des expériences menées dans des zones semi-fermées, telle que la lagune de Comacchio en Italie, montrent que le sexe des individus est fortement corrélé à l'effort de pêche. Lorsque l'exploitation est intense, une grande majorité de femelles est détectée et vice-versa (De Leo et Gatto, 1995). Les auteurs proposent que cela soit lié aux conditions de densité créées de façon artificielle. Les lacs avec de faibles taux de recrutement sont également des zones propices pour la production de femelles (Beentjes et Jellyman, 2003). En France, la rivière du Frémur fait l'objet d'un suivi régulier concernant la dynamique de la population d'anguilles. Si les conditions locales ont, pendant longtemps, favorisé une grosse production d'anguilles (50 anguilles jaunes/100 m²) dans cette rivière, conduisant à un fort pourcentage de mâles (69%) (Lafaille *et al.* 2006), les auteurs remarquent néanmoins un shift progressif du sex-ratio vers les femelles ces dernières années. En Irlande et en Angleterre, les études en milieu naturel rapportent également un fort déséquilibre en faveur des mâles lorsque les rivières présentent des densités d'individus très importantes et/ou que la capacité d'accueil du milieu atteint sa limite (Rosell *et al.* 2005, Bark *et al.* 2007).

Pour Vladykov (1966), la latitude influence également le sex-ratio, avec une majorité de mâles produite dans le Sud comparativement au Nord. Cependant, Oliveira *et al.* (2001) ont remis en cause ces hypothèses avec des changements de sex-ratio de l'ordre de 98 % pour des rivières situées à seulement 1° de latitude de différence.

1.6.2.2. Evolution des sex-ratios dans les conditions expérimentales

Salinité

Les fortes proportions de mâles observées en zone estuarienne ont suggéré que la concentration en sel favorisait la production de mâles. Cependant l'effet du sel *per se* n'a pas permis de mettre en évidence une production différentielle de mâle ou de femelle (Egusa et Hirose, 1973, cité dans Tesh 2003, p46).

Photopériode

A partir d'anguilles élevées depuis le stade civelle en cycle diurne complet, 20.7% de femelles ont été obtenues comparativement aux 17% de femelles produites en cycle nocturne complet (Appelbaum et Kugler, 1990), ce qui n'a donc pas permis de détecter de différences liées à la photopériode.

Température

Les premières expériences semblaient montrer que la production de mâles était plus importante dans les piscicultures d'eau chaude (D'Ancona, 1960). Plus tard, les études menées par Holmgren (1996) ont démontré que la proportion de femelles augmentait (de 7 à 14 %) avec la température (de 17 à 26°C). Cependant les fortes mortalités rencontrées dans la condition 26°C, jettent le doute sur l'effet de la température dans la mesure où les petits individus morts n'ont pas pu être sexés (Holmgren, 1996).

Densité

Egusa (1979) fut l'un des premiers auteurs à constater que les fortes densités en conditions d'aquaculture sont associées à un déséquilibre du sex-ratio qui penche en faveur des mâles chez *A. japonica* et *A. anguilla*. Plus tard Roncarati (1997) a confirmé l'effet de l'augmentation de la densité sur la production de mâles en conditions expérimentales.

Han et Tzeng (2006) constatent que le sex-ratio est biaisé en faveur des femelles (85%) dans des conditions de très faibles densités (0.01 ind/m²). Degani et Kushnirov (1992), ont démontré que le fait d'être en groupe chez des individus de 34-41 cm (13 individus) favorise

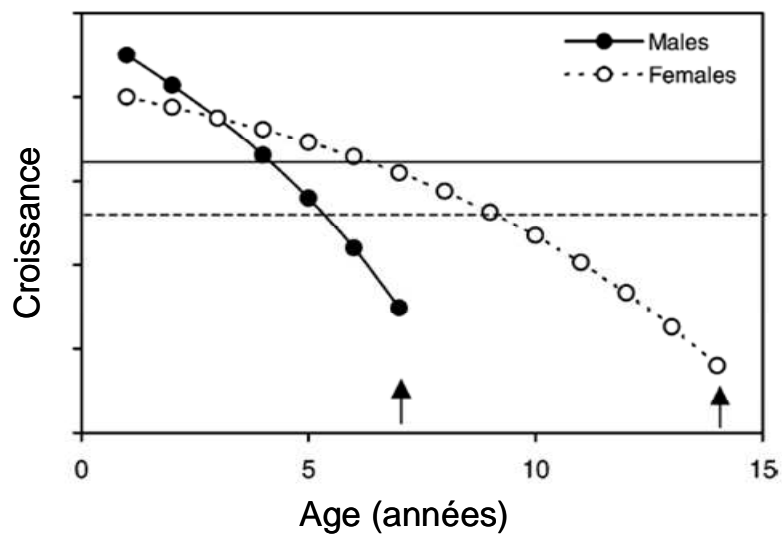


Fig. 12. Représentation de la croissance des individus en eau douce en fonction du temps à partir des prédictions de Helfman *et al.* (1987). Les flèches représentent l'âge moyen à la métamorphose en anguilles argentées et les traits pleins représentent la croissance moyenne au cours du temps. D'après Davey et Jellyman (2005).

la production de mâles (77%) et a contrario que le fait d'être isolé favorise le développement de femelles (60 % femelles). Cependant, cette dernière expérience soulève de nombreuses interrogations dans la mesure où la différenciation du sexe interviendrait bien plus tôt, entre 15 et 27 cm (Colombo et Grandi, 1996 ; Holmgren *et al.* 1997 ; Oliveira et McCleave, 2000 ; Melia *et al.* 2006).

Une étude récente a néanmoins contredit tous les résultats précédents. Elle constate que les fortes densités produisent une majorité de femelles (Huertas et Cerdà, 2006). Il convient cependant de noter que de très fortes mortalités (83,3%) sont relevées dans des conditions de plus forte densité, ce qui empêche de conclure sur l'effet de la densité *sensu stricto* dans le cas d'une mortalité sélective liée au sexe.

Chu *et al.* (2006) proposent que les fortes densités conduisent à une diminution de la nourriture (*via* la compétition), qui se traduit par une surproduction de mâles, plus petits.

Croissance

Exception faite de la photopériode, toutes les variables évoquées précédemment peuvent avoir un rôle non négligeable sur la croissance des individus, ce qui rend difficile l'évaluation du rôle de chaque facteur. En effet de fortes densités d'anguilles peuvent limiter la quantité de nourriture et/ou l'accès à la nourriture empêchant ainsi certains individus d'avoir une croissance optimale (Jellyman, 1997).

Sur la base de leurs tailles finales, Vladykov (1966) propose que les petites anguilles deviennent des mâles et que les plus grosses deviennent des femelles. Les nombreuses études qui ont suivi, ont donné des résultats contradictoires sur le sujet. Helfman *et al.* (1987) ont proposé que les mâles se reproduisent plus tôt et à une taille inférieure aux femelles, utilisant une stratégie dite « time-minimizing », qui les conduit à croître rapidement durant les premières années. Les femelles qui partent plus tard, utilisent une stratégie dite « size-maximizing », pour laquelle la taille finale des anguilles est déterminante quant à leur future valeur sélective (Fig. 12).

Ces prédictions ont été vérifiées par de nombreuses études expérimentales (Vøllestad et Jonsson, 1986 ; Holmgren et Mosegaard, 1996 ; Holmgren *et al.* 1997). Néanmoins, d'autres études ont montré des résultats radicalement opposés, où les femelles ont une croissance supérieure aux mâles (Vøllestad et Jonsson, 1986; Poole et Reynolds, 1996 ; Roncarati *et al.* 1997 ; Oliveira *et al.* 1999 ; Huertas et Cerdà 2006 ; Daverat *et al.* 2012). Il faut cependant noter que toutes ces expériences ont été réalisées sur des anguilles dont le sexe

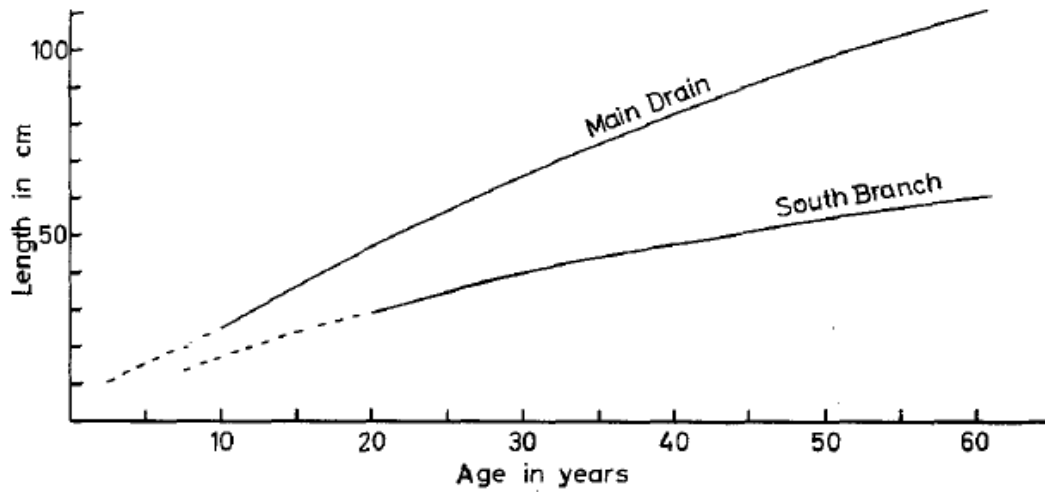


Fig. 13. Courbe de croissance établie à partir du profil individuel de croissance des anguilles en forte densité (South Branch 250 kg / ha) et en faible densité (Main Drain =135 kg / ha). Trait plein : croissance réelle à partir du données de capture-recapture et pointillées : rétro-calcul de l'âge à partir de lecture d'otolithes. D'après Burnet (1969).

était déjà différencié. Les mesures de croissance ont été prises à l'échelle du groupe, ou tardivement mais individuellement, à l'aide d'un rétro-calcul basé sur les incréments annuels des otolithes (et donc sujet à interprétation).

Burnett (1969) est le seul auteur à avoir suivi la croissance d'anguilles (*A. Dieffenbachii*) dans des conditions naturelles à l'aide d'un marquage individuel. Ces résultats indiquent que la population avec la plus faible densité (Main Drain =135 kg / ha vs South Branch 250 kg /ha), est celle présentant la meilleure croissance et qui produit le plus de femelles (20 % vs 2 %) (Fig. 13). L'auteur suggère également que la compétition induisant une relative malnutrition, conduit au développement de mâles.

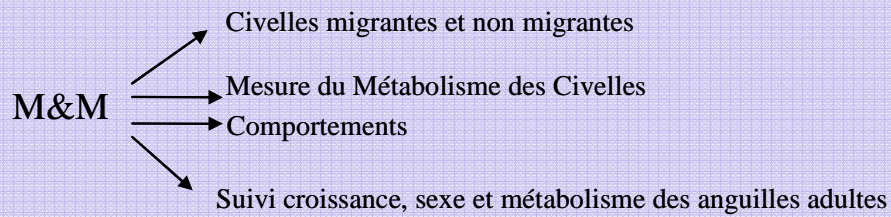
Il convient de noter qu'il n'existe pas de suivi individuel permettant d'appréhender, par des mesures directes, la croissance des anguilles durant leurs premiers mois de vie en eau douce en rapport avec leur futur sexe. Or, il apparaît que les facteurs environnementaux agissent sur le sexe des anguilles pendant ces premiers mois de croissance (Colombo et Grandi, 1996).

1.7. Problématique et présentation des travaux de thèse

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de la nouvelle directive du Conseil de l'Union Européenne (n°11000/2007) établissant que 60 % des anguillettes pêchées de moins de 12 cm doivent être dédiées au repeuplement en juin 2013. Le Groupement de recherche sur les migrateurs amphihalins (GRISAM) propose que ces repeuplements aient lieu dans des zones humides, des marais côtiers, des lagunes, des estuaires et des petits fleuves côtiers. Il souligne aussi que **l'introduction massive de jeunes anguilles peut avoir des conséquences majeures sur le sex-ratio** dans ces lieux de repeuplement (Briand *et al.* 2008) dans la mesure où la densité est un facteur prépondérant, influençant le déterminisme du sexe des individus.

La compétition entre anguillettes nouvellement implantées et anguilles occupant déjà la niche écologique peut conduire à des changements démographiques drastiques. En effet, le repeuplement de jeunes anguillettes dans une zone lacustre du nord de l'Irlande a conduit à une migration massive de mâles adultes vers les zones en aval (Parsons *et al.* 1977). De plus, le sex-ratio peut être bouleversé suite à ces introductions. Verreault *et al.* (2009) ont constaté un changement rapide du sex-ratio après l'introduction de 40000 civelles dans un lac ne produisant que des femelles (Castonguay *et al.* 1994, Verreault *et al.* 2009).

Partie I : Comportement et Croissance

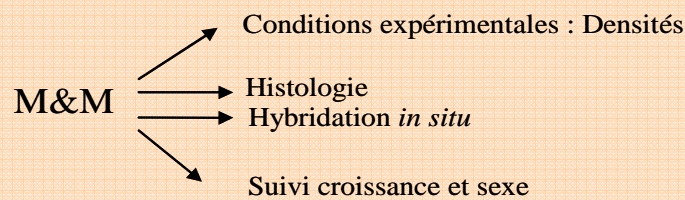


Le comportement animal et la Personnalité

Chapitres :

- 1 Article 1 : Differential effects of behaviour, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance
- 2 Article 2 : Is there a link between nocturnal and diurnal activity and elvers' growth rate ? A long term laboratory study
- 3 Article 3 : Behavioural reaction norms and Behavioural Syndrome in eels: When consistency in activity meets inconsistency in aggressiveness
- 4 Article 4 : Social network density influences rank-order consistency in aggressiveness
- 5 Relations entre métabolisme standard, croissance, comportements et sexe

Partie II : Croissance et Sexe



Différenciation sexuelle et Allocation sexuelle

Chapitres :

- 6 Article 5 : New insights regarding gonad development in European eel: evidence for a direct ovarian differentiation
- 7 Article 6 : Unusual cases of adult intersexuality in the European eel *Anguilla anguilla*
- 8 Relations entre densité, croissance et sexe

Fort de ces constats, ma thèse s'attachera à mieux comprendre les mécanismes qui conduisent au développement de tel ou tel sexe en se focalisant sur les relations interindividuelles, la densité et la croissance. Outre de nouvelles connaissances sur cette espèce, cette thèse a également pour but d'apporter des connaissances pour une meilleure gestion du stock.

La thèse est organisée en 2 grandes parties :

I) La première partie est dédiée à l'étude des relations interindividuelles et de la croissance sur le déterminisme du sexe, en s'affranchissant de l'effet densité. Elle sera réalisée sur plusieurs réplicas d'un même et petit nombre d'individus (8). Grâce à l'utilisation d'un marquage coloré, les comportements seront suivis à l'échelle individuelle. Du fait de l'utilisation différentielle de l'habitat des mâles (zone estuarienne) et femelles (zone amont), l'impact d'un comportement migratoire précoce permettant de discriminer 2 groupes d'individus (forte et faible propension à migrer) sera également pris en compte.

II) La seconde partie a pour but de tester l'influence de différentes densités sur le sex-ratio et également sur la croissance individuelle des anguilles. Pour ce faire, les civelles ont été placées dans des conditions de densité distinctes, la plus faible étant égale à celle de la première expérience ($\sim 64 \text{ ind/m}^2$). Cette étude permettra également d'étudier la différenciation du sexe et un marqueur physiologique précoce du sexe, l'aromatase, qui convertit les androgènes en œstrogènes.

Partie I

Comportement et Croissance

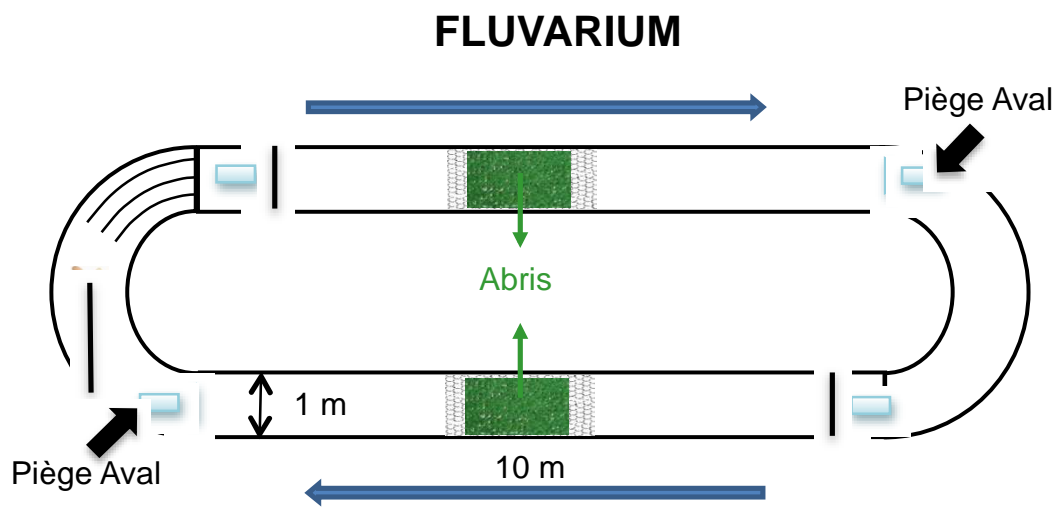


Fig. 14. Schéma du fluvarium.

2 Matériel et Méthodes I

Capture des individus et Tri expérimental

Dans le cadre de cette expérience, les civelles ont été récoltées au tamis à main en entrée d'estuaire à Moliets à l'automne et au printemps (respectivement le 18 novembre 2009 et le 18 mars 2010). À la suite de ces captures, les civelles ont été comptées puis séparées en deux lots d'effectifs équivalents dans les deux sections parallèles d'un grand aquarium annulaire (fluvarium, Fig. 14). Le but est de déterminer par un tri comportemental le potentiel migratoire de chaque individu (M- ou M+). Ce fluvarium possède 2 tronçons de 10 mètres de long, chacun équipé d'un piège amont et d'un piège aval adaptés à la capture des civelles. Le fluvarium est alimenté par l'eau de la rivière Nivelle, la température de l'eau est maintenue à $11,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ et la vitesse du courant est de 10 cm.s^{-1} à l'entrée des pièges. La photopériode est 12 h jour/12 h nuit avec 30 minutes de crépuscule entre 19 h et 19h30 et 30 minutes d'aube entre 7h et 7h30.

Pour réaliser ce tri comportemental, 650 civelles ont été placées dans chaque tronçon du fluvarium. Les individus avec une forte propension à migrer sont capturés dans les pièges aval à la tombée de la nuit (durant la première heure). Ces individus sont considérés comme ceux qui, à l'état naturel, profitent de la marée montante pour progresser dans l'estuaire. Les individus récupérés dans les abris le lendemain, étant ceux qui présentent une faible propension à migrer. Ce tri expérimental a été effectué 2 fois de suite sur les mêmes individus. Les poissons identifiés une première fois « forte » et « faible » propension à migrer, ont été ré-installés, respectivement dans les sections 1 et 2 du fluvarium. À la fin du second tri (durée totale de l'expérience, 5 jours), les individus ayant migré 2 fois après le crépuscule (M+) et les individus resté 2 fois dans les abris (M-) ont été conservés pour la suite des expériences, les autres ont été relâchés. L'étude de ces différents comportements migratoires avait fait l'objet d'une thèse conduite dans l'UMR ECOBIOP (Sarah Bureau du Colombier, 2009). Il avait alors été montré que les civelles avec une forte propension à migrer présentaient un contenu énergétique supérieure et perdaient moins de poids que les civelles avec une faible propension à migrer (Bureau du Colombier *et al.* 2007, 2008).

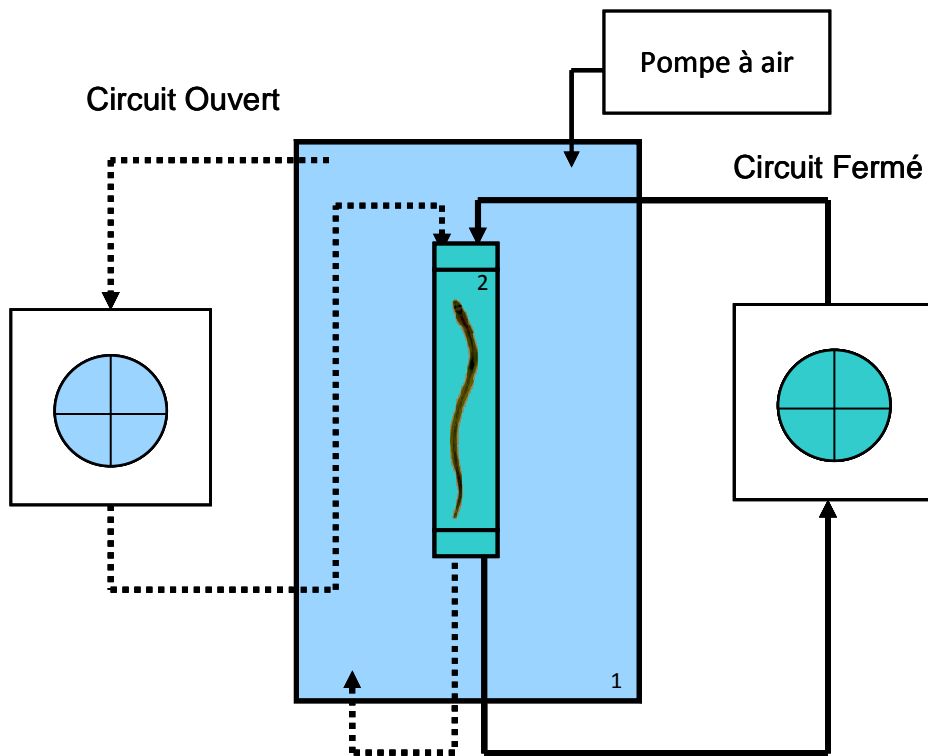


Fig. 15. Schéma du dispositif de respirométrie pour les civelles. 1 : Bac tampon de 10L, 2 : Chambre de micro-respirométrie. Pendant la phase de circuit ouvert l'eau de la chambre est renouvelée à partir de l'eau du bac tampon maintenue à saturation d'oxygène.



Fig. 16. Civelles dans chaque tube de microrespirométrie.

Mesure du métabolisme à l'échelle individuelle

A la suite de ce tri comportemental en fluvarium, 32 individus M- et 32 individus M+ d'automne et de printemps ont été aléatoirement choisis afin de déterminer le métabolisme standard de chaque individu. Le métabolisme standard est défini comme l'énergie nécessaire à un individu pour assurer ses fonctions vitales au repos. Il est mesuré à partir de la quantité d'oxygène consommé par un individu en un temps donné, lorsqu'il est au repos. Les civelles présentent les caractéristiques essentielles pour ce type d'expérience car elles ne se nourrissent théoriquement pas à l'état naturel lors de la remontée de l'estuaire et n'étaient donc pas nourris lors de cette expérience. Cette particularité permet de pouvoir calculer le métabolisme standard des civelles par opposition au métabolisme basal (pour les individus nourris ou se développant avec leurs réserves vitellines). Pour chaque individu, le métabolisme standard (en anglais SMR, exprimé en mm^3 d'oxygène par heure) a été calculé. D'autres techniques ont été mises en place par le passé pour mesurer le métabolisme, de la moins précise (*e.g.*, battements de cœur, Lucas *et al.* 1991, ou mouvements respiratoires, Millidine *et al.* 2008) à la plus précise (calorimétrie indirecte qui permet de mesurer la consommation d'oxygène, la production non fécale d'azote et la production de gaz carbonique, Bradfield 1985). La respirométrie est un peu moins informative que la calorimétrie indirecte, néanmoins, son utilisation s'avère moins onéreuse et suffisamment précise pour détecter des différences inter-individuelles de métabolisme à partir du stade œuf (Régnier *et al.* 2010). De plus chez les stades juvéniles de poissons, les différences entre les deux méthodes (calorimétrie indirecte et respirométrie) se sont avérées minimales (<2%, Kamler 1970). La consommation d'oxygène peut ensuite être convertie en énergie. Par exemple, chez les poissons (qui ne catabolisent approximativement que des protéines et des lipides), 13,6 Joules sont dépensés par mg d'oxygène consommés (revue de Kamler, 2008).

Le dispositif de respirométrie

Le métabolisme standard des civelles a été mesuré à l'aide d'un dispositif de micro-respirométrie composé de 8 chambres métaboliques en verre borosilicaté (longueur : 80 mm, diamètre : 13 mm) munies de capteurs à oxygène (pastille de 5mm de diamètre, type PSt3, Loligo Systems) reliées à 2 oxymètres 4 canaux (Oxy4-mini PreSens) par des fibres optiques (diamètre 2mm)(Fig. 15 et Fig. 16). Les oxymètres enregistrent les consommations d'oxygène

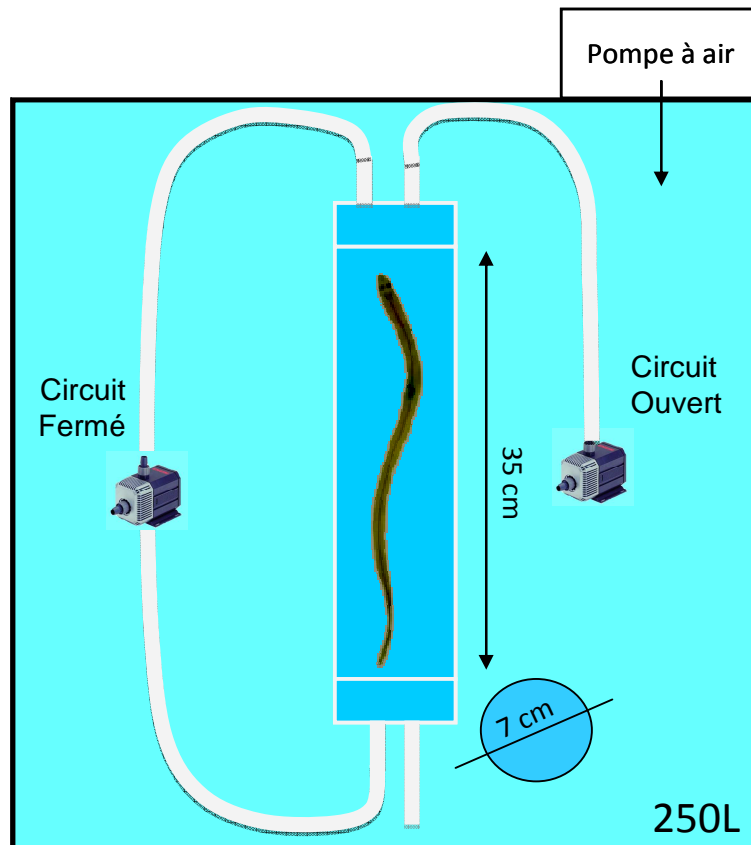


Fig. 17. Schéma du dispositif de respirométrie pour les anguilles. Pendant la phase de circuit ouvert l'eau de la chambre est renouvelée à partir de l'eau du bac tampon maintenue à saturation d'oxygène.

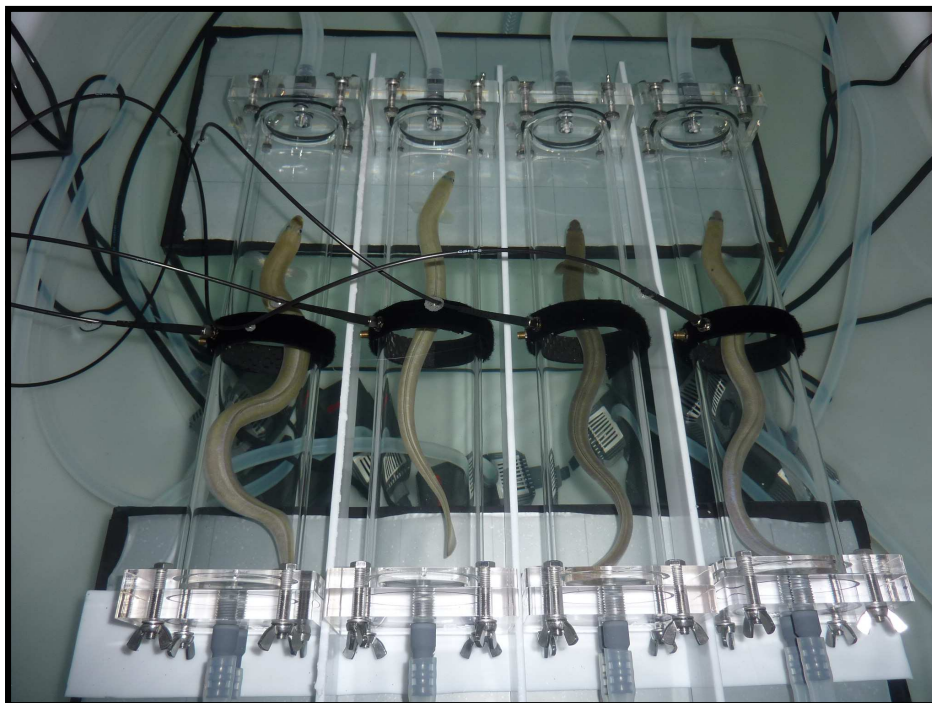


Fig. 18. Anguilles dans les chambres de respirométrie.

à l'intérieur des chambres et ces données sont enregistrées en temps réel par deux ordinateurs portables munis du logiciel OXY-4 version 2.11 (PreSens - Precision Sensing GmbH).

Les chambres de respirométrie sont disposées sur un portoir immergé dans un bac tampon contenant 10L d'eau de source maintenue à température constante ($11^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$) à partir d'un groupe froid (TECO TR15, Teco). Le suivi de la température moyenne est effectué à l'aide d'un thermomètre enregistreur (VEMCO). L'eau est maintenue à saturation d'oxygène à l'aide d'un diffuseur d'air.

Les chambres de respirométrie sont reliées à deux pompes péristaltiques (Masterflex® L/S® economy variable-speed drive, Cole-Parmer) avec un circuit ouvert relié à un programmeur et un circuit fermé (voir Fig. 15). Le circuit ouvert permet de restaurer la saturation en oxygène dans chaque chambre, le circuit fermé permet de quantifier la diminution d'oxygène dans l'eau, liée à la fois à la respiration des civelles et à la respiration endogène (*e.g.* consommation bactérienne) et/ou à la dérive du système. A partir d'études préalables (menées par Valérie Bolliet, UMR ECOBIOP), il a été décidé de maintenir le circuit fermé pendant 20 minutes afin que la saturation en oxygène ne tombe pas en dessous de 80% évitant tout stress hypoxique pour les civelles. Pour atteindre la saturation en oxygène avant chaque mesure, le circuit ouvert est maintenu pendant 20 minutes.

Un dispositif semblable a été mis en place pour mesurer la consommation d'oxygène chez les mêmes individus, mais ayant dépassé 30 cm (2 ans et demi après les mesures de consommation d'oxygène chez les civelles). Exception faite de la taille des chambres de respirométrie (35 cm de long et 7 cm de diamètre), le système de mesure de l'oxygène est en tout point similaire à celui mis en place pour les civelles. Quatre grandes chambres sont immergées dans un bac de 250L. La température est maintenue constante grâce à un groupe froid et une salle climatisée à 11°C . Malgré cela, une légère dérive a été détectée en lien avec la chaleur produite par les 8 pompes immergés (Eheim 5L/minute) (Fig. 17) et le refroidissement soudain provoqué par le groupe froid. La température oscillait entre 11°C et 12°C , ce qui n'a pas affecté les mesures de consommation d'oxygène après analyse statistique des pentes.

Suite à des tests préliminaires conduits sur des anguilles pêchés en milieu naturel, le temps de mesure de l'oxygène en circuit fermé a été fixé à 40 minutes. Compte tenu de la vitesse de renouvellement de l'eau dans les chambres, le circuit ouvert est maintenu durant 10 minutes.

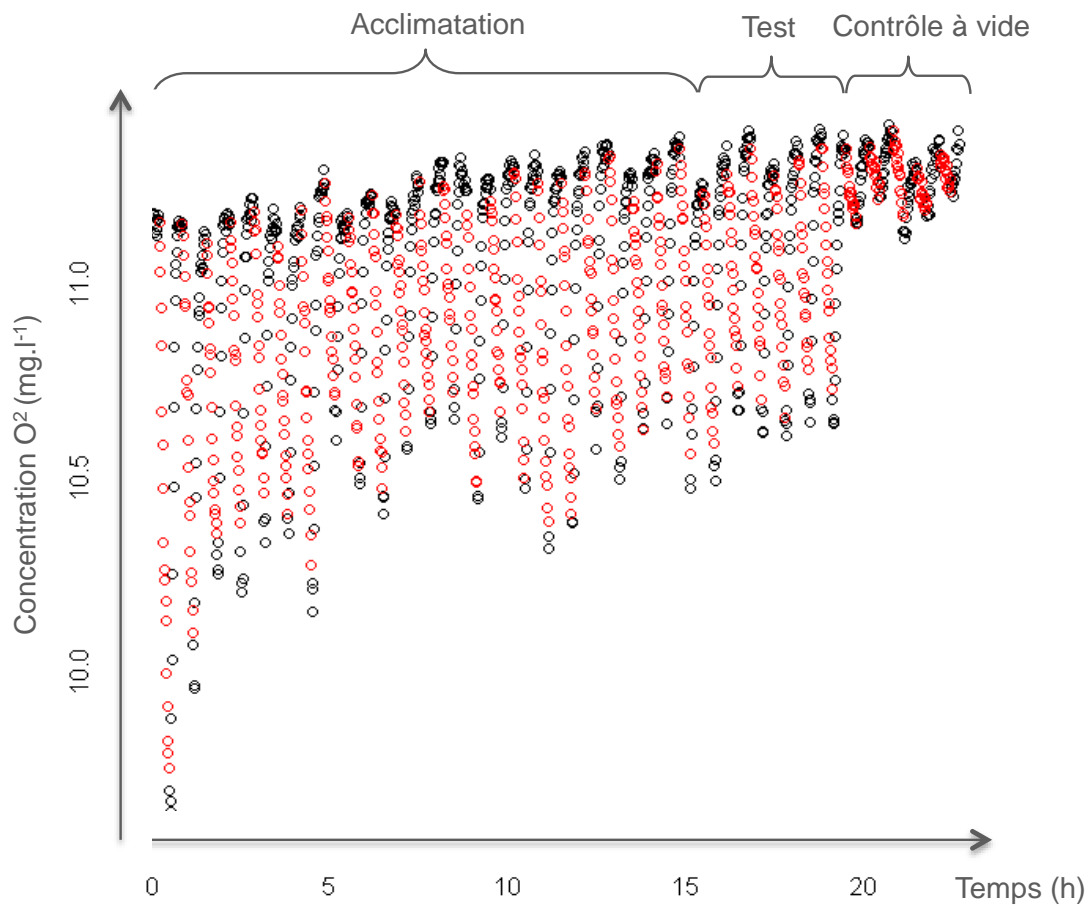


Fig.19. Exemple d'enregistrement obtenu pour une civelle. Les pentes matérialisées par les points rouges correspondent aux enregistrements en circuit fermé. La différence entre les pentes correspondant à la période test et le contrôle à vide permet de calculer la consommation d' O_2 .

Principe des mesures de consommation d'oxygène

Les mesures de concentration d'oxygène font intervenir le principe d'oxo-luminescence. La sonde à oxygène, collée sur la paroi de la chambre de respirométrie, reçoit un influx lumineux de l'oxymètre par le biais de fibres optiques. La sonde entre dans un état excité et émet à son tour une luminescence enregistrée par l'oxymètre. Lorsque des molécules d'O₂ se trouvent au contact de la sonde, l'énergie de la sonde en état excité est transférée aux molécules d'O₂, diminuant la luminescence émise. La quantité de luminescence enregistrée est donc inversement proportionnelle à la quantité de dioxygène présente dans la chambre. Après calibration des oxymètres à l'aide de solutions dont les concentrations en oxygène sont connues (solution saturée de sulfite de sodium Na₂SO₃ : 0% d'O₂; eau saturée en O₂ : 100% d'O₂), on obtient des mesures de concentration de dioxygène en mg dm⁻³.

Enregistrements

Chaque jour, 8 civelles (et par la suite 4 anguilles) sont introduites dans les chambres de respirométrie à 16h et l'enregistrement débute aussitôt. Toutes les minutes, une mesure d'oxygène est effectuée. Après une période d'acclimatation de 16h, les 6 derniers cycles d'enregistrement en circuit fermé sont utilisés pour les mesures. Ces 6 derniers cycles correspondent au moment de la journée où les individus consomment le moins d'oxygène (Degani et Lee-Gallagher, 1985 ; Degani *et al.* 1989 ; Valérie Bolliet, données non publiées) et sont donc considérés comme étant au repos. Parmi ces 6 derniers cycles, les 3 pentes indiquant la consommation la plus faible sont choisies pour le calcul du métabolisme standard. Les individus sont ensuite retirés des chambres et, 3 nouveaux cycles de mesures à vide sont pris en compte pour corriger la mesure de consommation d'oxygène (voir Fig. 19).

Calcul du métabolisme relatif

À l'aide du logiciel R version 2.14., un modèle de type GLM [Consommation d'O₂ ~ Temps(h) x session (test-contrôle à vide)] permet de calculer la consommation individuelle d'oxygène par rapport à la session de contrôle à vide. Le métabolisme est supérieur à 0 lorsque les pentes de la phase test sont significativement différentes de celles obtenues en phase à vide.

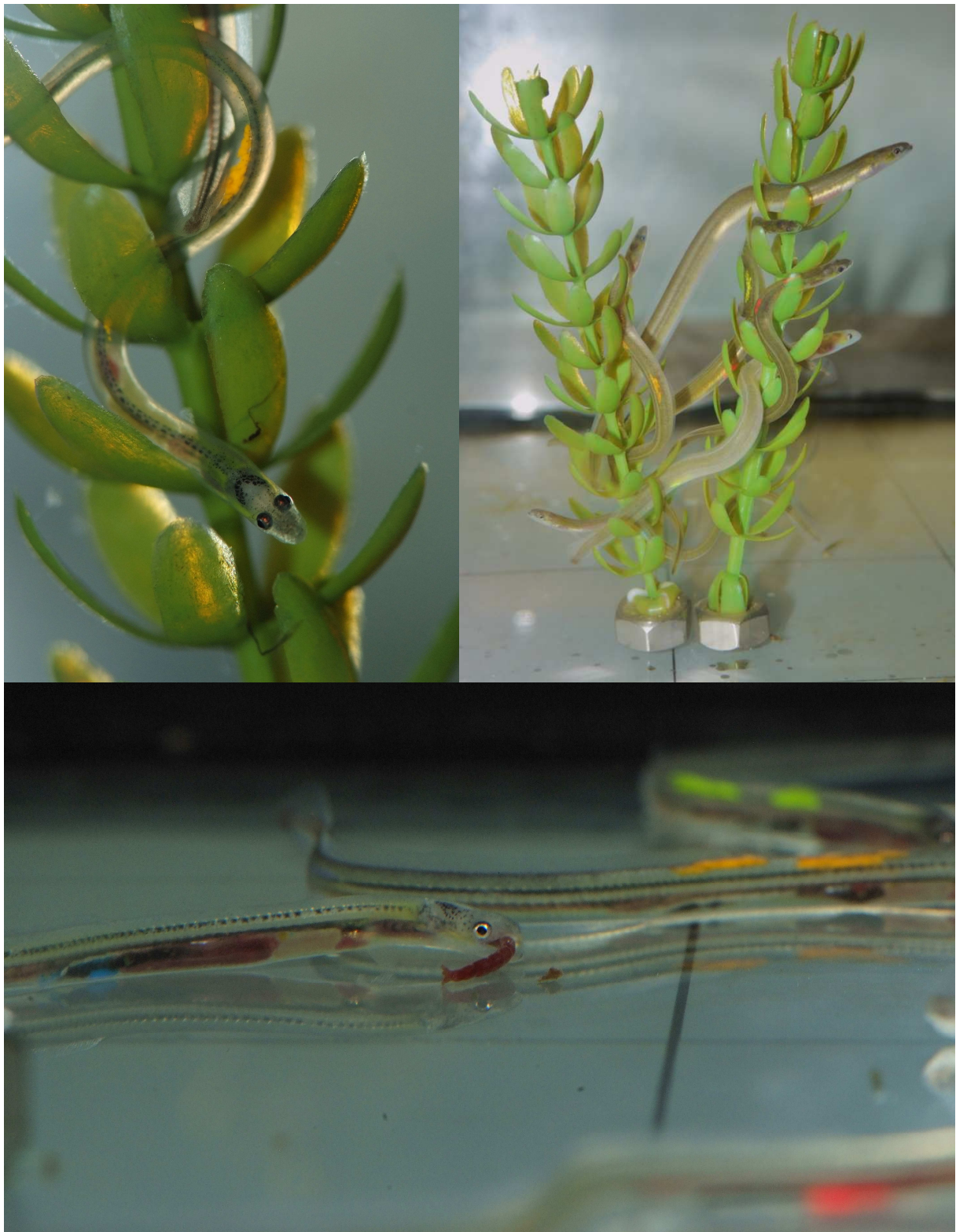


Fig. 20. Photos a) d'une civelle dans un abri (marquée orange ventre), b) de civelles sur le fond de l'aquarium avec les 4 VIE tags utilisés (bleue, orange, jaune, rouge). Un chironome est présent dans la bouche de l'individu marqué « bleu ventre ». Les lignes placées sous l'aquarium et délimitant 32 carrés de surface égale sont aussi visibles. c) Anguillettes entrelacées qui ont rapproché 2 abris, à l'origine espacés de 5 cm. Photos a) et b) Stéphane Glise et c) Sophie Laurent.

L'erreur standard, calculée durant la phase de contrôle à vide, indique l'erreur de mesure liée au dispositif à laquelle s'ajoute l'erreur liée à la consommation bactérienne. En raison du grand volume d'eau utilisé pour les adultes (1,22 L), aucune dérive du système n'a été détectée, contrairement aux mesures prises sur les civelles (dans 10 ml d'eau). Le métabolisme standard relatif au poids (rSMR) des individus est calculé comme étant les résidus de la relation entre le log de la consommation d'oxygène et le log du poids (Metcalf *et al.* 1995).

Installations expérimentales

Après chaque mesure du métabolisme (étalées sur 9 jours pour les 73 civelles en test), les civelles sont endormies avec une dose de benzocaïne (0.3 ml/L de solution mère à 10g/100ml éthanol 70%), pesées, mesurées et marquées individuellement à l'aide d'implants élastomère fluorescents (VIE tag). Ces VIE tags sont de quatre couleurs (jaune, orange, rouge et bleu) et présentent la particularité d'être visibles sous UV (pour les observations de nuit). Les élastomères sont injectés à l'aide de seringues à insuline en sous-cutanée sur la partie dorsale ou ventrale des individus (Fig. 20). Un total de 128 (2 x 64) civelles sont obtenues après les mesures d'automne et de printemps.

Des groupes de 8 individus sont aléatoirement formés (4 couleurs et 2 emplacements) et placés dans 16 aquariums identiques (8 aquarium d'automne et 8 de printemps contenant chacun 8 individus). Les civelles M+ et M- ne sont pas mélangées entre elles. Chaque condition d'expérimentation existe donc en quadriplat (2 saisons : printemps/automne x 2 comportements : M+/M-).

Le 7 décembre 2009 pour les civelles d'automne et le 06/04/10 pour les civelles de printemps, juste avant le démarrage des expériences portant sur la croissance et les comportements des civelles, toutes les civelles sont à nouveau anesthésiées, pesées, mesurées et photographiées (pour diverses mesures morphologiques). Le stade de développement de chaque civelle est également déterminé (Elie *et al.* 1982).

Chaque aquarium (25 cm de large, 50 cm de long) possède une sortie placée à une hauteur de 15 cm. Huit élodées en plastique sont disposées de façon régulière à 5 cm les unes des autres et à 5 cm de la vitre frontale. Une grille composée de 32 carreaux de dimension égale est placée sous chaque aquarium afin de localiser précisément les civelles.

Les aquariums sont alimentés par l'eau de la nivelle. Cette eau est filtrée une première fois, afin d'enlever les plus grosses particules, et une seconde fois par le biais d'un filtre associé à chaque aquarium. Le filtre contient une mousse et du charbon actif. De plus un filtre UV est présent sur chaque pompe de filtration. Le débit d'entrée dans chaque aquarium se fait par l'angle arrière droit et permet le renouvellement du volume d'eau en 40 minutes. La photopériode est la même que lors du tri expérimental : 12 h jour/12 h nuit avec 30 minutes de crépuscule entre 19 h et 19h30 et 30 minutes d'aube entre 7h et 7h30. La luminosité de jour est très faible et ne dépasse pas $27 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (≈ 4 lux), elle est en revanche nulle de nuit.

Les civelles sont nourries *ad libitum* vers 16h avec des chironomes vivants. La quantité de chironomes mangés le jour « j » est déduite à partir du nombre de chironomes restants le lendemain matin. Ainsi, pour chaque aquarium, le nombre de chironomes mangés par jour est connu.

Observation des comportements

L'observation des civelles est réalisée lors de sessions (aussi appelés trial par la suite) de 11 jours consécutifs. Neuf de ces 11 jours sont dédiés à des observations directes par enregistrement vocal des différents comportements. Les 2 jours restant sont consacrés à l'analyse des comportements à l'échelle circadienne à partir d'enregistrements vidéo. Un jour avant chaque session d'observation, la quantité de chironome est réduite de moitié par rapport au nombre de chironomes d'une ration « normale » correspondant à la consommation *ad libitum* des 2 jours précédents. Ceci, afin de s'assurer que des interactions agressives auront lieu. En effet, ces événements sont très rares hors des périodes d'alimentation (Bardonnnet *et al.* 2005c, 2008).

Les observations directes peuvent être séparées en 2 parties distinctes pour chaque journée :

- L'observation réalisée en fin de matinée (5 minutes par aquarium) permet d'établir pour chaque individu le type de placement le plus fréquent sur la durée. Quatre types de positionnement dans l'aquarium sont identifiés :

- ❖ Repos abris
- ❖ Repos fond
- ❖ Nage colonne
- ❖ Nage Fond

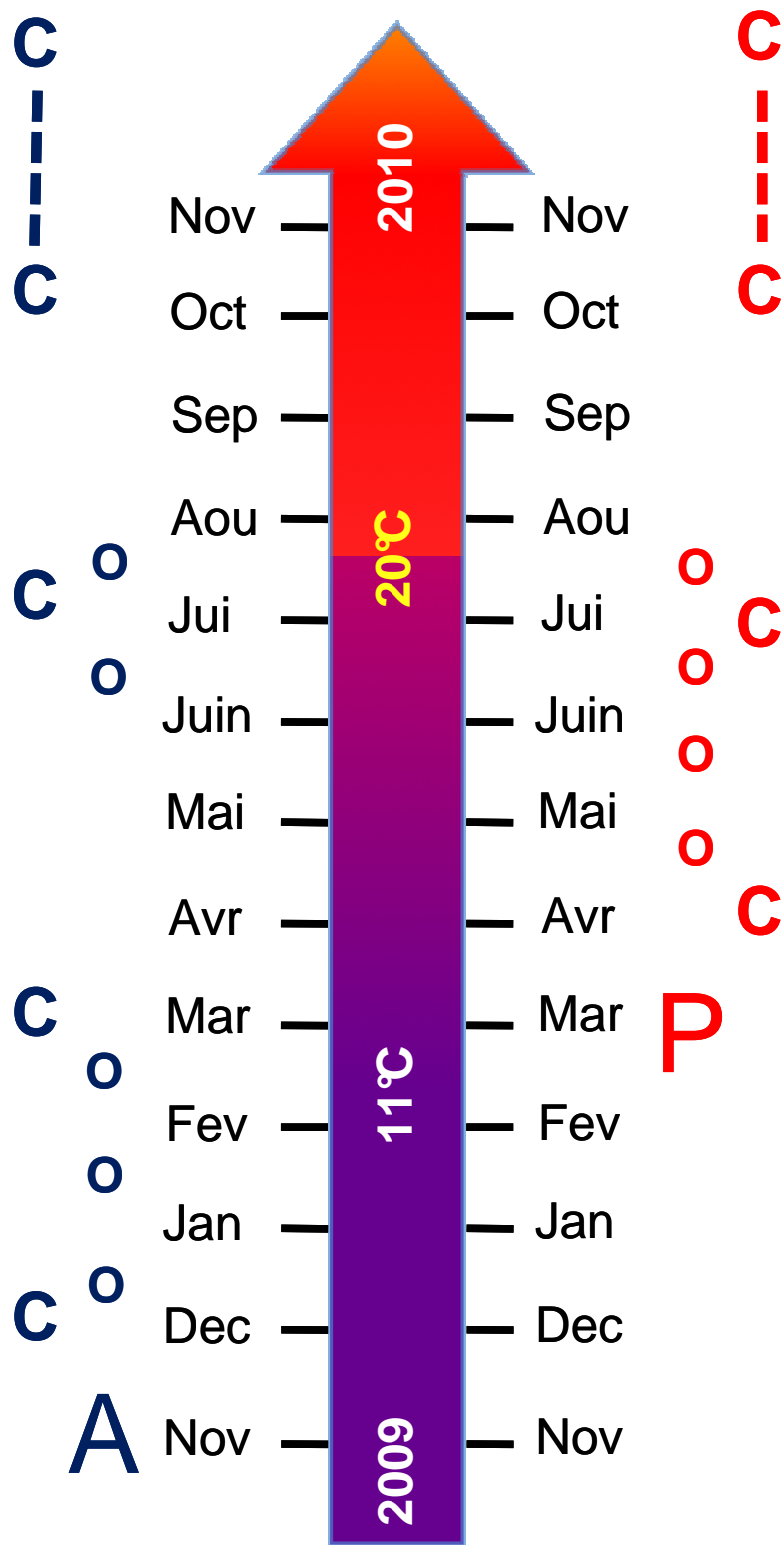


Fig. 21. Chronogramme des observations comportementales (O) et des mesures de Croissance (C) pour les civelles capturées à l'Automne (A) et au Printemps (P).

Il est possible, lors de ces observations, de connaître le placement exact de chaque individu à partir du quadrillage mis en place sous chaque aquarium. De plus, l'identité des individus en contact les uns avec les autres (sur le sol ou sur abris voir photo Fig 20), est également notée. L'observation réalisée l'après midi, et qui dure 20 minutes par aquarium, consiste à identifier les interactions agressives. Pour cela, un chironome vivant est posé à la surface de l'eau (plutôt sur les cases centrales mais il peut tomber de façon aléatoire autour de cette position). Une fois tombé sur le sol, sa position est relevée, de même que l'identité de l'individu qui vient le sentir ou le prendre. Lorsqu'une civelle attrape un chironome, ce dernier dépasse de sa bouche pendant un long moment. C'est pendant cette phase que les individus émettent le plus d'actes agressifs. Trois différents types d'actes agressifs ont pu être identifiés lors de précédentes analyses (Bardonnnet *et al.* 2005c, 2008). Ces différents types de comportements sont également observés ici :

- ❖ Pousse : le fait de pousser l'individu qui a le chironome dans la bouche
- ❖ Morsure : le fait de mordre ou d'essayer de mordre l'individu qui a le chironome dans la bouche
- ❖ Chapardage : le fait d'essayer et/ou de réussir à prendre le chironome qu'une autre civelle a dans la bouche (ce comportement peut durer plusieurs secondes)

Dès lors qu'un chironome est consommé, un autre est ajouté dans l'aquarium et l'enregistrement de ces différents comportements recommence jusqu'à ce que les 20 minutes soient écoulées. Ainsi, le nombre de chironomes mangés par chaque civelle peut être connu, de même que le nombre d'attaques émises et reçues par chaque individu. A la fin de chaque journée d'observation, le nombre de chironome ajouté dans chaque aquarium est ajusté en fonction de ce qui a été consommé pendant l'observation et de la ration à atteindre.

En tout, 4 sessions d'observation ont été réalisées à 11°C pour les civelles d'automne (Décembre 2009, Janvier, Février et Juin 2010) et 3 sessions (Avril, Mai, Juin 2010) pour les civelles de printemps (voir le chronogramme Fig. 21).

Dès Juillet 2010, tous les aquariums sont progressivement passés de 11°C à 20°C afin d'accélérer le processus de croissance. Une autre session d'observation comportementale est alors réalisée faisant suite à ce changement. Le fait de limiter la quantité de nourriture a conduit les poissons à devenir très agressifs et l'expérience a été arrêtée au bout de 5 jours (au lieu de 11) afin qu'ils ne se blessent pas mortellement.

Enregistrement vidéo des comportements

Au milieu de chaque session d'observation directe, les comportements des civelles/anguillettes sont enregistrés 10 min/h pendant 24 heures, à l'aide de caméras vidéo (CR Sony HD XCD-SX910/CR). Les individus sont visibles sous UV et la luminosité est de 12 lux pendant la journée et de 8 lux pendant la nuit. Un sous-échantillonnage de 2 minutes de jour (à 8:00-10:00, 12:00 et 14:00) et 2 minutes de nuit (à 20:00, 23:00, 2:00 et 5:00) a été effectué. Seule l'activité a pu être prise en compte, car il n'était pas possible de détecter précisément la prise de proie ainsi que les attaques émises et reçues par les individus. L'analyse des différents comportements a été réalisée à partir du logiciel libre : JWatcher (v.1.0, www.jwatcher.ucla.edu). Les différents comportements sont les mêmes que ceux évoqués précédemment, mais leur durée est précisément quantifiée (les périodes de repos ne sont prises en compte que si elles dépassent 5 secondes).

- ❖ Repos abris
- ❖ Repos fond
- ❖ Nage colonne
- ❖ Nage Fond

L'amélioration apportée par ce type d'analyse réside principalement dans le fait que le temps exact, passé par chaque individu dans les différents états, peut être connu. De plus, il offre la possibilité de savoir si les comportements de nuit sont similaires aux comportements de jour.

Suivi à long terme

A la suite de ces expériences, les anguillettes passent progressivement d'une nourriture vivante à une nourriture inerte (œufs de merlu congelés, recommandé par Rodriguez *et al.* 2005), puis à une nourriture pressée (granulés) spécialement mise au point pour les anguilles (DAN-EX AAL, Biomar). Pendant l'élevage, les individus sont nourris à hauteur de 2.3% de leur poids frais, avec des granulés de taille croissante (1.2 mm, puis 1.5 mm, et enfin 2 mm).

La composition de la nourriture varie entre :

48-50% de protéines, 26-28% de lipides, 11-13% de carbohydrates, 0.3-0.6% de fibres, 6.6-7.1% de cendres et 1.2-1.3% de phosphore. L'énergie brute de la nourriture était de 23.7-24.1 MJ/kg. Tous les 3 mois, des mesures de croissance sont effectuées sur les civelles/anguilles.

Le comportement animal et la Personnalité

L'étude du comportement animal a considérablement évolué ces dernières décennies. En effet, la plupart des études réalisées au début du XX^{ème} siècle se focalisaient sur la moyenne observée au sein d'une population. Les variations autour de cette moyenne étaient alors considérées comme des artefacts. Cette tendance générale fut décriée notamment par Bennett (1987) : la Tyrannie de la moyenne d'or. Dès lors, de nombreuses études se sont concentrées sur les variations comportementales observées au sein d'une population ou d'un groupe d'individus dans le but de s'adapter aux variations environnementales. Mais la vision selon laquelle certains traits de caractère (propres à chaque individu) seraient peut-être fixés dans le temps, a depuis fait son chemin. Cette évolution est surtout liée à la quantité d'études récentes reportant une très faible plasticité comportementale chez certains individus (revue de Schuett *et al.* 2010) reflétant une possible « Personnalité ».

La notion de « Personnalité » n'a été mise en avant que très récemment chez des vertébrés inférieurs tels que les poissons. On lui préféra longtemps les termes traits de caractère, tempérament ou syndrome comportemental pour ne pas faire d'anthropomorphisme. La personnalité fut en effet associée à l'homme ou autres primates durant de nombreuses années pour décrire des traits de caractères complexes. De plus la personnalité n'est, à l'heure actuelle, pas décrite de la même manière chez l'homme et chez les autres animaux puisqu'elle est généralement décomposée selon 5 axes pour l'homme : ouverture, conscience, extraversion, amabilité et névrosisme (FFM, John et Srivastava 1999, McCrae et Costa, 1999). Néanmoins, un des principaux freins à l'expansion de ce domaine porte sur l'observation des comportements et l'attribution de certains traits de caractères qui peuvent s'avérer très subjectifs en fonction de l'observateur : « ratings take form from the judges » Secord et Backman (1974). D'où la nécessité de mettre en place des protocoles clairs et concis de façon à ce qu'ils puissent être reproductibles.

Concernant les vertébrés inférieurs, 3 termes sont actuellement employés de façons analogues, bien qu'ils réfèrent à des situations particulières : Syndrome comportemental, « coping style » et personnalité. Tous trois sont décrits comme des différences comportementales entre individus consistantes dans le temps et/ou dans différents contextes (Bergmüller et Taborsky, 2010).

Le **syndrome comportemental** consiste à placer les individus d'une espèce ou d'une population au sein d'un continuum comportemental (*e.g.* timide *vs* téméraire, producteur *vs* charpateur, agressif *vs* non agressif ...). A la différence des deux autres termes (coping style et personnalité), il décrit des différences comportementales entre individus consistantes dans le temps ou dans différents contextes (Stamps et Groothuis, 2010); bien que selon Dingemanse *et al.* (2009) le temps puisse également être traité comme contexte, permettant d'évaluer le comportement d'un individu au cours de son ontogénèse. Certains de ces comportements peuvent être auto-corrélés chez les individus et ne seraient que très peu plastiques en fonction des situations.

Coping style fait référence aux traits de caractère qui permettent de s'adapter à une nouvelle situation. Ainsi les animaux sont placés dans 2 catégories différentes : proactif et réactif dans le sens où leur réponse (comportementale et/ou physiologique) au stress diffère en fonction de leur appartenance à tel ou tel groupe. Les individus proactifs sont à la fois agressifs et téméraires. Au contraire les individus réactifs sont moins spontanés et plus précautionneux dans leurs comportements, s'adaptant progressivement à leurs environnements. Les individus diffèrent également du point de vue physiologique. Le système sympathique-surrénale est préférentiellement activé chez les individus proactifs. A contrario, le système hypophyso-corticosurrénalien est préférentiellement activé chez les individus réactifs (Von Holst, 1985 ; Bohus *et al.* 1987). De façon générale, les individus proactifs auront une meilleure fitness lorsque la compétition est intense et que le milieu est stable, alors que les individus réactifs auront une meilleure fitness lorsque la compétition est faible et que le milieu varie.

La **personnalité** regroupe l'ensemble des traits de caractère attribuables à un individu (Dingemanse *et al.* 2009). Cette « personnalité » doit par conséquent rester stable ou évoluer de façon linéaire au cours du temps et en fonction des situations. Par définition, la personnalité n'étant pas plastique, elle peut permettre d'expliquer des comportements non-optimums.

L'origine de ces « personnalités » peut être liée à des déplacements graduels, autour d'un comportement médian et commun à une population, dû aux interactions avec des conspécifiques pour le partage d'une niche écologique par exemple (Bergmüller et Taborsky,

2010). Différents rôles sociaux sont alors adoptés par les individus. Néanmoins, certains comportements semblent montrer une faible plasticité et ne seraient pas liés à de l'apprentissage notamment chez les espèces sociales telles que les fourmis, car inscrits dans le patrimoine génétique de certains individus.

Une des premières expériences mise au point sur le sujet fut menée par le Dr Dmitry K. Belyaev (Généticien Russe) à partir de 1959. Il entreprit de tester si certains caractères propres à la domestication des renards pouvaient être transmissibles. A partir d'une population initiale de 30 mâles et 100 femelles et d'expériences sur le comportement des jeunes obtenus à partir de croisements, le Dr Belyaev constata qu'après 10 générations, 18% des jeunes renards avaient des traits de caractères d'individus domesticables (*i.e.* peu agressifs envers l'homme). Après 20 générations, 35 % des jeunes obtenus avaient ces traits de caractères. Après le décès du Dr Belyaev, les expériences se sont poursuivies, et en 2000 (après 30 à 35 générations), 80% des jeunes possédaient des traits comportementaux d'individus domesticables (voir Trut, 1999). De façon très intéressante les changements comportementaux se sont accompagnés de changements morphologiques, notamment une progressive perte de la pigmentation et une diminution du taux de corticostéroïdes produits. Il s'agit sûrement de la plus longue expérience menée sur l'héritabilité de traits comportementaux (si l'on omet la sélection qui a accompagné pendant plusieurs millénaires la domestication de nos animaux d'élevage). Cette expérience se poursuit encore à l'heure actuelle.

Plus récemment, la transmission héréditaire de certains traits comportementaux a été mise en évidence chez les mésanges sélectionnées sur 4 générations en fonction du comportement des premiers géniteurs. Cette sélection a permis d'obtenir deux catégories d'oiseaux : rapides, téméraires et proactifs *versus* lents, timides et réactifs (Drent *et al.* 2003). De fait, il conviendrait de bien différencier « personnalité » acquise par l'expérience lors d'une génération et « traits de caractères » mis en place au cours de l'évolution (composante héréditaire).

Une des premières expériences menée sur le syndrome comportemental (même s'il n'en portait alors pas le nom) chez les poissons fut mise au point par Felicity Huntingford (1976a). L'auteur mit en évidence des différences comportementales inter-individuelles d'agression et de témérité cohérentes dans le temps chez l'épinoche *Gasterosteus aculeatus*. De plus, lorsqu'un intrus était placé dans l'aquarium (dans une cage en verre à 5 ou 30 cm du nid) pendant le cycle de reproduction de l'épinoche mâle (qui construit un nid), la réponse de ce dernier variait dans le temps en fonction de l'espèce intrus concernée et de sa position dans

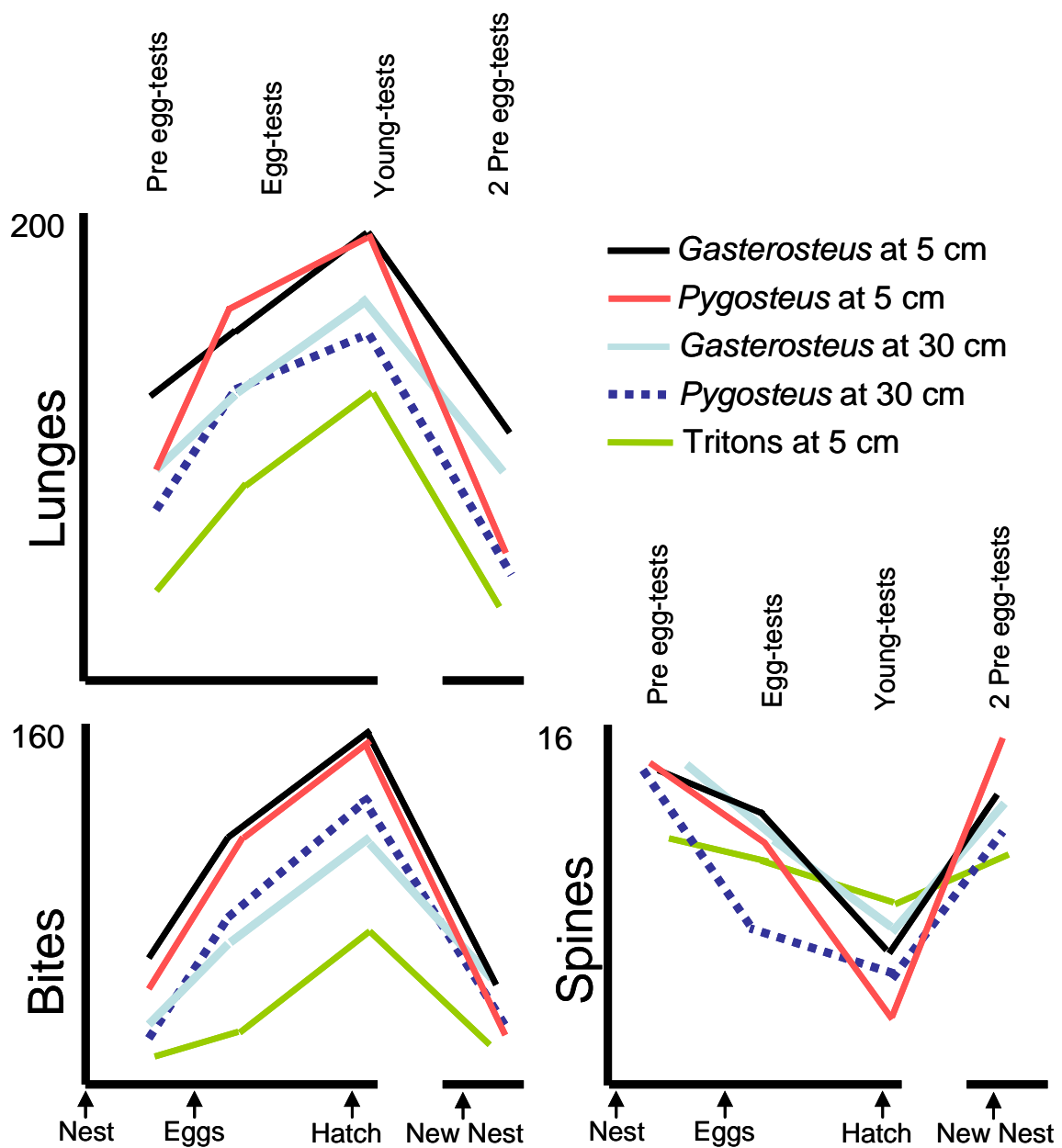


Fig. 22. Evolution dans le niveau moyen de 3 types de comportements pendant les différentes phases du cycle de reproduction de l'épinoche (nest, eggs, hatch, new nest) envers une espèce proche : *Pygosteus pungitius* un conspécifique : *Gasterosteus aculeatus* et un triton. La réponse de l'épinoche varie en fonction du placement de l'intrus (à 5 ou 30 cm du nids) dans l'aquarium et de la taille de l'intrus. Lors du pre-egg test le nombre d'épinoche testé est de 27, il est de 23 lors du egg test, de 13 lors du young test et de 7 pendant le second pre-egg test. Modifié d'après Huntingford (1976a).

l'aquarium (Fig. 22). L'auteur constate que les tentatives d'agressions sont plus importantes envers les poissons qu'envers le triton, et que plus le poisson est proche du nid, plus les tentatives d'agressions sont importantes. De façon intéressante on constate que la réponse varie de la même façon dans le temps pour tous les stimuli mais que l'intensité de cette réponse varie en fonction de l'opposant (Fig. 22). De fait il existe une plasticité des comportements au cours de l'ontogénie et en fonction des contextes. Cette plasticité semble être la même pour tous les individus. Néanmoins l'auteur souligne qu'il existe des différences inter-individuelles de comportement (intensité) significatives (non représentées sur la figure). Ainsi, personnalité et plasticité du comportement semblent étroitement liées.

Bien que Felicity Huntingford ait mis en avant la plasticité des comportements et la personnalité des individus, l'intérêt porté au lien entre ces deux composants est, en revanche, plus récent. En effet, les études empiriques sur la personnalité ont commencé à utiliser la notion de norme de réaction pour prendre en compte la plasticité des comportements, ces 5 dernières années. La **norme de réaction comportementale** (NRC), décrite par Dingemanse *et al.* (2010), correspond à l'ensemble des phénotypes comportementaux produits par un individu en réponse à un ensemble d'environnements. En d'autres mots, la NRC donne une indication sur la façon dont un individu se comporte en général et sur la façon dont son comportement change en fonction du contexte ou de son développement : par exemple le comportement de dispersion et en fonction de l'intensité du vent, ou encore l'apport de nourriture aux oisillons en fonction de l'intensité de leurs réclamations. Pour étudier la variation d'un comportement au cours de l'ontogénèse des individus, Stamps et Groothuis (2010a) ont introduit la notion de **norme de réaction développementale**. Cette approche rend à la fois compte de la variance comportementale inter-individuelle (personnalité), intra-individuelle (plasticité) et de leurs interactions. Afin de tester ces hypothèses, on utilise principalement des modèles linéaires mixtes (Dingemanse *et al.* 2009 ; Schuett *et al.* 2010 ; Biro *et al.* 2010). En termes statistique, l'intercepte représente la valeur réponse dans un environnement moyen et la pente est une mesure de la plasticité comportementale d'un individu (Dingemanse *et al.* 2010). Des lignes parallèles horizontales et/ou une stabilité dans le rang des individus au cours du temps/contexte sont le reflet de différences de personnalité. Dans le cas où les pentes diffèrent entre individus, cela reflète une plasticité comportementale qui varie en fonction des individus. La NRC peut être utilisée dans des cas complexes. Par exemple : les souris très agressives n'ajustent pas leurs niveaux d'agressivité en fonction du contexte alors que celles moins agressives le font (Natarajan *et al.* 2009).

Stamps et Groothuis (2010b) proposent 5 termes empruntés à la psychologie qui permettraient de mesurer des changements comportementaux au cours du temps et d'évaluer les relations entre ces comportements :

- **Mean level consistency** : Sert à estimer le changement de la valeur moyenne d'un comportement exprimé par un groupe d'individus dans un certain contexte par rapport au même comportement dans le même contexte mais à un moment différent.
- **Differential consistency** : Décrit comment les individus maintiennent leurs scores comportementaux dans un certain contexte au cours du temps par rapport aux scores de tous les autres individus pour la même étude.
- **Structural consistency** : Décrit les changements temporels dans les relations entre patrons comportementaux exprimés par les individus dans plusieurs contextes.
- **Rank-order consistency** : Un cas spécifique de differential consistency. Le rank-order consistency indique dans quelle mesure le rang des individus pour un certain comportement est conservé (cohérence) lorsque le comportement de ces mêmes individus est mesuré dans le même contexte mais à un temps différent.

Ces quatre termes servent à décrire les changements globaux au sein d'une population, le quatrième terme décrit le comportement individuel :

- **Individual stability** : Décrit comment le score d'un individu évolue au cours du temps pour un trait comportemental dans un certain contexte. Il peut être utilisé au sein de sous-groupes (ex : mâle vs femelle).

Les différences comportementales entre individus peuvent engendrer de multiples conséquences en termes de sélection sexuelle, valeur sélective, parasitisme :

- Les mouflons d'Amérique téméraires ont une meilleure survie dans la nature que les mouflons timides (Reale et Festa-Bianchet, 2003).
- Chez les espèces invasives, les individus de type « asocial » vont permettre d'augmenter la vitesse de colonisation de nouveaux sites (Fogarty *et al.* 2011) et conduire potentiellement à une spéciation péripatrique.
- Chez le lézard, les individus asociaux ont une meilleure fitness à faible densité et vice-versa pour les individus sociables (Cote *et al.* 2008).

- Chez le saumon atlantique *Salmo salar*, les risques d'agressions sont plus élevés pour les individus qui ont une croissance rapide que chez les autres (Nicieza et Metcalfe, 1999).
- Chez la perche soleil *Lepomis gibbosus* les individus téméraires portent différents parasites comparativement aux poissons plus timides. Ce qui est probablement lié aux différents lieux qu'ils fréquentent (Coleman et Wilson, 1998).
- Les guppies mâles téméraires sont plus attractifs pour les femelles que les individus plus timides (Godin, 1996).

Il peut également exister des différences inter-sexes dans la stabilité comportementale. En effet, en fonction des traits d'histoire de vie de chaque espèce, certains comportements seront sélectionnés pour rester stables ou non, en fonction du sexe des individus. Les résultats issus d'une méta-analyse (Schuett *et al.* 2010) indiquent que pour les soins parentaux, les mâles sont plus stables que les femelles. De façon générale, dans les espèces où les mâles se battent pour l'accès aux femelles, si ce comportement est stable dans le temps, les autres mâles vont pouvoir ajuster leurs réponses envers ces mâles en fonction des informations qu'ils possèdent (vainqueur de combats antérieurs ou non). En termes de sélection sexuelle, le fait d'être stable pour un comportement peut s'avérer coûteux (*e.g.* demande d'énergie supérieure pour les mâles qui se battent en permanence) et de ce fait être un bon indicateur de la qualité des mâles (seuls ceux qui peuvent maintenir une stabilité dans leurs comportements en dépit des variations environnementales présentent de bonnes qualités physiques).

Dans le cadre de cette thèse, l'analyse des comportements à l'échelle individuelle est utilisée à différentes fins :

- Dans la première partie (Chapitre 1), le potentiel de croissance, qui est une mesure proximale de la valeur sélective, est directement corrélé aux différents comportements observés chez les civelles. Ainsi, il est possible d'estimer l'impact (et le potentiel coût) d'être agressif et/ou grégaire et/ou actif. Dans cette première partie, la croissance des individus est suivie sur 3 mois. Il convient de rappeler que la plupart des études rapportent des différences de croissance entre sexes (les mâles grossissent plus vite ou les femelles grossissent plus vite, voir Introduction).

- Dans la seconde partie (Chapitre 2), l'analyse de l'activité est réalisée sur une période plus longue (pendant les 7 premiers mois) et l'observation des comportements se fait à l'échelle circadienne. Chez l'anguille, qui présente une forte phototaxie négative, il est possible que les comportements observés de jour ne reflètent pas les comportements de nuit.
- Dans la troisième partie (Chapitre 3), la stabilité des différents comportements dans le temps est étudiée, le but étant de savoir s'il est possible d'extrapoler les comportements des individus au temps t+1 à partir de leurs comportements au temps t. Cette étude est rendue possible grâce à la modélisation de la norme de réaction comportementale de chaque individu.
- Dans la quatrième partie (Chapitre 4), le degré de familiarité des individus est mis en relation avec le fait d'être agressif envers ses congénères. De plus, l'étude se focalise sur l'émergence progressive d'une possible stabilité du comportement agressif en fonction de la structure du groupe.
- Dans la cinquième partie (Chapitre 5), les différences comportementales entre individus sont reliées à des variables physiologiques, telles que le métabolisme relatif, dans le cadre du coping style. En effet, les individus classés comme proactifs sont ceux qui agissent de façon brusque et sont supposés avoir un métabolisme relatif plus élevé que les autres.

Le but de cette première partie de thèse est d'essayer de comprendre l'influence de certains comportements, stables ou cohérents dans le temps (traduisant une certaine personnalité), sur la croissance et/ou le futur sexe des individus.

En effet, chez le cichlidé Midas (*Cichlasoma citrinellum*), le sexe est déterminé en fonction de l'environnement social et de la taille des poissons (Francis et Barlow, 1993). Les gros individus empêchent les petits individus de croître normalement au travers d'interactions sociales. De plus, les mâles présentent des niveaux d'agressivité très variables (et très importants) comparativement aux femelles qui sont plus stables dans leurs comportements (Holder *et al.* 1991).

Chez *Macropodus opercularis*, le déterminisme du sexe est également sous l'influence de l'environnement social. En effet, chez cette espèce, la densité est inversement corrélée à la proportion de mâles et les individus deviennent mâles lorsqu'ils sont élevés seuls (Francis,

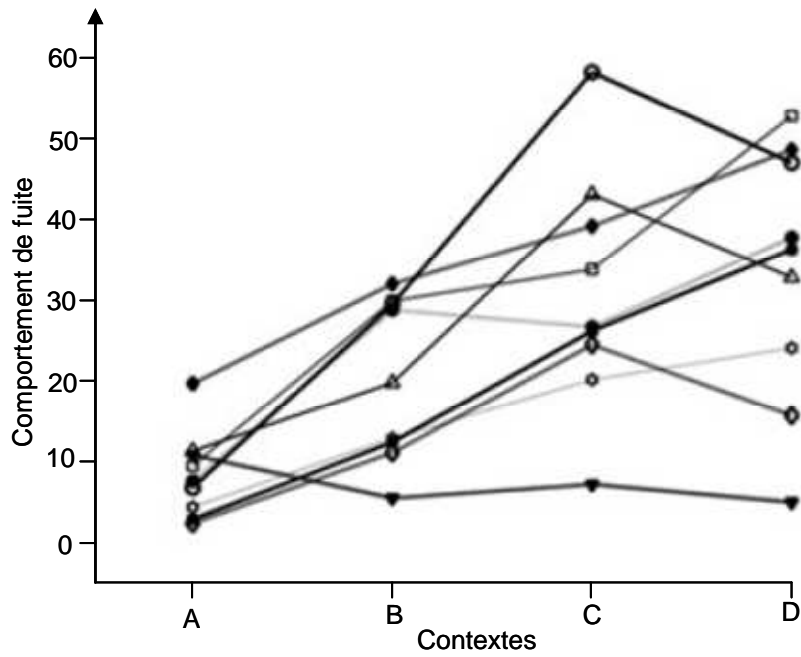


Fig. 23. Norme de réaction comportementale pour chaque individu en fonction des contextes chez *Macropodus opercularis*. Contexte A : Aquarium connu, B : Milieu naturel, C : Nouveau petit aquarium et D : Nouveau petit aquarium + objet mouvant. D'après les données de Gerlai et Csányi (1990).

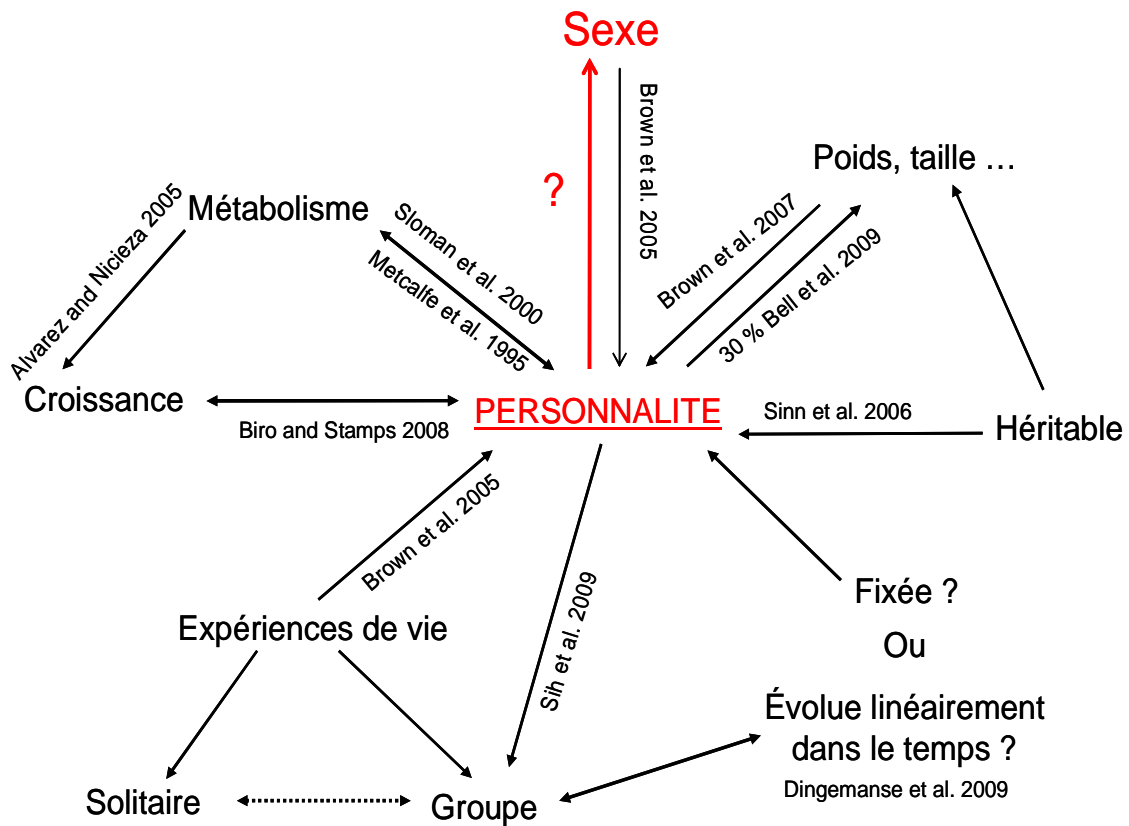


Fig. 24. Représentation schématique de la possible interaction entre personnalité et différentes variables physiologiques ou environnementales.

1984). En outre, la production de lignées sélectionnées pour la dominance aboutit à une grande proportion de mâles et celles sélectionnées pour la subordination aboutit à une grande proportion de femelles. L'étude de la norme de réaction comportementale peut donner un indice sur le degré de dominance des individus au temps t et au temps $t + 1$, mais également sur l'aspect immuable de certains traits comportementaux permettant de classer les individus en dominant ou dominé (Fig. 23)

Cette démarche d'analyse de la stabilité des comportements dans différents contextes peut permettre de prédire le sexe des individus en fonction du caractère téméraire (dominant) ou craintif (dominé) de chaque poisson. A partir de l'étude de Gerlai et Csányi (1990), on s'aperçoit que la cohérence du comportement en fonction du contexte est relativement faible (les auteurs n'ont pas fait de corrélation avec le sexe).

Chez l'anguille, l'objectif est d'essayer de déterminer si certains comportements sont stables pendant les premiers stades de vie en eau douce et s'ils peuvent influencer le sexe des individus (connus 2 ans et demi plus tard) directement ou *via* la croissance (Fig. 24).

Chapitre 1

Synthèse Article 1 : Influence du comportement de la propension à migrer et de la saison de recrutement sur les performances de croissance des civelles et des anguillettes.

Questions: Existe-t-il des différences de potentiels de croissance entre les civelles qui arrivent en début de saison (automne) et celles qui arrivent en fin de saison (printemps) ? Existe-t-il des différences comportementales entre les civelles d'automne et de printemps ? Certaines variables comportementales (agressivité, grégarité, activité) sont-elles liées à la croissance ?

Résultats: Les civelles arrivées au printemps sont plus agressives que celles arrivées à l'automne. Ces dernières sont, en revanche, plus grégaires et ont montré de meilleures performances de croissance pendant les 3 premiers mois d'élevage à 11°C que les civelles de printemps élevées dans les mêmes conditions. Ce constat vient en partie du fait que les civelles d'automne ont consommé significativement plus de chironomes que les civelles de printemps hors des périodes d'observation. A l'échelle individuelle, les individus les plus grégaires sont ceux qui ont eu les meilleures performances de croissance. A l'inverse, l'activité de nage a une influence négative sur la croissance pendant les premiers mois. De manière contre-intuitive, les individus les plus petits et avec le facteur de condition le plus faible ont bénéficié d'une meilleure croissance.

Conclusion: Les petits individus ont pu bénéficier d'une croissance compensatoire, processus qui pourrait être couteux à long terme, car ce "rattrapage" nécessite un investissement énergétique supplémentaire. Les variables comportementales que sont : la nage, l'agressivité et la grégarité, ajoutées au nombre de chironomes mangés, ont permis d'expliquer jusqu'à 51% de la variance de la croissance. Le fait que les individus d'automne soient ceux qui ont la meilleure croissance en condition d'élevage peut permettre d'affiner le choix des individus à privilégier pour le repeuplement dans des lieux exempts de menaces directes.

Differential effects of behavior, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance.

(Ecology of Freshwater Fish 2012, 21, 469–482)

Benjamin Geffroy^{1,2} Agnès Bardonne^{1,2}

¹INRA, UMR 1224 Ecobiop, Pôle d'Hydrobiologie, Quartier Ibarron, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France

²Univ Pau & Pays Adour, UMR 1224 Ecobiop, UFR des Sciences de la Côte Basque, allée du parc Montaury, 64600 Anglet, France
e-mail : bardonne@st-pee.inra.fr

Abstract - Social interactions impact growth rate of animals in different ways such as direct or indirect competition for food and/or territories. In the present study, behavior of glass eels and elvers was described throughout 3 trials of 9 days spread out over 3 months. The impact of recruitment season (spring and autumn runs) and glass eels' propensity to migrate (assessed thanks to an experimental sorting) on individual growth was studied. Overall, spring elvers were more aggressive and active than autumn elvers while autumn fish were more gregarious and reached a higher specific growth rate than spring fish. At the individual level, gregariousness and swimming, respectively, promote and impair growth rate. In addition, skinny individuals and individuals with high motivation to get food achieved better growth rate suggesting catch up growth processes. These findings may help in clarifying the complex relations between behavior, growth, river basin colonization and future sex (which is environmentally determined in eel), and then contribute to the urgent need of scientific knowledge to guide the stocking program of this endangered species.

Key words: growth; season; gregariousness; aggressiveness; behaviour; fish; *Anguilla*

Introduction

Recently, the European eel *Anguilla anguilla* has been classified as critically endangered (Freyhof & Kottelat, 2010). Scientists suggest multiples causes, such as fishing pressure (e.g. Dekker 2004), habitat loss (e.g. McCleave 2001), global warming changing ocean conditions (e.g. Miller *et al.* 2009), pathogens (e.g. Palstra *et al.* 2007) and pollutants (e.g. Van Ginneken *et al.* 2009). In 2007, measures for the recovery of the stock of European eel were taken by the European Union Council. According to their recommendations, fundamental research is required especially to take into account density dependent processes for calculation of restoration targets (ICES 2007). Density dependent processes have been proposed to influence eel dispersal and river basin colonization (Ibbotson *et al.* 2002) as well as mortality (Vøllestad & Jonsson 1988; Lobon-Cervia & Iglesias 2008). However, the mechanisms involved in these processes are still largely unexplored. Direct or indirect competition for limiting resources such as food or shelter, besides social interactions (territoriality or gregariousness) represents two important categories of mechanisms to consider. In addition, growing pattern has been linked to habitat (e.g. Lobon-Cervia *et al.* 1995) and sex (e.g., Krueger & Oliveira 1999) but has rarely been studied in relation to aggression (but see Knights, 1987).

The European eel is a catadromous fish with a very specific life cycle. In this panmictic species, all individuals reproduce in the Sargasso Sea, then larvae (leptocephali) drift toward the continental shelf where they metamorphoses into glass eels and enter estuaries mostly from October to April /May (Tesh, 2003). The complexity of this life cycle is probably one of the reasons why many basic biological data on this heavily harvested species are not yet established. For instance, migration pattern to the spawning area (Sargasso Sea, e.g. Aarestrup *et al.* 2009), duration of the leptocephali migration (e.g. Bonhommeau *et al.* 2010) and the mechanisms of sex determinism (e.g. Davey & Jellyman 2005) are still under questioning. The glass eel estuarine migration is not completely understood either. Different life histories strategies were highlighted thanks to micro-chemistry otoliths analyses (Tzeng *et al.* 1997; Daverat & Tomas 2006). Following on Feuteun *et al.* (2003) hypothesized that different migratory tactics displayed by some glass eels may lead to different life histories and sex ratio. Bureau du Colombier *et al.* (2007, 2008) showed that glass eels high propensity to migrate up estuary was positively correlated with energy content and feeding, and McCleave & Edeline (2009) postulated an endocrine mechanism for proximate mediation of alternative migratory tactics. Another interesting characteristic of migratory glass eels concerns the evolution of glass eel biometry according to season. Indeed, glass eels caught from September

to February had higher condition factor than glass eels arriving between March-June (Desaunay & Guerault 1997; Iglesias *et al.* 2010), this decrease in condition factor being associated with a decrease in lipid contents (Charlon & Blanc 1982). Interestingly, Briand *et al.* (2003) observed that up river, autumn glass eels were more numerous than spring glass eels. Possibly, more autumn recruits may have migrated upstream or/and they have achieved a better survival. In the present study, we investigated the differential effects of spring/autumn run and propensity to migrate on elvers' growing performance under artificial rearing conditions. Because social interactions are involved in density-dependent processes and may also influence growth, we collected behavioral data (aggressiveness, activity, gregariousness and feeding) at the individual level.

Materials and methods

Animals

Autumn and spring glass eels were collected on the 18th November 2009 and the 18th April 2010 at the mouth of courant d'Huchet estuary (Molliet, South-Western France, 43°51' N, 1°23' W), at the beginning of nocturnal flood and at similar tidal coefficient (86 the 18th November 2009 and 90 the 18th April 2010). On the morning following their capture, 1300 glass eels were placed in an experimental flume to be sorted according to their propensity to migrate with the flow or to remain sedentary.

Behavioral sorting

In the wild, the two main mechanisms synchronising glass eel estuarine migration are tidal flow and decrease in light intensity (Gascuel, 1986). According to the Selective Tidal Stream Transport hypothesis (Forward & Tankersley, 2001) glass eel migrate up estuary with tide and this happens mainly at night (Bardonnet *et al.* 2005a). Yet, fish caught as they are moving with flow at night could be considered as tide migrating fish. Under experimental conditions, the decrease in light intensity was observed to immediately trigger mass movement with the flow in most glass eels (Bardonnet *et al.* 2005a) which was confirmed through several experiments (Bureau du Colombier *et al.* 2007, 2008).

Thus by using synchronizers such as change in water current direction and photoperiod, freshly caught glass eels may respond according to their propensity to migrate.

We used a flume which consisted of an annular tank composed of two parallel sections 10 m long, 1 m wide and 0.8 m high, filled up to a depth of 43 cm with clean freshwater derived from the Nivelle river. The water temperature was maintained at $11.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and current velocity at $10 \pm 1 \text{ cm s}^{-1}$ at trap entrance. A synthetic turf shelter (1 m^2) was placed at mid-section and traps ended the upstream and downstream sections. The behavioral test was performed using 650 glass eel per section which were subjected to a 12 L/12 D photoperiod with 30 min of dawn (07:00–07:30 h) and dusk (19:00–19:30 h). Light intensity was maintained at $27 \mu\text{W cm}^{-2}$ during the L period (day) and $0 \mu\text{W cm}^{-2}$ during the D period (night). Glass eels were acclimatized to the flume conditions for 24 h (closed traps), after which traps were opened and regularly checked for 24 h (for further details see Bureau du Colombier *et al.* 2007). “Migratory” glass eels were collected from the downstream trap within the first hour following dusk, while “Sedentary” glass eels were caught from the shelters at the end of the 24 hours trapping. We repeated this process using glass eels from the first sorting and placing them separately in the two sections (one for the migratory glass eel and one for the sedentary glass eel). “Migratory” glass eels caught twice in a row in the downstream trap were designated as “M+” and “Sedentary” fish which have stayed twice in a row in the shelter were categorized as “M-”. Presumably, glass eels responding to dusk signal by moving with the water current are the eels that move upstream with the flow by night during the estuarine migration. Bureau du Colombier *et al.* (2009) showed that fish described as “Migrant” (using the same “dusk signal” sorting process) exhibited a negative rheotaxis when placed in an annular aquaria with water current reversal every 6.2 hours to mimic tidal cycles. On the contrary, eels described as “Sedentary” showed positive rheotaxis.

Standard Metabolism and individual marking

The behavioral sorting led to 4 groups: Migratory fish from autumn (AM+) and spring (SM+) and Sedentary fish from autumn (AM-) and spring (SM-). Forty glass eels were randomly chosen among each of these 4 groups and their Standard Metabolic Rate (SMR) was measured at the individual level. The analysis of oxygen consumption slope was done according to the protocol described in Régnier *et al.* (2010). As no relation was found between initial relative SMR (relative SMR = SMR divided by wet weight) and growth, results were not detailed in the present article. These measures took 2 to 10 days during which fish were kept at 11°C in commercial mineral water. Then 128 glass eels were individually marked. Visible Implant Elastomer (VIE) tags (Northwest Marine technology) were injected

subcutaneously using one color per fish among 4 (blue, yellow, orange and red) and one location on the body among 2 (ventral or dorsal), allowing individual recognition within a group of 8 fish. We formed 16 groups corresponding to the four groups of our experimental design (AM+, AM-, SM+, SM-) repeated 4 times.

Biometrics measurements and pigmentation stages

Glass eels (64 per season) were anesthetized (Eugenol 1/10 in alcohol, 0.3 ml.l⁻¹), measured (± 0.1 cm) and weighed after blotting (Sartorius CP 153 balance, ± 1 mg), respectively on 2009, December 7 for the autumn run, and 2010, April 6 for the spring run. In order to compare the age of glass eels, pigmentation stages (VA no pigmentation to VIA4 fully pigmented and end of metamorphosis) were assessed according to multicriteria (Elie *et al.* 1982). Then fish were put by group of eight (4 colours x 2 tags location) in aquaria (8 aquaria per season, half of them devoted to M+ / M- fish). They were fed *ad libitum* with live blood worms (BW) *Chironomus sp.* and the number of delivered and consumed worms per aquarium and per day was noted. However, the spring glass eel were unfed two days in order to be re-marked (24/05/2010). Only 9 of the 64 spring glass eels were re-marked to ensure their identification during trial 3 (their average SGR was within the standard error of the others).

After 3 months (respectively the 09/03/2010 and the 07/07/2010 for the autumn and spring run) fish were measured and re-weighed allowing the calculation of Specific Growth Rate (SGR):

$$\text{SGR} = (\ln W_t - \ln W_i) \times 100/t$$

Where W_t: final weight; W_i: initial weight, t: total days.

Condition Factor (CF) was calculated according to Ricker's equation (1975): $CF = 1000(W/L^b)$ where W: weight, L: Length and b the slope from the linear regression between ln weight and ln length (b = 2.9).

	Autumn			Spring		
	T°C	Duration (days)	Degree days	T°C	Duration (days)	Degree days
Before Trial 1	11 ± 0.1	6	Day 6 : 66	11.9 ± 0.03	5	Day 6: 71
Trial 1	11.5 ± 0.4	11	Day 17: 193	12.6 ± 1.2	11	Day 17: 216
Between	12.8 ± 0.7	10	Day 27: 322	14.4 ± 1.4	17 ^a	Day 27: 366
Trial 2	11.4 ± 0.6	11	Day 38: 447	12.3 ± 0.4	11	Day 38: 502
Between	11.3 ± 0.5	18	Day 56: 651	11.5 ± 0.2	17	Day 56: 716
Trial 3	11.3 ± 0.2	11	Day 67: 775	11.5 ± 0.1	11	Day 67: 841
Until end	11.7 ± 0.7	24	Day 91: 1055	11.6 ± 0.2	19	Day 91: 1118

Table 2: Temperature maintained during experiment on autumn and spring glass eels, recorded during and between Trials. Values are mean ± SD. ^a Failure of the cooler system during spring (temperature rise up to 16°C for 5 days).

Tank design

Sixteen aquaria (50 cm long, 25 cm large and 25 cm high) were filled up to 15 cm high (outflow height). Water was re-circulated through filter and UV light and renewed within 45 minutes, thanks to an inflow coming from a big tank (25 m³) filled with river Nivelle water and maintained at constant temperature. Thanks to this open water system, nitrites and nitrates were close to 0, and oxygen close to saturation. In each tank, eight pieces of artificial vegetation mimicking *Elodae* shelters (10 cm high) were placed on the aquarium floor, regularly spaced along a line at 5 cm from the front glass of the aquarium. Photoperiod was similar to the one used during behavioral sorting (12L/12D, separated by 1/2h of dawn and dusk). This aquarium design is not assumed to reflect natural conditions, but it allowed fish to be identified while resting in shelter. Temperature was recorded by VEMCO thermometers (1 measure per hour) throughout the experiment and maintained around 12°C (11.7 ± 0.7 and 12.3 ± 1.3 respectively during the 3 months of the autumn and the spring experiments, see Table 2). This temperature was chosen because it corresponds to the average temperature between October and May in a river close to that sampled (Adour River, De Casamajor et al. 1999). We did not use temperature lower than 11°C, because they are known to inhibit food consumption (Elie, 1979). In addition, mild temperature was not chosen because eels are very sensitive to bacteria and viruses and temperature higher than 15°C are known to increase virulence of these pathogens especially at the glass eels stage (Esteve and Garay, 1991; Esteve et al. 1993, Jacob et al. 2009). Although in the wild autumn glass eels are expected to undergo temperatures that will progressively decrease and spring glass eels will underwent temperatures that will progressively increase, we chose similar temperature for the two runs. Indeed, our prime objective was to compare growth capacity and behaviour of the two runs, both characteristics which are known to be influenced by temperature.

Behavioral observations

Fish were observed over three distinct 9-days trials (one per month over 3 months). During each trial, fish were observed 9 days usually divided in two periods of 5 and 4 consecutive days. Between these two periods, fish behavior was recorded using video camera over 48h in order to compare diurnal and nocturnal behavior (these results are not included in the present paper). During the trial period, fish were fed at half their *ad libitum* consumption to be sure that feeding occurred during daylight observation. Observation took place in front of each

aquarium avoiding any disturbance. Behavioral traits were quantified twice each day, once in the morning (11.0–11.50) and once in the afternoon (13.00–16.30). During the morning sampling, each aquarium was observed during 5 minutes: the activity (swim or rest) and location (floor, shelter or water column) were noted. In addition gregariousness was assessed as the number of contacts that occurred between individuals when they were observed resting on both shelter and floor. During the afternoon sampling, blood worms were delivered one by one and fish behavior individually noted during a sampling period of 20 minutes for each aquarium. A new worm was given as soon as the previous one has been entirely ingested. Since the duration of food delivery was limited, only fish that responded readily to blood worm delivery were observed feeding (usually one to five fish in an observation run). Thus, worms' ingestion during the observation period was directly indicative of motivation to eat. The number of worms eaten as well as the aggression (nose push, bite, BW stolen) given or received by elvers were individually quantified. These particular behaviors were selected because they were described in a previous study (Bardonnnet *et al.* 2009). We summed the data over each 9 days period and for each individual.

Data analysis

For statistical analysis, scores were attributed to each of the observed pigmentation stage at the beginning of the experiment, from 1 to 4 for stages VB to VIA2. Statistical differences between groups (AM-, AM+, SM-, SM+) were assessed using student T-Test and Tukey test for biometrics variables. Differences between behaviors at the group level (AM-, AM+, SM-, SM+) were detected using non parametric test (Wilcoxon and Kruskal-Wallis test). In order to assess the impact of behavioral variables of each trial on the SGR, we used a general linear model with mixed effects (fixed and random, link: log, lme4 package R). Model-fitting began with a saturated model including all behavioral variables of each trial, and aquarium was added as random effect for the intercept. Three correlated variables were discarded: attack received (highly correlated to blood worm eaten) as well as rest and shelter use (highly correlated to contact). Attack given in the model was the sum of nose push, bite and blood worm stolen. The same process was carried out to determine the impact of initial variables, and the effect of length, condition factor, pigmentation stages, relative SMR, season and migratory behavior, on SGR were retained. All statistical analyses were performed using the R software (R Development Core and Team, 2009).

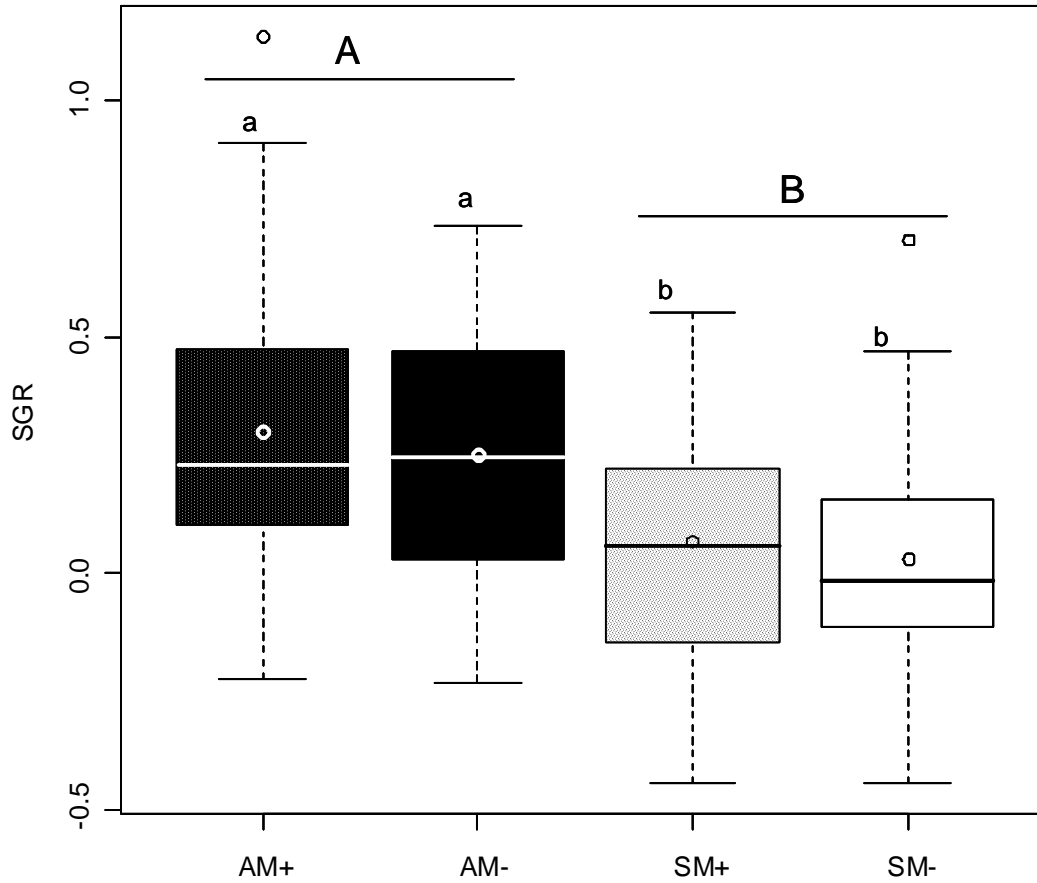


Fig. 25. Box plot representing the SGR of glass eels belonging to migratory fish from autumn (AM+) and spring (SM+) and Sedentary fish from autumn (AM-) and spring (SM-) after 3 months of experimentation. Difference between season are indicated in capital letters (T-Test, $p < 0.05$) and between group in small letters (Tukey Test, $p < 0.05$). Results that did not differ significantly are represented by the same capital letter or lower case. Box plots show the median represented by lines, first and third quartiles as well as extreme values and outliers represented by open circles outside the box. Mean are represented by circle.

Throughout the 3 months, 3 of the 128 glass eels died (2 AM- and 1 SM+) and were discarded from the analyses. A temperature incident (temperature reached 16°C) occurred at the beginning of trial 2 of the spring session. Data were not considered and trial 2 restarted as soon as temperature came back to 12°C (Table 2). However, it created an additional period of food restriction before trial 2. Fortunately, this happened when the ‘*ad libitum*’ mean blood worm consumption was weak (< 2/glass eel/day).

Results

Behavioral sorting

During the first run 13% of the fish moved upstream, 70 % moved downstream and 17 % of the fish remained hidden beneath the shelter after 24 h trapping. Among fish that moved downstream, 64% of them moved during the first hour after dusk. During the second run, 33% of the fish designed as “Migrant” were migrant again (“M+”), while only 6 % were migrant among the “Sedentary” fish. Conversely, 85% of the fish designed as “Sedentary” during the first trapping were caught in the shelter after 24h of trapping (“M-”), while only 45% were sedentary among the “Migrant” fish.

Group level analysis

At the start of the experiment, autumn glass eels were heavier than spring glass eels (279 ± 63 mg vs 257 ± 46 mg, T-test $p < 0.05$). However they did not differ in length (67.7 ± 5 vs 67.5 ± 3 mm). Accordingly, the Ricker’s Condition Factor (CF) was better in autumn glass eels (1.35 ± 0.15 vs 1.26 ± 0.11 , T-test, $p < 0.01$). No significant biometric differences were found between migratory groups. Glass eels pigmentation stages were highly variable especially among sedentary fish, but do not differ significantly among groups (Kruskall-Wallis, $p > 0.07$). At the start of the growing experiment (3 weeks after fishing), most of fish (75%) were at the VIA0-VIA1 stages. After 3 months of growth, final weights were significantly different between autumn and spring elvers (363 ± 105 vs 273 ± 69 , T-test $p < 0.001$) as well as final size (70.5 ± 5 vs 68 ± 4 , T-test $p < 0.01$). The CF was also significantly higher for autumn elvers than for spring elvers (1.55 ± 0.25 vs 1.29 ± 0.21 , T-test, $p < 0.001$). However, their pigmentation stages did not differ among groups (Kruskall-Wallis, $p > 0.73$) and varied from VIA2 to VIA4 after 3 months. The specific growth rate (SGR) was significantly higher in autumn elvers compared to spring elvers (T-test $p < 0.05$) and did not vary according to

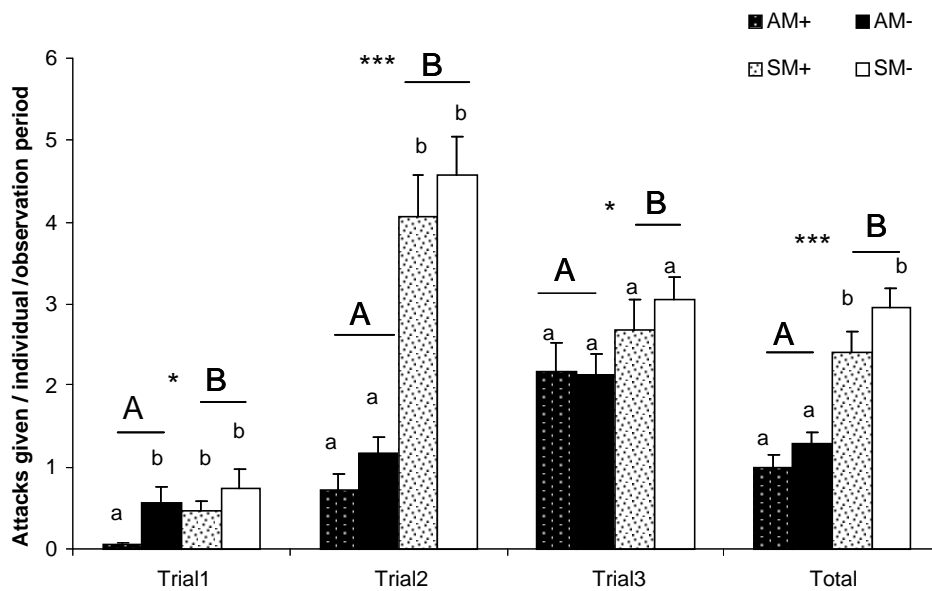


Fig. 26. Mean (\pm Standard Error of the Mean, SEM) number of attacks given per individual per observation period during all trials and average of the 3 trials. Differences between seasons are indicated in capital letters and between groups in small letters. Results that did not differ significantly are represented by the same capital letter or lower case. Wilcoxon Test ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$

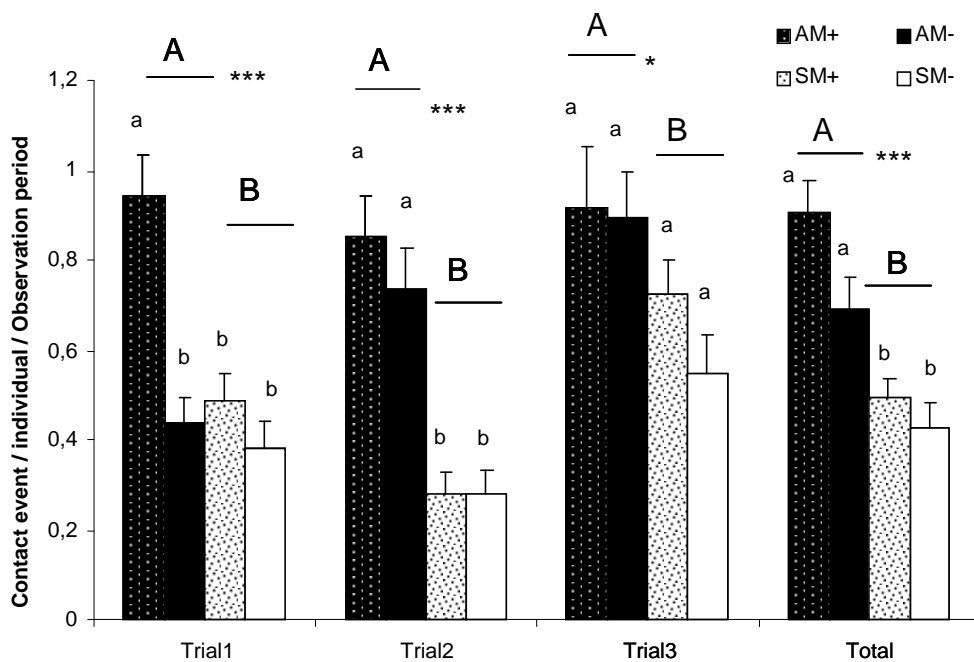


Fig. 27. Mean (\pm SEM) number of contacts with others elvers during the observation period for all trials and average of the 3 trials. Differences between seasons are indicated in capital letters and between groups in small letters. Results that did not differ significantly are represented by the same capital letter or lower case. Wilcoxon Test ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$

propensity to migrate (Fig. 25). Nearly half of spring elvers (43 %) achieved a negative SGR while it concerned only 18 % of the autumn elvers.

Aggressiveness

Autumn elvers were less aggressive than spring elvers and this was significant in all trials (Fig. 26). During trial 1, glass eels belonging to the “AM+” group displayed significantly lower aggressive behavior than the 3 other groups (Kruskal-Wallis test, p-value < 0.01).

Gregariousness

Autumn elvers were much more gregarious than spring elvers and this was significant in all trials (Fig. 27). In most of cases gregariousness was observed during shelter use. Glass eels and later on elvers, entwined each others, mainly on one to three shelters, leaving the other shelters free. It can be noticed that artificial shelters provided many contact points (complex leaves ramifying) and so fish contact can be interpreted as gregariousness rather than simple thigmotaxis.

Activity

The occurrence of swimming was less frequent in autumn elvers than in spring elvers (Fig. 28). This was observed during trial 2 (Fig. 28) and trial 3 (Fig. 28), but not during trial 1. In that trial, AM- fish swam significantly more than AM+ and SM+ fish (Wilcoxon test, p-value < 0.05). The tendency of M- fish to swim more was usually observed during all trials for both autumn and spring elvers.

Blood worms eating

During the feeding survey (20 min day⁻¹), the quantity of blood worm ingested per individual did not differ according to season, neither according to propensity to migrate, excepted during the trial 2 (Fig. 29) when spring elvers ate more blood worm than autumn elvers (Wilcoxon test, p-value < 0.001).

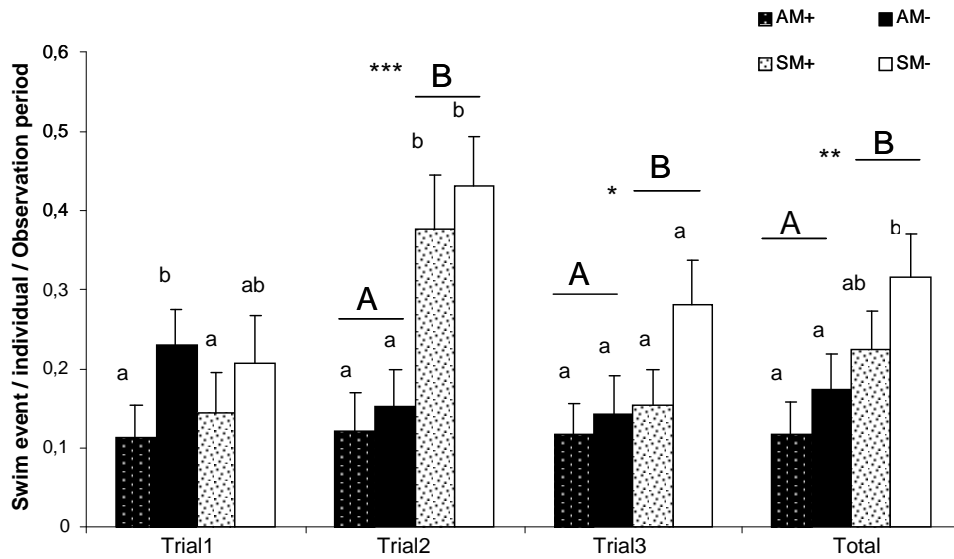


Fig. 28. Mean (\pm SEM) number of Swim events per individual per observation period during all trials and average of the 3 trials. Differences between seasons are indicated in capital letters and between groups in small letters. Results that did not differ significantly are represented by the same capital letter or lower case. Wilcoxon Test ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

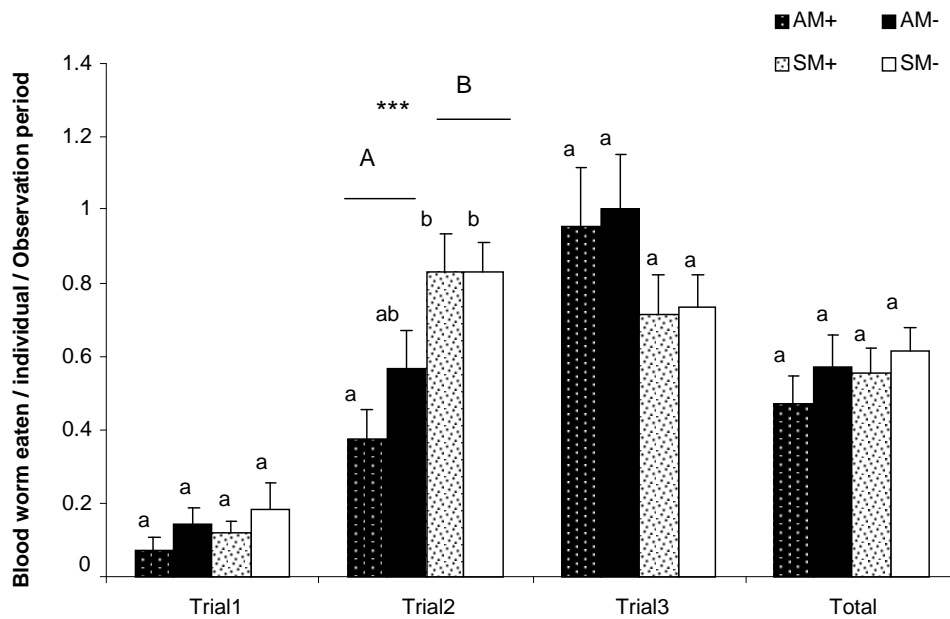


Fig. 29. Mean (\pm SEM) number of blood worm eaten per individual per observation period during trials and average of the 3 trials. Differences between seasons are indicated in capital letters and between groups in small letters. Results that did not differ significantly are represented by the same capital letter or lower case.

In the periods outside observation trials, individuals were fed *ad libitum* (Fig. 30). The total number of blood worms ingested per day was higher for autumn elvers than for spring elvers (Wilcoxon test, p-value < 0.001) between trial 2 and trial 3 (Wilcoxon test, p-value < 0.01) and after trial 3 (Wilcoxon test, p-value < 0.001). No difference in food ingestion was noticed according to migratory behavior (M+ and M- fish).

Individual level analysis

Outputs of our best generalized linear models with random effects built to analyse SGR according to initial parameters (Table 3, model 1) confirm the unimportant role of propensity to migrate or pigmentation stage on SGR and highlight the relevance of season and biometric factors. Autumn origin was associated to high SGR, whilst length and condition factor were negatively related to SGR. Outputs of models built to analyze the contribution of behavioral variables during each trial (Table 3, models 2, 3 and 4) were absolutely consistent concerning the primary contribution of blood worm ingestion and the irrelevance of aggressiveness (“Attack” variable, Table 3). Model 2 allowed to detect 7 outliers, five of them were those that ate the most during the first trial and the two others were the more aggressive during that trial. This was due to the low overall activity observed in the first trial (Fig.26, Fig.29). Thus model 2 was also run without these outliers. Results of both did not differ much (Table 3). Model 4, built on the data from the last trial was much more explicative than models 2 and 3 (lowest Akaike’s Information Criterion, AIC). During that trial, both blood worm ingestion and swimming brought a high contribution followed by gregariousness (“contact” variable, Table 3). Swimming also significantly affected growth during trial 1 (Model 2) whilst gregariousness was highly significant during trial 2 (“contact” Model 3) and during trial 1 (but only when outliers are removed). In all models, blood worm ingestion and gregariousness affected positively growth rate while swimming produced a negative effect on growth.

Discussion

Present results show that autumn recruits have better capacity for early growth than spring recruits when kept under similar artificial conditions. Both initial biometrics parameters and behavior are involved to explain this difference. However, conditions met up in estuaries are much different from those encountered in this experiment, and so conclusions cannot be directly extended to what happens in the wild.

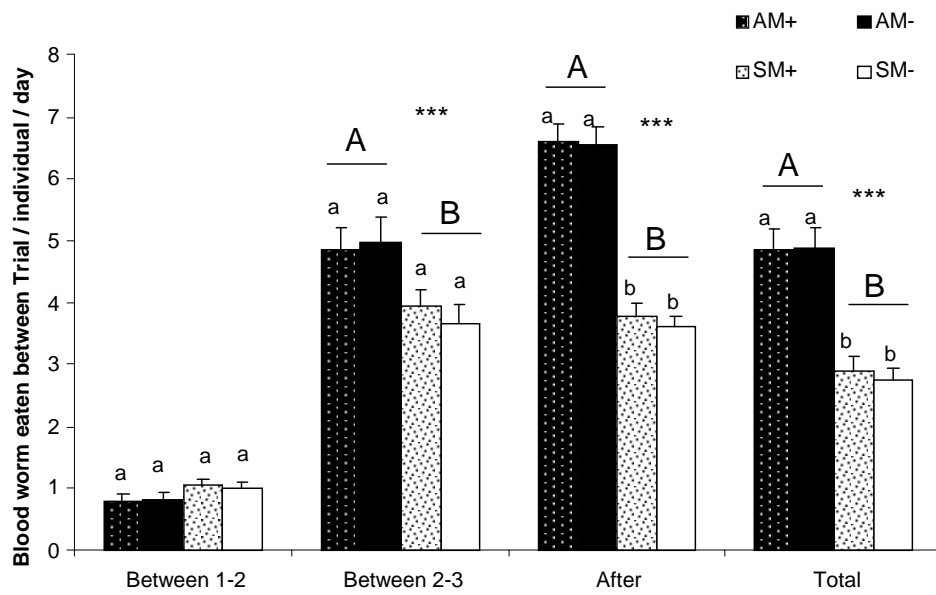


Fig. 30. Mean (\pm SEM) number of blood worm eaten per individual per day between trials and average of the 3 trials. Represented values are mean \pm SEM. Differences between seasons are indicated in capital letters and between groups in small letters. Results that did not differ significantly are represented by the same capital letter or lower case.

Individual Level Analysis

Biometric variables

Many studies have already demonstrated that growth rate decreases in the course of fish ontogenesis (Dou *et al.* 2003; Jonassen *et al.* 1999). However the link between initial size and SGR within a cohort has not been clearly established, likely because it implies data collection at the individual level. In the present study, initial length and condition factor were negatively correlated with SGR (model 1). Glass eel metamorphosis is usually accompanied by a decrease in size of individuals (Desauney & Guerault 1997; Pfeiler 1999). Accordingly, smaller individuals could also be older individuals; however no relationship between pigmentation stage (“age”) and initial size or growth was detected. The lack of relation between pigmentation stage and growth rate is in agreement with Huertas & Cerdà’s (2006) observations. Such independence between pigmentation stage and growth is not surprising owing to the absence of relation between gut development and pigmentation stages (Jegstrup & Rosenkilde 2003). This implies that growth rate is size dependant rather than age dependant (as long as pigmentation is a good descriptor of age in glass eel). The fact that small and thin glass eels were those with the better SGR could indicate that catch-up growth occurred for these individuals (Jobling 2010). Pedersen & Jobling (1989) proposed similar effects on cod *Gadus morhua* with highest SGR observed for individuals presenting the lowest initial condition factor.

Feeding activity

Blood worms were individually delivered at the water surface. Once they had sunk to the floor of the aquarium, they were not easily detected and captured, even by eels that swam very close. Obviously, the cue to identify the prey was not visual. The eel’s ability to detect either food or conspecifics’ chemical components is linked to their highly developed olfactory epithelium (reviewed in Huertas *et al.* 2008). Some elvers were able to ate several blood worms during the 20 min of observation (max: 4 during trial 1, 5 during trial 2 and 7 during trial 3) while other did not eat at all. The clear relation between the number of blood worm eaten per individual during each trial and the SGR (Table 3) indicated that elvers which were the more prone to eat during observation trials were also those that probably eat the most out of the observation period.

Model	Effects	value	Standard error	t-value	p-value	AIC	Adjusted R-squared between SGR and fitted model
1	Intercept	1.86	0.5	3.8	< 0.001***	29.6	27
	Migratory behavior	0.06	0.04	1.5	> 0,05		
	Length	-0.02	0.005	-2.9	< 0.01**		
	Condition factor	-0.38	0.14	-2.6	< 0.01**		
	Saison	-0.23	0.04	-5.7	< 0.001***		
	rSMR	-0.0008	0.002	-0.5	> 0,05		
	Stage VIA0	-0.03	0.08	-0.3	> 0,05		
	Stage VIA1	0.056	0.08	0.69	> 0,05		
	Stage VIA2	-0.01	0.09	-0.1	> 0,05		
2	Intercept	0.09 (0.05)	0.05 (0.05)	1.79 (1.1)	> 0,05	22.8 (21.43)	16 (20)
	Swim1	-0.2 (-0.19)	0.09 (0.09)	-2.16 (-2.1)	< 0.01***		
	Attack1	-0.006 (-0.06)	0.03 (0.04)	-0.26 (-1.6)	> 0,05		
	Gregariousness 1	0.10 (0.11)	0.05 (0.05)	1.88 (2.1)	> 0,05 (< 0.01**)		
	Blood Worm 1	0.31 (0.82)	0.07 (0.16)	4.6 (5.1)	< 0.001***		
3	Intercept	-0.07	0.06	-1.18	> 0,05	22.3	21
	Swim 2	-0.04	0.09	-0.4	> 0,05		
	Attack2	-0.01	0.01	-1.1	> 0,05		
	Gregariousness 2	0.23	0.05	4.17	< 0.001***		
	Blood Worm 2	0.2	0.04	4.66	< 0.001***		
4	(Intercept	-0.07	0.04	-1.7	> 0,05	19.1	51
	Swim 3	-0.37	0.08	-4.8	< 0.001***		
	Attack 3	0.015	0.01	1.5	> 0,05		
	Gregariousness 3	0.077	0.03	2.5	< 0.01***		
	Blood Worm 3	0.2	0.02	9.8	< 0.001***		

Table 3: Outputs of the general linear model with mixed effects (glmer) using initial morphometric parameters and behavioral parameters to explain the SGR. Number associated with effects represents trials. Results inside brackets are those from model 2 without the 7 outliers. rSMR: relative Standard Metabolic Rate, AIC: Akaike's Information Criterion.

Aggressiveness

Penaz *et al.* (1991) consider that aggressive acts usually occur when the elver stage is reached (0.8-1.0 g) and Knights (1987) observed that it happened when weight ratio between individuals exceeded 1.5. The eel's aggressive behavior has been described in few studies involving elvers (Kushnirov & Degani 1991; Knights 1987) and yellow eels (Peters *et al.* 1980, Knights 1987) and has been described once in glass eels (Bardonnet *et al.* 2009). In accordance with this last study, aggressive acts were detected as early as the glass eel stage (\pm 0.3 g) and was almost exclusively observed during food delivery. Once caught, the blood worm could last for several seconds in the mouth of the fish during which other individuals pushed and bit the eating individual or even tried to steal the blood worm. Aggressiveness (aggression given) was positively correlated to the number of blood worm eaten (Spearman's rank correlation test $p < 0.001$ for each trial), which in turn affected growth. The link between aggressiveness and growth has been observed in several fish species (e.g., Höjesjö *et al.* 2002; Baras & lucas 2010). However, results from our model analysis indicate that aggressiveness (once the effect of food access has been taken into account) was unrelated to growth rate (Table 3). A negative effect on growth was expected since aggressiveness may be energetically costly if aggressive acts are not associated to food benefits, as observed in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Vollestad & Quinn 2003). However, in the present experiment aggressive acts were only observed during food delivery and were maybe too scarce to impact growth.

Swimming activity

The level of activity explains another part of the SGR values. The negative effect of swimming activity was mainly due to individuals with a high level of activity. Indeed, the model did not give a good prediction for individuals with a low activity. During observation, fish were mostly inactive, and only few (from zero to 2 per aquaria) spent most of their time swimming. Such sharply contrasted patterns have already been described in yellow eels, elvers (Knights 1987) and glass eels (Bardonnet *et al.* 2008).

Gregariousness

Most of fish spent their time entwined together in shelter. Gregariousness observed during trials 2 and 3 was positively correlated with SGR. Despite the number of shelters and the uniform light condition in the aquarium, most eels grouped on a single or two shelters.

Then inter-individual attraction rather than only thigmotaxis was probably involved. This has also been noticed by Dou and Tsukamoto (2003) who observed that glass eels of *Anguilla japonica* were often seen entwined in the same tube while others tubes were free. In addition, these authors observed that glass eels were significantly more in tubes than in sand when both shelters were offered. Several experiments have indicated that group behavior can lead to higher growth rate or feeding success *via* social facilitation (Davis & Olla 1992; Peuhkuri *et al.* 1995; Foster *et al.* 2001; Magnhagen 2007). This may also have been the case here since once one glass eel emerges from a shelter during food distribution most of the group also entered into activity, suggesting that the reaction of one individual triggers the movement of its conspecifics. In addition, social cohesion or tactile stimulation observed when resting could act by diminishing stress response (Allen *et al.* 2009, Soares *et al.* 2011) which in turn may have favored growth (Gilmour *et al.* 2005; Tveiten 2010).

Group level analysis

Propensity to migrate

No significant differences were detected in initial biometric parameters according to propensity to migrate which confirms results obtained by Bureau du Colombier *et al.* (2008) for glass eels from sea (estuarine entrance) origin.

During trial 1 the M+ fish were more gregarious, less aggressive and less active than M- fish. This was significant for autumnal recruits, and the same tendency was observed for spring ones (Fig. 26, 27, 28). The positive relationship between propensity to migrate and gregariousness is in good accordance with the description of glass eels' grouping migrations observed along the banks during mass migration. However, such behavior may also be the result of similar individual response to environmental conditions. Similarly, as they do not eat during migration, or very little (Bardonnet & Riera 1995), lower aggressiveness scores exhibited by M+ fish are quite logical (aggressiveness being related to feeding in the present experiment). Their lower activity is more surprising. Indeed, high propensity to migrate should be associated to swimming behavior. Migration in glass eel is characterized by selective tidal transport (Forward & Tankersley 2001). In this scheme, fish swim with low energy expenditure using the flow to carry them upstream, and remain sheltered from the current during ebb tide to avoid being swept back downstream. In the present experiment, swimming behavior was always associated to the water current coming from the water inlet.

Fish swam against the (very) low water current, but never with the current. It could explain why active fish were mostly M-. Indeed, following the same sorting process as in the present experiment, Bureau du Colombier *et al.* (2009) concluded that negative rheotaxis was associated with high propensity to migrate, and positive rheotaxis with low propensity to migrate. No significant difference or tendency emerged between “Migratory” and “Sedentary” groups during the following trials (Trials 2 and 3). Since, no estuarine synchronizers stood out under our experimental conditions, it is possible that behavior associated to “estuarine migrant” were lost after several weeks in still water, explaining why no difference occurred between groups after trial 1.

No difference in food consumption was detected according to glass eels’ propensity to migrate. Bureau du Colombier *et al.* (2008) showed that M+ glass eels consumed more blood worm and lost less weight than M- fish. However, the duration of Bureau du Colombier *et al.* (2008) experiment was shorter and food consumption gradually increased for M- fish until it almost reached the level of M+ fish at the end of their experiment (44 days). Since the present experiment lasted for 90 days and most of the BW consumption (and so positive growth) occurred after trial 2 (i.e. 60 days after catching) it is not surprising that differences detected by Bureau du Colombier *et al.* (2008) were no longer apparent after 90 days of growth.

Seasonal effect

Seasonal differences were observed, with autumn recruits being heavier and having a higher condition factor than spring glass eels. This is in agreement with many studies focusing on European glass eel recruitments (Poole *et al.* 2004; de Casamajor *et al.* 2000; de Casamajor *et al.* 2001; Bureau du Colombier *et al.* 2007). The lower condition of spring glass eel could be due to experienced temperature. Indeed, under 6°C the number of migrating glass eels drops (Lecomte-Finiger 1981), and so fish could loss weight in relation to waiting time and metabolic expenses. However, in South West France river temperatures are rarely cold enough (i.e minimum 5.5°C in river for usually less than a few days, De Casamajor *et al.* 1999) to induce an extended waiting period. In addition glass eels at the 5B stage were still caught in March. The role of a differential ocean plankton production favoring larval growth is rather proposed to explain these seasonal weight differences (Desauney & Guerault 1997).

Considering that spring glass eels arrived with a lower condition factor than autumn glass eels, they could have adopted an aggressive behavior in relation to this physiological state. Indeed, in case of food deprivation small fish are usually bolder than large fish (Krause *et al.*

1998; Brown & Braithwaite 2004). In an experiment involving young yellow eels Knights, (1987), showed that large fish exhibited the highest aggression scores. One meaningful difference with the present experiment concerns the inter-individual distribution of sizes which was much wider between opponents in Knights' experiment. This may explain why in the present experiment largest fish were not the most aggressive. Despite the fact that spring glass eels were actually more aggressive than autumn glass eels (Fig. 26), we failed to link condition factor and aggressiveness according to the season (results of that model not shown). Autumn glass eels reached higher SGR than spring glass eels. As far as we know, such differential growth linked to the season of recruitment has only been reported once in literature. Santos & Weber (1992) conducted a study on growth potential of glass eels *Anguilla anguilla* according to rearing conditions and found that the elvers caught in the estuary entrance in "October-November" had a better growth than eels captured in "February-March". In both groups, many eels displayed a negative SGR, this could be linked to the temperature chosen which may have been too low to stimulate appetite and growth in all glass eels. Optimal conditions for growing elvers are reported to be 26.5 °C (Seymour, 1989). However, nongrowers individuals are often observed in aquaculture ponds, some fish still looking like fingerling eels even 3 years after being caught (Holmgren, 1996). When fish with negative growth rate or fish showing an exceptionally high growth (outliers Fig. 25) were discarded, autumn elvers still reached a significantly higher SGR than spring elvers: Wilcoxon test $p < 0.01$, autumn $n = 51$ and spring $n = 36$, when negative growth fishes are discarded and T-test, $p < 0.001$ autumn $n = 61$ and spring $n = 62$, when outliers are discarded. The fact that autumn elvers consumed much more blood worms than spring elvers when food was delivered *ad libitum* outside the observation period (Fig. 30) is consistent with their better growth. It is not that easy to conclude on the role played by the number of blood worms eaten during observation because trials 2 show opposite tendencies (probably in relation to compensatory growth following temperature incident of trial 2 for the spring run). Such increase in feeding rate following reduced feeding is well known in aquaculture (Rubio *et al.* 2010) and is described as compensatory growth (Jobling 2010). Aggressiveness (Fig. 26), activity (Fig. 28) and blood worms eaten (Fig. 29) were also outstandingly high at that time. The higher level of gregariousness and the lower level of activity in autumn compared to spring glass eel is consistent with the better growth achieved by the autumn recruits. However, their size and condition factor at the start of the experiment have probably acted to depress growth. Genetic factors associated with period of arrival may have also acted on growing performances.

Indeed, glass eels of approximately the same initial weight caught at different times and locations presented different growth rates when reared in the same conditions (Penaz *et al.* 1991). In addition elvers raised individually in the same condition showed considerable variable growth rate (Wickins, 1985). Pujolar *et al.* (2005) demonstrated that heterozygosity - associated with genetic variability - of some eels was positively correlated with high growth when compared to more homozygous individuals. This idea that differential growth could be associated with genetic variation in individual characteristics has also been recently proposed by Côté *et al.* (2009) when studying growing performance of *Anguilla rostrata* glass eels from different geographic origin.

Conclusion

Behavioral observations made during trials 1, 2 and 3 provided explanations for respectively 16, 21 and 51% of the SGR, while initial parameters explained 27% of the SGR. Among these initial morphometric parameters, the autumnal and spring origin of glass eels is not neutral and represents a consistent hypothesis in favor of a better survival of autumnal recruits. However, the hypothesis proposed by Briand *et al.* (2003) of a positive relationship between initial morphometric parameters and growth rate to explain the higher number of autumnal recruits upstream is not confirmed. Indeed, when investigated at the individual level, in any seasonal group (results of that model not shown), there was a negative relationship between initial size (weight or condition factor) and SGR.

Besides these initial parameters, behavior also impacted growth (through rapid response to food delivery, gregariousness and activity). This confirms the important role of behavior which needs to be taken into account when seeking to understand variation in growth rate (Biro and Stamps 2008).

In eels, early growth rate has rarely been investigated but some authors suggested that it may be a key mechanism affecting sex determination (Huertas & Cerdà 2006). Some studies showed that individuals with rapid growth during their first year tended to become males (Helfman *et al.* 1987; Holmgren & Mosegaard 1996) while opposite results were found in other studies (Poole & Reynolds 1998; Huertas & Cerda 2006). According to our experiment, autumn glass eels achieved a better SGR than spring glass eels and according to Briand *et al.* (2003), they are over-represented upstream where females are more numerous. Whether eels with higher growth rates tend to develop into females remains to be proved. We currently keep these fish growing to shed light on the link between early behavior, growth and sex.

Acknowledgements

We wish to thank the INRA staff involved in those experiments: Emmanuel Huchet, Sophie Laurent, J. Rives and M. Parade helped during the experimental sorting and fish measurement and marking. Emmanuel Huchet set up the aquarium and the water feeding system. Valérie Bolliet helped for the micro-respirometry measurements and Jacques Labonne for the statistical analysis. We also thank Martin Walton for English language corrections as well as two anonymous reviewers for their comments that greatly improved the manuscript. The project was supported by funding from the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) and by the Interreg IV B Atlantic area transnational program (European Regional Development Fund), in the context of the Arc Atlantic Resource Conservation program (AARC). All works herein complies with current French national laws on the handling of animals.

Chapitre 2

Synthèse Article 2 : Impact de l'activité diurne et nocturne sur la croissance des anguillettes - Etude expérimentale à long terme

Questions: Dans quelle mesure l'activité de nuit est supérieure à l'activité de jour chez cette espèce photophobe ? Les individus avec une forte propension à migrer (M+) sont-ils les plus actifs en conditions expérimentales ? Les performances de nage ont-elles un impact sur la croissance à 7 mois ?

Résultats: Les civelles passent, en moyenne, 10 % de temps en plus à nager la nuit que le jour (28 vs 18 %). Les individus M- nagent plus en conditions expérimentales que les individus M+. Il est possible que ce résultat soit lié au fait que les individus M- nagent généralement plus à contre courant. La croissance entre les individus M+ et M- ne diffère pas pendant 7 mois. Bien que l'activité de nage (mesurée de façon plus précise que dans le chapitre précédent) soit négativement corrélée à la croissance pendant les 3 premiers mois, elle devient par la suite positivement corrélée à la croissance entre le mois 3 et le mois 7. Il semble qu'une dizaine d'individus soit plus actif de jour et de nuit que les 50 autres individus (prélevés à l'automne). Cette distinction entre 2 groupes n'est pas liée au potentiel migratoire initial (M+/M-) et semble conservé dans le temps (pendant les 4 sessions d'observations échelonnées sur 7 mois).

Conclusion: L'activité de nage semble impacter différenciellement les individus en fonction de leur stade de développement. Ainsi, pendant la métamorphose, l'activité locomotrice est très coûteuse. Une fois cette métamorphose achevée, les individus qui nagent le plus ont une meilleure croissance que les autres, ce qui peut être lié à un gain de poids musculaire ou à une corrélation positive entre l'activité de nage et la consommation de chironomes. La cohérence de ce comportement de nage à l'échelle circadienne pourrait servir d'indicateur sur le futur potentiel migratoire des individus à l'échelle du bassin versant.

Is there a link between nocturnal and diurnal activity and elvers' growth rate ?

A long term laboratory study

(En preparation)

Benjamin Geffroy^{1,2} & Agnès Bardonnnet^{1,2}.

¹INRA, UMR 1224 Ecobiop, Pôle d'Hydrobiologie, Quartier Ibarron, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France

²UPPA, UMR 1224 Ecobiop, UFR des Sciences de la Côte Basque, allée du parc Montaury, 64600 Anglet, France

Abstract

In many species, the level of activity is correlated to growth. These correlations could either be positive or negative, depending on food quantity and food quality. In eels, two different migratory strategies have been identified as soon as the glass eel stage (juveniles). Individuals could either display a high (M+) or low (M-) propensity to migrate. In the present study we investigated whether these strategies could impact the subsequent locomotor activity and the growing pattern of each fish after 3 and 7 months of rearing in aquaria. The growth rate of M+ fish did not significantly differ from that of M- neither after 3 months nor after 7 months. Glass eels were more active during night time (28% of time spent swimming) than during day time (18%). The locomotor activity was negatively correlated to the growth rate of fish during the first 3 months, while it was positively correlated to their growth rate of fish between month 3 and month 7. Surprisingly, highly active fish during the night were also the most active fish during the day over the 7 months. We discuss this finding in relation to the colonization pattern of the watershed by juveniles' eels.

Introduction

The eel life cycle is one of the most fascinating biological enigma that still remains not completely understood. Indeed, while one century ago, Schmidt (1912) brought the first building block by providing arguments for panmixia in the European eel, many mysteries persisted. Among these mysteries, the mechanism by which eels find their way back to their spawning site (Sargasso Sea) as well as the duration time of the larvae (leptocephali) migration (Bonhommeau *et al.* 2010) are still unknown. Leptocephali are being drift by oceanic currents during a long journey to reach the continental shelf, where they undergo a metamorphosis from a willow leaf-like shape to a snake-like shape (glass eels). Then, glass eels enter estuaries and progressively complete their metamorphosis process by acquiring pigmentation (Elie, 1979; Elie *et al.* 1982). The colonization of the watershed is associated with eel's growth and the development of a yellowish pigmentation (yellow eel stage). It is believed that this is during these first months of freshwater life that sex determination is influenced by the environment (reviewed in Davey and Jellyman, 2005). Finally, both males and females become silver and leave the watershed at different ages and sizes (Poole and Reynolds, 1996) to achieve their final catadromous migration of approximately 5000-6000 km (Van Ginneken *et al.* 2005).

Accordingly, the eel life cycle is a good model to understand how fitness shape behavior, since European eels bear two very long journeys with two ultimate goals: growth and reproduction. While most studies focused on eel's reproduction and thus on the silver eel stage (reviewed in Van Ginneken and Maes, 2005), few experiments aimed to investigate growth rate from the glass eel stage to the yellow eel stage. In fish, growing pattern and final size at maturation were shown to be linked to gonad size and energy allocation to the offspring (Bagenal, 1969; Bromage and Jones, 1991; Quinn *et al.* 1995, Han *et al.* 2003). In addition, many studies investigated how early growth rate may affect survival (Pepin *et al.* 2003, Johnsson and Bohlin, 2006) or behavior (Johnsson and Björnsson, 1994; Bizeray *et al.* 2000, Stamps 2007). The link between growth rate and behavioral traits in different taxa was recently reviewed by Biro and Stamps (2008). Nevertheless the cause and effects may be hard to disentangle. Migratory species are good models to investigate these questions, since migrating animals are expected to grow faster than non-migrating ones (Roff, 1988; O'Rian and Braude 2001) mostly due to energy cost of migration. For instance, early growth rate of salmonids fish was shown to impact both the age at parr-smolt transformation and the timing of migration (McCormick and Saunders, 1987; Jonsson and Jonsson, 1993; Secor, 1999;

Cucherousset *et al.* 2005). Conversely, eels might be used to study how early migratory behavior may impact future growth rate. Indeed, as soon as the glass eel stage, they already exhibit sharply different life history strategies that may lead to different growing patterns. Some glass eels are using a selective tidal-stream transport (STST) to enter the estuary (Wippelhauser and McCleave, 1987). This process may allow them going further while saving energy (up to 80 % for small fish, Weihs, 1978), since it consists of moving up the water column during flood tide to enter the estuary and moving down to the bottom during ebb tide (Forward and Tankersley, 2001). Conversely some other fish are moving during ebb tide, displaying a positive rheotaxis (Creutzberg, 1961), which may be more energetically costly. A recent study reproducing current reversal flow in laboratory condition allowed detecting these two kinds of fish (Bolliet and Labonne 2008) that may be encountered in nature. These authors proposed that positive rheotaxis was linked to energy loss (through weight decrease) as suggested by Hickman (1981). Concomitantly to the STST, the level of light was pointed out as an important factor influencing glass eels movement in both nature (Creutzberg, 1961) and laboratory conditions (Bardonnnet *et al.* 2003, 2005a), with sunset triggering a massive arrival with the flow.

While conditions that allow and trigger movements from the sea to the estuary are well studied (e.g. Cantrelle, 1981; Gascuel, 1986, 1987; Tosi *et al.* 1990, Bardonnnet *et al.* 2005a *opp. cit.*), little is known about activity pattern after entering the estuary. The time spent swimming (arguably associated with energy loss) of each migratory group during both night and day might have consequences on glass eel's growth rate. In the present study we investigate, under laboratory condition, the potential impact of both diurnal and nocturnal activity on the individual growth rate at different time (3 and 7 months). In addition we try to determinate whether or not long term activity pattern of each fish could differ according to their initial migratory strategy.

Materiel and Method

Animals

Glass eels were caught on November, 18th 2009 at the mouth of courant d'Huchet estuary (Molliet, South-Western France, 43°51' N, 1°23' W), at the beginning of nocturnal flood. On the morning following their capture, 1300 glass eels were placed in an experimental flume (annular tank of 10 m long) to be sorted according to their propensity to migrate with the flow

following the dusk signal or to remain under shelter. In the past, we successfully conducted this experiment that allowed discriminating between these two kinds of fish (Bardonnnet *et al.* 2003, Bureau du Colombier *et al.* 2007, 2008, 2009). Fish used in this experiment were those also described in a previous study (Geffroy and Bardonnnet, 2012). Briefly, 650 glass eels were released at mid-part of each section of the flume, where a synthetic turf shelter (1 m^2) was placed. The current velocity was $10 \pm 1 \text{ cm s}^{-1}$, water temperature was maintained at $11.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and the photoperiod was 12 L/12 D with 30 min of dawn (07:00–07:30 h) and dusk (19:00–19:30 h). Glass eels that were collected in the downstream trap (in the first hour following dusk) and thus moving with the flow were noted “M+” (with negative rheotaxis). In contrast, those fish that stayed in the turf shelter on the following morning were noted “M-” (not moving fish). This test was performed twice in raw and only those fish that presented the same behavioral pattern during the two sorts were kept. At the end of the first sorting, 881 “M+” and 146 “M-” were obtained. From the second sorting, 81 “M-” fish and 115 “M+” fish were obtained. Among these fishes, 32 glass eels from each group were randomly selected for further analyses.

Biometrics measurements and individual marking

The growing experiment started in December (Month 0 further called M_0), on the 07/12/09. Sixty four glass eels were anesthetized (Eugenol 1/10 in alcohol, 0.3 ml.l^{-1}), measured ($\pm 0.1 \text{ cm}$) and weighed after blotting (Sartorius CP 153 balance, $\pm 1 \text{ mg}$). They were individually marked with Visible Implant Elastomer (VIE) tags (Northwest Marine technology) injected subcutaneously using one color per fish among 4 (blue, yellow, orange and red) and one location on the body among 2 (ventral or dorsal). These VIE tag colours were chosen because they were fluorescent, allowing individual recognition during the night under UV light. The 32 glass eels from the M+ group were equitably placed in four aquaria (08/12/2009), forming groups of 8 glass eels individually marked with VIE tags. The 32 glass eels from the M- group were divided the same way in four aquaria. They were fed *ad libitum* with live blood worms (BW) *Chironomus sp* and the number of prey eaten per aquaria and per day was noted. After 3 and 7 months (sampling times, M_3 and M_7) of growth (respectively the 09/03/2010 and the 07/07/2010), glass eel was measured and weighed again allowing the calculation of Specific Growth Rate (SGR, the percentage of growth/day) according to Jobling (1994):

$$\text{SGR} = 100 \times [(\ln W_t - \ln W_i)/T]$$

Where W_t : final weight; W_i : initial weight, T : total days. SGR_{0-3} corresponded to the growth rate between December and March and SGR_{3-7} to the growth rate between March and July.

Tank design

Aquaria (50 cm long, 25 cm large and 25 cm high) were filled up to 15 cm high (outflow height). Water was re-circulated through filter and UV light and renewed within 45 minutes, thanks to an inflow coming from a big tank (25 m³) filled with the Nivelle river water and maintained at constant temperature. In each tank, eight pieces of artificial vegetation mimicking *Elodae* shelters (10 cm high) were placed on the aquarium floor, regularly spaced along a line at 5 cm from the front glass of the aquarium. Photoperiod was similar to the one used during the behavioral sorting (12L/12D, separated by 1/2h of dawn and dusk). Daylight intensity was maintained at 11.2 lux and was 8.9 lux during the night period. Temperature was recorded by VEMCO thermometers (1 measure per hour) throughout the experiment and maintained at 12°C ± 1, except during 4 days at 5 months when the temperature regulator broke down (T° increased up to 16°C and return to normal after 3 days).

Behavioral observations

Fish behavior was recorded using video cameras (CR Sony HD XCD-SX910/CR) over 4 distinct trials: at T_1 , T_2 , T_3 and T_6 , *ie* each month after the start of the experiment, for 3 months, and then the 6th month. In order to detect fish during night time, UV tube lamps (Philips TL-D, 18 W, BLB) were placed 20 cm above each aquarium. It is likely that the presence of UV did not impacted the behavior of glass eels since it as been shown that the cone opsins of glass eels and the rod opsins of fish are not sensitive to UV light (Cottrill *et al.* 2009; Hunt *et al.* 2001). Videos recording lasted 24 hours for each trial and were saved on SATA disks to be analysed by the same operator (BG). Individuals could either be resting (floor or shelter) or swimming (floor or water column). Motionlessness period shorter than 5 sec, were not considered. The time spent (milliseconds) by each individual resting or swimming was analyzed during 2 minutes during daytime (at 8:00-10:00-12:00 and 14:00; dusk at 19:00, and feeding in the afternoon) and during night time (20:00-23:00-2:00 and 5:00; dawn at 7:00), thanks to the public domain software JWatcher

(v.1.0, www.jwatcher.ucla.edu). Fish were fed *ad libitum* during video recording, but individual feeding sampling was not accurate due to the angle of view which did not authorize a good sight of blood worms on the aquarium floor. To assess food intake, we use behavioural observations data collected 2-4 days before and 2-4 days after (6 days in a round) each video recording. Bloodworms were delivered one by one for a period of 20 minutes per aquarium each day. As soon as a prey was consumed, another one was added and the number of bloodworm eaten by each individual was noted.

Data analysis

Biometric data (weight, length and condition factor) were compared between migratory groups (M+/M-) using T-Test. The total number of blood worm eaten by M+ and M- fish during the first 3 months and from Month 3 to Month 7, were compared using a Wilcoxon-test. Differences between activity patterns (% time swimming) displayed during night or day within each trial were assessed using Wilcoxon-test. In addition, the activity patterns between trials (T₁, T₂, T₃ and T₆) and between day and night were compared using the Scheirer-Ray-Hare (SRH) extension of the Kruskal-Wallis test (Sokal & Rohlf 1995), corresponding to a non-parametric 2 factors ANOVA. The SRH test was also used to investigate variance in activity patterns according to initial migratory group (M+/M-) and trials (T₁, T₂, T₃ and T₆). In order to assess the impact of initial weight, activity and time of the day (darkness or daylight) on the SGR, we used a linear model with mixed effects (fixed and random, lme4 package R). Random effects were the aquaria and we used a link “log” was used since variance increased with SGR (especially between the first 3 months of the experiment). Model selection was based on Akaike’s Information Criterion, AIC. All statistical analyses were performed using the R software (R Development Core and Team, 2009).

Results

Throughout the 7 months, 4 of the 64 glass eels died (3M+ and 1M-) and were discarded from the analyses. One of them was always observed lying on the bottom, while the three other behaved like most glass eels.

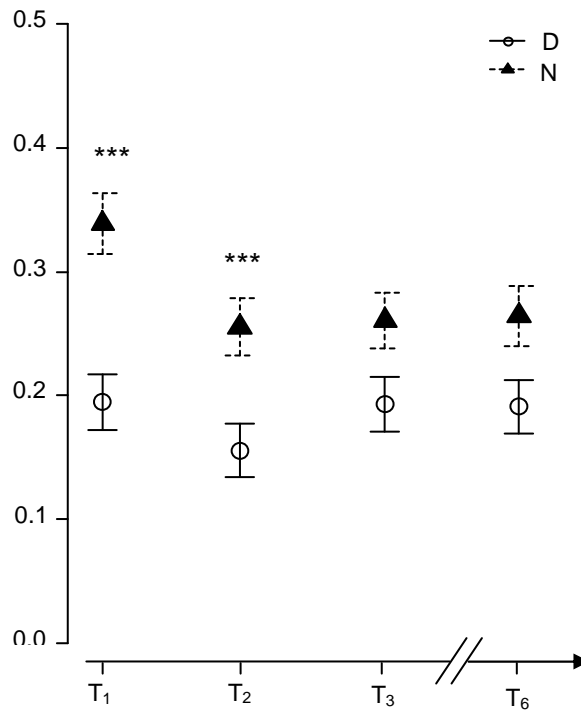


Fig. 31. Mean activity pattern for all glass eels during trial 1, 2, 3 and 6 at night (N) and day (D). The bar represents the standard deviation of the mean (SEM).

		Sum of square	H	p-value
Model 1-SHR	D/N	13747331	44.7	< 0.001***
	Trial	32918	0.11	0.74
	D/N:Trial	1163065	3.78	0.052 .
Model 2-SHR	M+/M-	9330932	30.35	< 0.001***
	Trial	32918	0.11	0.74
	M+/M-:Trial	99859	0.32	0.57

Table 4: Results of the Scheirer-Ray-Hare (SRH) model. Model 1 was set up to assess the effect of trials and circadian period on the total swimming activity of fish and Model 2 was set up to assess the effect of trials and the migratory behavior on the total swimming activity of elvers.

Biometry and foraging according to initial migratory pattern

At the beginning of the experiment, M- fish tended to be slightly lighter 272 vs 289 mg (p-value =0.3, T-test) and slightly smaller 66.6 vs 68.9 mg (p-value =0.07, T-test) than M+ fish, but differences were not significant. No differences in specific growth rate appear significant between M- and M+ glass eels, neither between 1 to 3 months (mean value 0.27 vs 0.31, p= 0.49) nor between 3 to 7 months (mean value 0.31 vs 0.27, p= 0.57). While during the first 3 months, both M- and M+ fish were eating the same number of blood worms (mean value : 29 vs 27 blood worm per day per migratory group, p-value = 0.35) this was not the case from March to July. During this second period, M- fish ate a third more than M+ fish (mean value throughout 4 months 44 vs 31 blood worm per day per migratory group, p-value < 0.001).

Activity

Wilcoxon-test revealed that the percentage of time spent in activity during darkness was significantly higher than during daylight for the first 2 trials (T₁, p-value < 0.001; T₂, p-value < 0.001, Fig. 31). Conversely, it was not significant at T₃ and T₆ (p-value > 0.1). Overall, the percentage of time spent in activity was higher during night time (28%) than during day time (18%) (Fig. 31, Table 4 Model.1-SHR p<0.001).

The level of activity changed according to trials. Nocturnal activity tended to decrease after T₁ while diurnal activity tended to decrease at T₂ (Fig. 31, Table 4 Model.1-SHR, p=0.052). Comparing activity patterns according to initial migratory pattern, the level of activity of M- fish was higher than the level of activity of M+ fish (Fig. 32, Table 4 Model.2-SHR p<0.001) and the interaction with time (trial date) was not significant (Table 4 Model.2-SHR p<0.57).

Except at T₆, it should be noted that activity was still significantly higher (Wilcoxon-test, p-value < 0.01) just after the artificial “dawn” (mean of 8h= 23 %) when compared to the rest of the day (mean of 10h, 12h and 14h =17%) (Fig. 32). In addition, level of activity changed according to time with nocturnal activity that tended to decrease and diurnal activity that tended to increase in the course of the study (Fig. 31, Table 4 Model.1-SHR, p=0.052).

Overall, the level of activity of M- fish was higher than the level of activity of M+ fish (Fig. 32, Table 4 Model.2-SHR p<0.001) but the interaction with time (trial date) was not significant (Table 4 Model.2-SHR p<0.57).

Growth rate

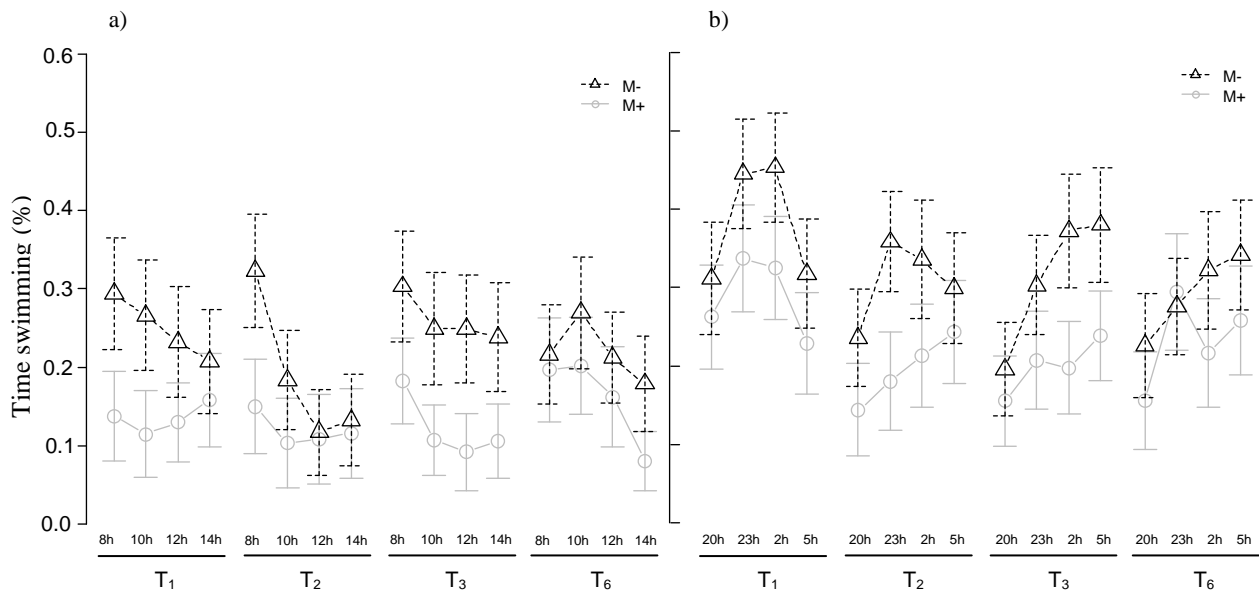


Fig. 32. Mean time spent swimming (%) for both migratory groups (M- and M+) during the different sampling time of a) the day and b) the night.

	Parameterers	estimated value	p-value	% *
SGR₀₋₃				
	Weight T ₀	-0,001	<0.01***	
	Bw ₃	0,028	<0.01***	50
	Activity ₃	-0,310	<0.01***	
	Bw ₃ x Activity ₃	-0,010	>0.2	
SGR₃₋₇				
	Weight T ₃	0,001	<0.01***	
	Bw ₆	0,023	<0.01***	30
	Activity ₆	0,296	<0.01***	
	Bw ₆ x Activity ₆	-0,024	<0.01***	

Table 5: Results of the general linear model with mixed effects. The first model was built to assess the impact of initial weight, food intake (Bw₃) and activity at 3 months on the SGR₀₋₃. The second model was built to assess the impact of weight at 3 months, food intake (Bw₆) and activity at 6 months on the SGR₃₋₇. * Percentage of total variance of the SGR explained by the model.

During the first period of rearing the initial weight of fish was negatively related to the SGR_{0-3} . Conversely, during the second period, the weight at 3 months was positively correlated to SGR_{3-7} (Table 5).

The number of blood worms ingested by glass eel at 3 months (Trial 3) was positively related to the growth rate achieved by individuals during the first 3 months (SGR_{0-3} , Table. 5), whereas the time spent swimming was negatively related to the SGR_{0-3} (Table 5). The interaction effect between food and activity was not significant. Thus, the growth of fish was negatively correlated to activity no matter the food intake.

The number of bloodworms ingested by each glass eel at 6 months (Trial 6) was positively related to the growth rate achieved by individuals between M_3 and M_7 (SGR_{3-7} , Table. 5). During this second period of rearing, growth rate was also positively related to activity. Moreover the interaction between prey eating and activity was significant (Table. 5). Analyses of food intake against growth rate for fish categorized according to their activity level, indicate that the relation between food intake and growth was null when the level of activity was high, but became positive at low level of activity. However, highly active fish still displayed a higher growth than more quiet individuals. Adding the variable “day/night” for the activity did not improved the model (higher AIC with this variable) at both 3 and 6 months, thus this variable was discarded from both model.

Discussion

This study, by focusing on early behavior of glass eels under laboratory conditions, showed that activity impacted individual growth rate differently according to ontogenesis.

Night/Day Activity

Glass eels from different eel's species are known to display a strong negative phototaxis in both natural (Creutzberg, 1961; Jellyman, 1977, Tzeng, 1985; Gascuel, 1987) and experimental condition (Dou and Tsukamoto, 2003; Bardonnet *et al.* 2003, 2005a). In the present study, nocturnal activity of glass eels of *Anguilla anguilla* was almost twice that of diurnal activity (34% vs 19% of total observed time) after one month in captivity. Dou *et al.* (2003) also showed that activity was enhanced during night time in *Anguilla japonica*. Nevertheless, in their experiment aiming to determinate the influence of temperature on activity, these authors also showed that this contrasted pattern was remarkable for temperature above 15°C. In our experiment conducted at 12°C, the overall time spent in activity was

much higher than in all conditions tested (15°C, 20°C and 25°C) by Dou *et al.* (2003), suggesting behavioral differences between species that were not expected. In yellow eels, direct observation made in Florida cave-spring also indicated that individuals were more active during the night and readily changed behavior at dawn and dusk (Helfman 1986).

Throughout the glass eel development, nocturnal activity tended to decrease, while diurnal activity tended to increase (SHR-test, $p=0.052$). Dou and Tsukamoto (2003) reported that glass eels usually came out at night to forage. Thus, we cannot rule out that the decrease of nocturnal activity in the present experiment was linked to the fact that food was provided during daytime (to allow behavioral observation). However, Sorensen and Bianchini (1986) also observed that elvers of *Anguilla rostrata* might progressively become active during day time as they colonize the watershed. Following dawn (8:00 sampling), glass eels were still more active than the rest of the day (p -value < 0.01). Even, if we do not built periodograms, our data support that swimming activity in glass eel and elvers follows a nycthemeral rhythm, with a peak of activity in the middle of the night. It should be noted that ten fish displayed an overall higher activity level than other individuals during both night and day.

M+/M- Activity

Glass eels selected according to their high propensity to move with the flow (M+) were less active throughout the experiment than glass eels selected according to their settling behavior (M-) (SHR-test, $p < 0.001$), but their nycthemeral pattern was similar. This difference of overall activity between migratory groups may appear puzzling. Nevertheless it should be noted that using the same apparatus (flume), Bureau du Colombier *et al.* (2009) showed that most glass eels described as M+ still conserved their negative rheotaxis (58% of the fish) when placed in an annular aquaria with water current reversal every 6.2 hours to mimic tidal cycles. On the contrary, 75 % of glass eels described as “M-” displayed a positive rheotaxis when placed in the same annular tank. Fish that were swimming in our experiment were mostly those that used the small water current created by the circulating pump (as observed by Bardonnnet *et al.* 2008 in similar conditions). Thus it is logical to conclude that many M- fish conserved their positive rheotaxis throughout time, while the majority of M+ fish did not exhibit such behavior.

Growth rate

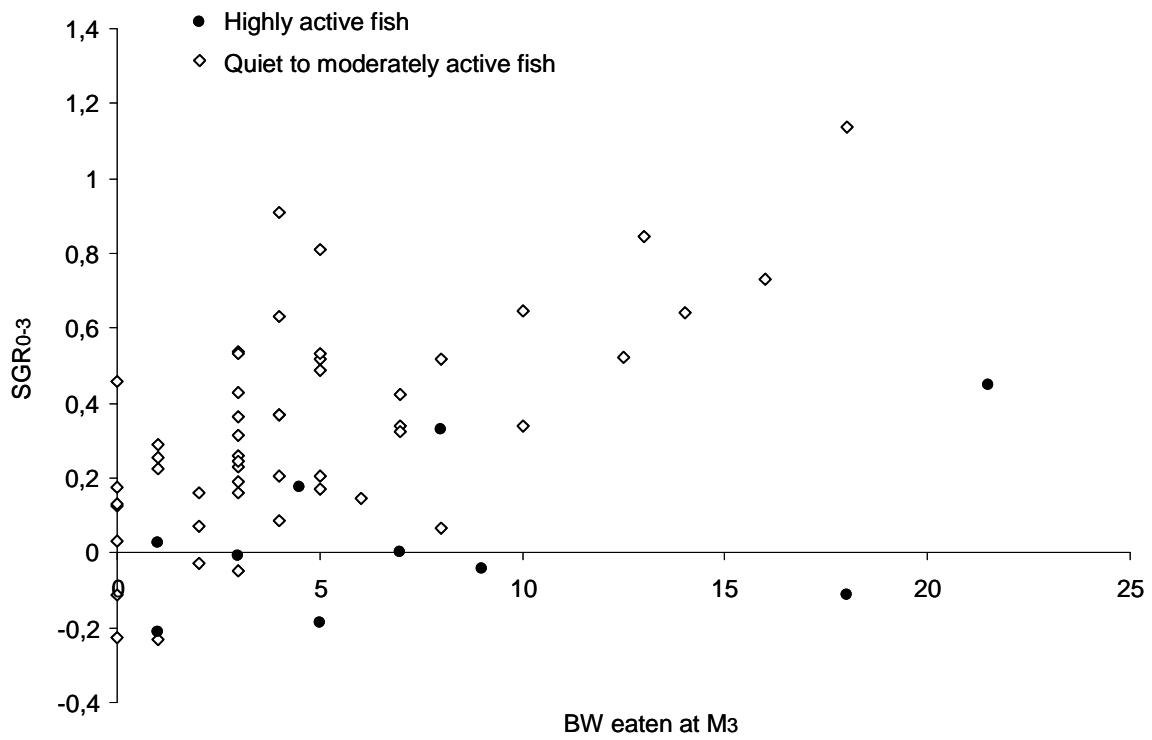


Fig. 33a Relation between growth rate from 0 to 3 months (SGR_{0-3}) and the total number of bloodworm eaten during observations at month 3. Black points represent the 10 most active fish during that period. White points represent quiet to moderately active fish.

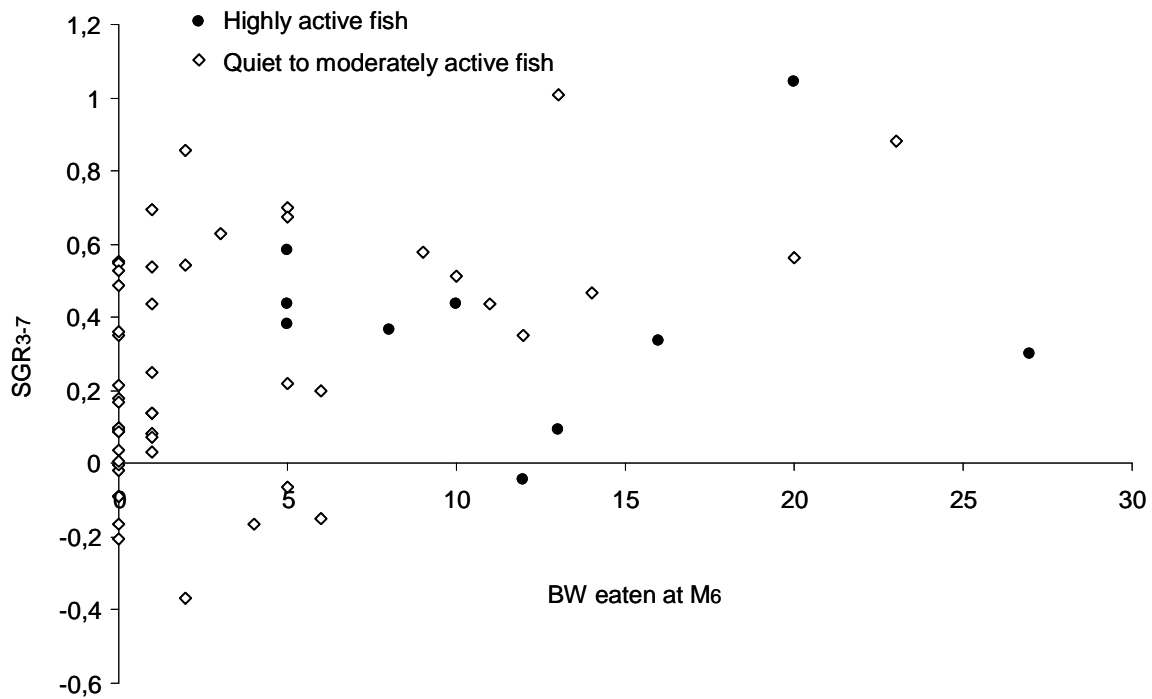


Fig. 33b Relation between growth rate from 3 to 7 months (SGR_{3-7}) and the total number of bloodworm eaten during observations at month 6. Black points represent the 10 most active fish during that period. White points represent quiet to moderately active fish.

During the first period of growth and for a similar rate of feeding, highly active fish ($n = 10$, 4 M+ and 6 M-) grew less than other fish (Fig. 33a). In that case, high activity level depresses growth. This was not observed during the second period, where similar performances were observed between highly active and quiet to moderately active fish at similar feeding rates (Fig. 33b).

Glass eel corresponds to a particular phase of eel ontogenesis after leptocephalus metamorphosis. They start their migration from the mouth of the estuary, up to the tidal limit, and progressively pigment to reach the elver stage (young eel). During metamorphosis they also complete their morphological changes and especially they shorten and loose weight. Hence, growing and metamorphosis were potentially interacting. During the first period of growth (M_0 - M_3), glass eels were still in the course of metamorphosis (at M_0 , 45% belong to the 5B-6A0 pigmentary stages, *ie* quite early in the metamorphosing process) and all of them were probably not yet ready to eat live blood worms (33% eating fish during the diurnal set of observations around T_1 , against 80% and 88% respectively, one and two months later). The negative link between size at M_0 and SGR_{0-3} indicates that fish were possibly in a catch-up-process, in relation with metamorphosis. At T_1 , 4 among the eight highly active fish (*i.e.* 50%) were fasting during direct observations. In comparison, 70% of less active fish were fasting. Thus, active fish were not especially late in starting feeding. Accordingly, additional cost of being active would have deleterious effect on weight gain during the first months in freshwater.

Interestingly, while the lightest glass eels were those with the better growth during the first months of experiment, the biggest ones at 3 months were those achieving the highest growth rate between 3 to 7 months. This pattern could be explained by the progressive establishment of a hierarchy at the aquarium scale, with biggest monopolizing food. The monopolization of food by dominant is a well known phenomena (Hirsch, 2007) and was reported to be related to size in many fish species (Francis, 1983, Grandt and Guha, 1993; Maclean and Metcalfe, 2001; Hamilton, 2002). The increase in weight variance within aquaria at M_7 supports that such a hierarchy also takes place in eel (Fig. 34). In that species, the importance of size in dominance and food access was also demonstrated in pair tournament, with elvers that were at least 1.5 the weight of their oponent beeing the most agresives (Knights, 1987).

For many fishes, skewed size distributions are generally reported to be the consequence of social interactions. For instance, Nakamura and Kasahara (in Wohlfarth, 1977) showed that communally-held carp fry displayed huge size variation compared to those rose individually. Others factors might have been involved in differential growth rates between individual.

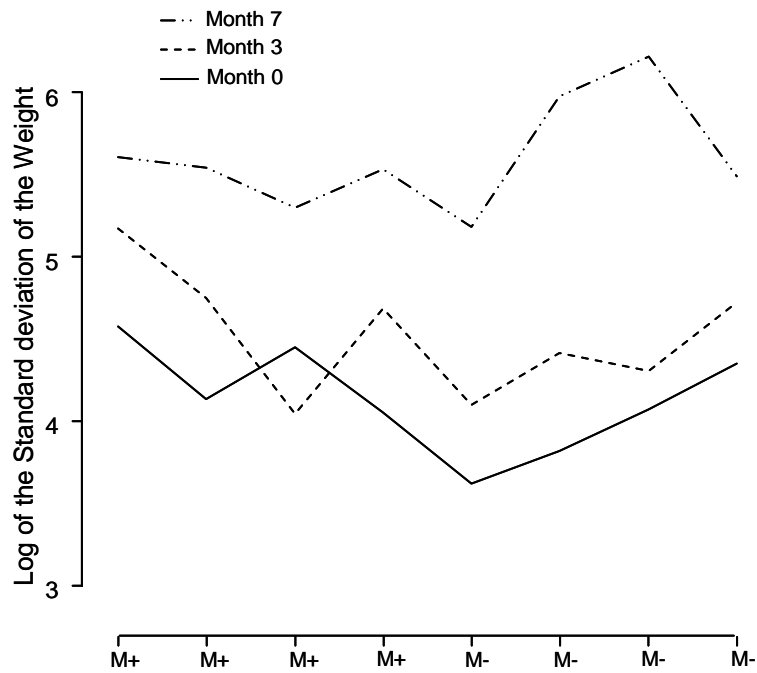


Fig. 34. Log of the standard deviation of the weight per aquarium (4 M+ and 4 M-) according to the time (0, 3 and 7 months). Note that in 3 aquaria, a total of 4 fish died (2, 1 and 1).

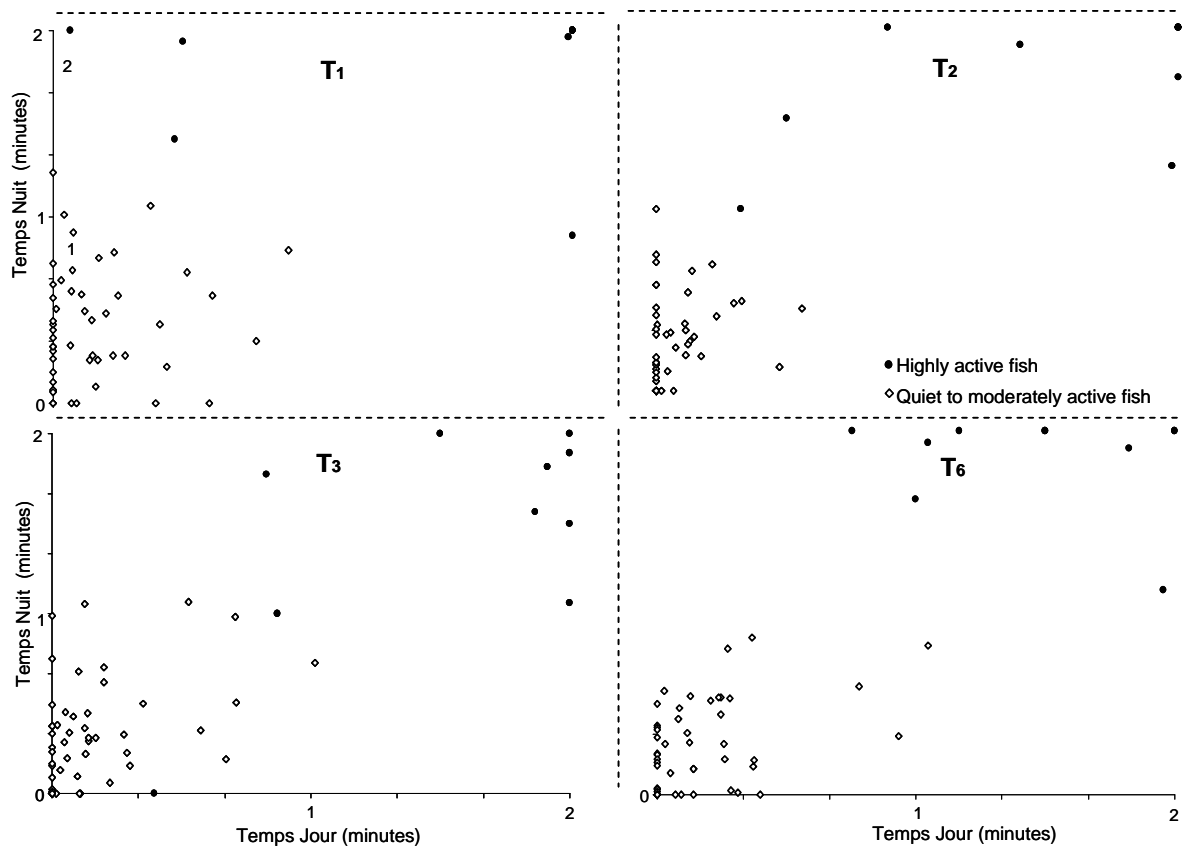


Fig. 35. Mean level of swimming activity during the night and during the day at T₁, T₂, T₃ and T₆. Note that the most active fish during the T₆ period and represented in black are the same individuals that those represented in black at T₁, T₂, T₃.

The role of different rSMR has been highlighted (Boily and Magnan, 2002; Arnott *et al.* 2006), but others genetic factors (considering that rSMR is partly heritable) might also explain these differences. Wickins (1985) showed that newly caught elvers raised in isolation presented higher growth variability than those raised in communal tanks. At the sub-cellular scale, Pujolar *et al.* (2005) demonstrated that heterozygosity for some allozymes was associated with high growth rate, but this accounted for only 5 % of the growth rate variability between individuals.

At the group level, M+ and M- fish did not exhibit any difference in their growing performances, despite the marked difference in their activity level. In the course of the first period, activity was negatively related to growth. Accordingly, M- fish should have grown less than M+ fish, which was not observed (only a tendency). However, growth rate also depends on starting weight and feeding, which both may have enhanced growth rates in M- fish as they were slightly lighter and eat a bit more blood worms (both having a positive effect on growth rate, Geffroy and Bardonnnet, 2012). Despite the fact that these were only tendencies, they were probably sufficient to mask a difference in growing pattern between M+ and M- due to activity level.

During the second period, growing rate might have been enhanced for M- that ate a third more than M+ fish. At that time, growth rate of highly active fish was similar no matter their food intake. Conversely, growth rate increased with food intake for fish that were quiet. Thus, the benefits of eating blood worm might have been higher for quiet fish (higher proportion of M+ fish) than for active fish (higher proportion of M- fish). In addition, M- fish were lighter (347 ± 85) than M+ fish (389 ± 119) at T₃, and for this growing period, starting weight was positively related to growth. Therefore, the lower weight at M₃, as well as the lower benefits of food intake for most M- fish might have counter-balanced the positive effects of feeding a lot.

Conclusion

Despite the overall difference in mean activity between M+ and M- fish, the initial migratory strategy of each fish did not appear to account much in the sharply distinct pattern of locomotor activity detected later (10 individuals very active against 50 quieter fish). The nyctemeral activity pattern reported for highly active fish appeared to be relatively stable over time (Fig. 35).

Huertas and Cerda, (2006) noted that fish that were kept at low density were less active than those reared at high density. Present results suggest that activity level might not be directly related to the density of fish, but would rather be an intrinsic characteristic of each individual. However, it remains possible that an entailment effect occurred resulting in a global increase in the proportion of active fish (Schjolden *et al.* 2006).

Edeline *et al.* (2009) also dissociated two distinct contingents of glass eels after entering the estuary; one contingent with high locomotor activity and the other with low locomotor activity. These authors suggested that these tactics were controlled by genetic and endocrinal characteristics of each fish. Present results are in agreement with this theory, since this behavior was consistent at the circadian scale, but also seems consistent over a long period. In the experiment of Edeline *et al.* (2009), high level of activity was related to the selection of habitat with low salinity, while the converse also holds true (low level of activity linked to preference for saltwater habitats). These authors proposed that the settling of fish in the different part of the watershed (upstream or downstream) could differentially impact the growth rate of these fish and then play a crucial role in sex differentiation. Indeed, consequences of differential growth rate between elvers might directly influence sex determination in this species (reviewed in Davey and Jellyman, 2005).

Chapitre 3

Synthèse Article 3: Normes de réaction comportementale et syndrome comportemental chez l'anguille : quand la stabilité de l'activité se heurte à la variabilité de l'agressivité

Questions: Les niveaux d'agressivité, de grégarité et d'activité diffèrent-ils entre individus ? Dans quelle mesure ces comportements sont stables et/ou cohérents dans le temps ? Existe-t-il un syndrome comportemental chez les civelles/anguillettes ?

Résultats: Le comportement des individus arrivés à l'automne a été suivi pendant 7 mois au cours de 4 différents trials à 1, 2, 3 et 6 mois. Des différences inter-individuelles dans les niveaux d'agression, de grégarité et d'activité ont été détectées à partir de comparaisons de modèles linéaires généralisés avec effets mixtes (aquarium + individus). Aucune cohérence dans le comportement grégaire n'a été détectée, car l'ordre des individus n'est pas conservé dans le temps. De la même manière, l'intensité des agressions varie dans le temps de façon différente en fonction des individus. En revanche, bien que l'activité de nage diminue au cours du temps, ce changement concerne tous les poissons de façon identique. Ceci met en avant le fait que les individus présentent la même norme de réaction pour ce trait de personnalité. De façon remarquable, les individus les plus actifs sont généralement aussi les plus agressifs (rho de Spearman = 0,2 ; 0,72 ; 0,41 ; et 0,79 pour les Trial 1 ; 2 ; 3 et 4 respectivement), ce qui souligne l'existence d'un syndrome comportemental chez les civelles. Bien que les individus ajustent leurs comportements d'agressions en fonction de l'environnement de sorte que l'ordonnancement soit perturbé, le groupe d'individus parmi les plus agressifs au temps t contient les mêmes individus au temps t+1.

Conclusion: Il semble donc que les individus les plus actifs soient aussi les plus agressifs et ce, dès les plus jeunes stades. Cela peut avoir des conséquences en termes de dominance et potentiellement de différenciation sexuelle. Par exemple, chez le cichlidé Midas (*Cichlasoma citrinellum*), le sexe est déterminé en fonction de l'environnement social et de la taille des poissons. Les plus gros individus deviennent mâles et empêchent les petits individus de croître normalement ; ces derniers deviennent alors femelles (Francis et Barlow 1993).

Behavioural reaction norms and Behavioural Syndrome in eels:
When consistency in activity meets inconsistency in aggressiveness

(En preparation)

Benjamin Geffroy^{1,2}, Noëlle Bru³, Simplicie Dossou-Gbété³ and Agnès Bardonnnet^{1,2,*}

¹INRA, UMR 1224 Ecobiop, Pôle d'Hydrobiologie, Quartier Ibarron, 64310 Saint Pée sur Nivelles, France

²UPPA, UMR 1224 Ecobiop, UFR des Sciences de la Côte Basque, allée du parc Montaury, 64600 Anglet, France

³UNIV PAU & PAYS ADOUR, Laboratoire de Mathématiques et de leurs Applications de Pau, UMR CNRS 5142, FED 4155 MIRA, avenue de l'université, 64000 Pau, France

Abstract

Consistency in a given behaviour is the main prerequisite for the inference of it as a personality trait. In adult eels, dominance is often linked to body size, but it is not known whether aggressiveness could differ between juveniles' individuals (glass eels) of the same size range. Activity and gregariousness might also change during the course of ontogeny. In the present study we investigated whether activity, gregariousness and aggressiveness were consistent over time and whether these behavioural traits were correlated to each other. Overall fish become more gregarious and less active in the course of the 7 months of monitoring.

While activity level appeared to be consistent over time, aggressiveness was not consistent. Accordingly, locomotor activity could be an intrinsic characteristic, whilst individuals may adjust their level of aggressiveness to cope with the social environment. Nevertheless both behaviours were correlated to each other in the course of the experiment, underlining a behavioural syndrome. Present results also provide evidence that when roughly separated into two levels of aggressiveness, individuals remained in the same group over time. Therefore, two distinct behavioural groups can be identified in juveniles' eels: aggressive and active individuals *versus* their counterpart.

Introduction

Observations of inappropriate behaviour (*e.g.* being bold in the presence of predators) exhibited by some individuals in a given situation, has led behavioural ecologists to propose that behavioural traits were not as plastic as previously thought (see Sih *et al.* 2004). The notion of behavioural syndrome and personality emerged from these considerations. Personality is defined as consistent individual differences in behaviour across time and context (Bergmüller and Taborsky, 2010), whereas behavioural syndrome refers to as a suite of correlated behaviour across situations (either context or time) (Sih *et al.* 2004). While first identified in monkeys (*e.g.* Chamove *et al.* 1972), inter-individual differences in behaviour were then detected in a range of species, including fish. Indeed, first evidence of a behavioural syndrome in the three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*, was reported by Huntingford (1976 a,b). Despite the fact that this specific term was not used four decades ago, the author already suggested that both boldness and aggressiveness might have been somehow linked, conducting individuals to express various levels of fearfulness (Huntingford n°2, 1976a). This study provided compelling evidence that individuals differed in a number of behavioural patterns and that these differences remained consistent over several time-scales. From an adaptive point of view, the conservation of some different personality traits (PTs) throughout evolutionary times (Gosling and John, 1999) implies that these PTs conferred various advantages at the population level according to the environment. For instance, asocial individuals have a better fitness when density is low while the converse applies when density is high (Cote *et al.* 2008). Gregarious behaviour could have direct consequences on growth rate (Geffroy and Bardonnnet, 2012) and avoidance of predators (reviewed in Krause and Ruxton 2002). Nevertheless, this behaviour may also induce short-term cost, such as increase in disease spread (Watts and Strogatz, 1998) and increase in parasite transmission (Otterstatter and Thomson, 2007). Accordingly, different life history trade-offs (*e.g.* growth, fecundity) were likely to generate personality (Biro and Stamps, 2008). Currently, most studies on the subject have focused on the bold/shy continuum (Ward *et al.* 2004, Brown *et al.* 2007). However, in forming group of juveniles, others PT such as aggressiveness, might have been more important for the establishment of a hierarchy that will further determinate access to mates, shelter or food. Direct (contacts) or indirect (visual) information about a potential opponent could also participate to the gradual development of a PT, by allowing to avoid or to provoke social conflicts (Magnhagen, 2006, Bergmüller and Taborsky, 2010). Thus studying

PT at the juvenile stage and during the formation of a social group is relevant to further understand behavioural processes that accompany animal ontogeny.

Adaptation to a novel environment or situation (behavioural plasticity) that is linked to the life history of each species could also not be ignored when investigating animal behaviour. At the population level, it has been shown that non-plastic aggressive animals do better in stable environments, while plastic non-aggressive animals do better in fluctuating environments (Koolhaas et al 1999). Because both individual stability and individual plasticity in behaviour across situations (time or context) are closely linked, empirical studies of personality introduced the notion of behavioural reaction norms (BRNs). These BRNs refer to the concept of reaction norm (Weiss, 1999) and correspond to the set of behavioural phenotypes that a single individual produces in a given set of environment (Dingemanse *et al.* 2009).

The eel, which is characterized by a remarkably complex life history, provides an interesting model to explore BRNs during the ontogeny process. Indeed, as soon as the glass eel stages (55 to 80 mm) differences in activity pattern were detected, with some individuals exhibiting a negative rheotaxis (Wippelhauser and McCleave, 1987) and other displaying a positive rheotaxis when entering the estuary (Creutzberg, 1961). Later, activity, gregariousness and aggressiveness might also be greatly influenced by the environment (biotic and abiotic). Indeed, temperature, which is recognized to influence activity and aggressiveness in most fish species, is also the major factor triggering upstream dispersal in elvers (young eels > 80 mm) (White and Knights, 1997). In addition, density-dependant factors were also shown to influence the migration pattern of fish (Lobon-Cervia, 1995; Briand *et al.* 2005b; Ibbotson *et al.* 2002). Thus, it is thinkable that different level of aggressiveness should contribute to the different use of the watershed.

In the present study we investigated, within the BRNs framework, whether 3 distinct PTs, namely aggressiveness, gregariousness and activity, were consistent or not over time in developing eels (from the glass eels stage to the elver stage) and how this related to the ecology of this species. A few studies investigated how correlations among different PTs changed across ontogeny (*e.g.* Carere *et al.* 2005, Johnson & Sih, 2007). In the present experiment we aimed to find a behavioural syndrome in juvenile eels by monitoring behaviour of each fish and testing correlations among different PTs over 7 months.

Material and Methods

This experiment was designed to assess behavioural consistency of eels over time. To do so, 1300 glass eels were collected on November 18th 2009 at the entrance of the courant d'Huchet estuary (Molliet, South-Western France, 43°51' N, 1°23' W) at the beginning of a nocturnal flood. On the morning following their capture, they were placed in an experimental flume to be sorted according to their propensity to migrate with the flow or to remain sedentary (Geffroy and Bardonnnet 2012). Then, 64 randomly chosen individuals (32 that were sedentary and 32 that migrated with the flow) were measured (± 0.5 cm) and weighed after blotting (Sartorius CP 153 balance, ± 1 mg). Four aquaria (50 cm long, 25 cm large and 25 cm high) per migratory group were filled up to 15 cm high using river Nivelle water. Water was re-circulated through filter and UV light. In each tank, eight pieces of artificial vegetation mimicking *Elodae* shelters (10 cm high) were placed on the aquarium floor, regularly spaced along a line at 5 cm from the front glass of the aquarium. Eight individuals were marked using 4 Visible Implant Elastomer (VIE tag) of different colour (red, yellow, blue and orange) implanted subcutaneously on either the belly or the back of each glass eel. These tags were chosen because they were previously shown not to impact either survival or behaviour (Imbert *et al.* 2007). Each group was composed of eight marked individuals that were placed in 8 aquaria. Glass eels were acclimatized for one week before first behavioural observation. They were fed with live bloodworms (BW) *Chironomus plumosus*. The amount of delivered and consumed BW per aquarium and per day was noted. Temperature was recorded using VEMCO thermometers (1 measure per hour) throughout the experiment and mean temperature was 11.7 ± 0.7 .

Behavioural observation

We observed fish over four distinct trials (trial1, trial2, trial3 and trial 4 respectively in December 2009, January, February and June 2010). During the 3 first trials, fish were observed over 9 days divided in two periods of 5 and 4 consecutive days. For the trial 4, fish were observed over 6 days. Direct behavioural observation took place while seated motionless at 70 cm away from the front of each aquarium, avoiding any visual disturbance. Personality Traits were quantified twice each day, once in the morning (11.0–11.50) and once in the afternoon (13.00–16.30). During the morning sampling, each aquarium was observed 5 minutes and the activity (swim or rest) of each glass eel was noted (1 or 0; they rarely

exhibited a mixed activity. In that case, the majority behaviour was chosen). For those fish that were resting, the number of contacts that occurred between fish (gregariousness) in either shelter or floor was recorded. In agreement with a previous study (Bardonnet *et al.* 2009), aggressive behaviour was extremely scarce outside the feeding period. To enhance the probability of observing these events, food items (live bloodworm) were delivered one by one during the 20 minutes of the afternoon monitoring. Each time that a bloodworm (BW) was consumed, another one was added into the aquaria. Three specific aggressive interactions were identified in keeping with a previous study (Bardonnet *et al.* 2009):

- A nose push, where the focal fish push the eating individual
- A stole, where the focal individual grabs or tries to grab the BW from the mouth of another individual
- A bite delivered toward the eating individual

All these aggressive acts, delivered or received were recorded using a vocal recorder and done by the same observer (BG). The number of BW eaten by each individual was also noted. During the period of observation, fish were fed at half their normal appetite to be sure that feeding occurred during daylight observation (rations were completed after the afternoon monitoring) Glass eels were weighed and measured after 3 months (just after behavioural observation of trial 3) and at the end of the experiment Throughout the 7 months, 4 of the 64 glass eels died in different aquaria. This was presumably due to illness or starvation rather than consequences of aggressive acts, since no bite traces were detected. These individuals were not taken into account for data analyses.

Data analysis

Activity was the sum of swimming counts during each trial (with a maximum of 9 counts per trial). The number of aggressive acts delivered (aggressiveness) by each individual was summed during each trial as well as the number of contact for a focal fish (gregariousness) with other fish(es). In order to test for a potential difference in behaviour between individuals over time we used a generalized linear model with mixed effects (fixed and random, lme4) with an offset to take into account the duration of each trial (which differed). Each trial was used as a factor and was considered as a time unit. According to the peculiarity of the studied variables that were counts, the distribution used in mixed GLM was either Poisson or

Models	Df	AIC	logLik	Chisq	Df	p-value
(1) Activity~trial + (1 Group)	5	107.97	-48.986			
(2) Activity~trial + (1 Group/ind)	6	104.15	-46.075	5.82	1	0.016*
(3) Activity~trial + (trial Group/ind)	24	137.84	-44.921	2.31	18	1
(4) Aggressions~trial + (1 Group)	5	2319.79	-1154.89			
(5) Aggressions~ trial + (1 Group/ind)	6	1693.00	-840.50	628.79	1	<0.001***
(6) Aggressions~ trial + (trial Group/ind)	24	746.46	-349.23	982.54	18	<0.001***
(7) Contacts~ trial + (1 Group)	5	868.63	-429.31			
(8) Contacts~ trial + (1 Group/ind)	6	796.05	-392.03	74.57	1	<0.001***
(9) Contacts~ trial + (trial Group/ind)	24	572.26	-262.13	259.79	18	<0.001***

Table 6: Models estimating activity, aggressions and gregariousness over trials: models 1, 4 and 7 with a random intercept for the group (aquarium); models 2,5 and 8 with a random intercept for individuals within groups added to model 1,4 and 7; models 3,6 and 9 with a random slope between trial added to model 2. Comparison between models was done using LRT.

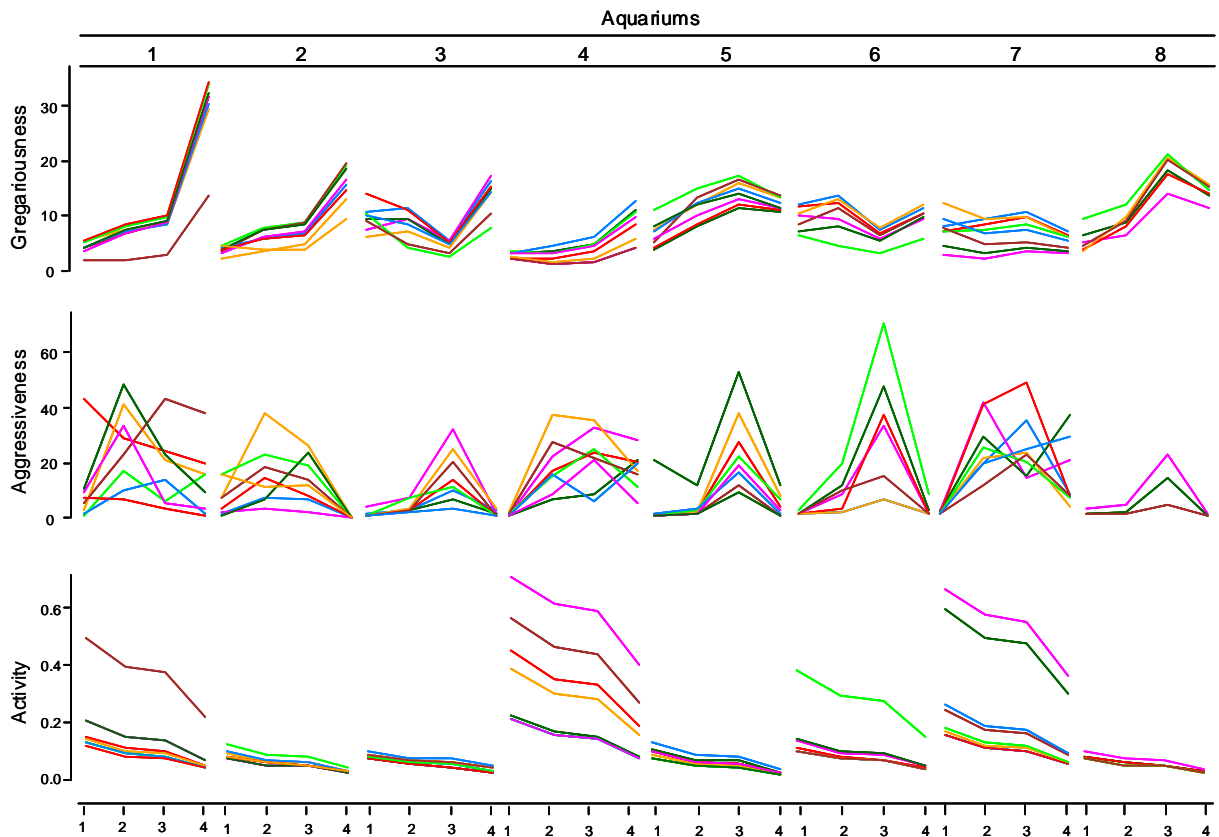


Fig. 36. Predicted values of the best models (2, 6 and 9) for gregariousness, aggressiveness and activity over time (trial 1, 2, 3 and 4) for each aquaria.

binomial with the corresponding natural link. When the group (aquaria) was added as a fixed effect, we detected differences in mean value of behaviour between groups. Thus, a random intercept was created for the group variable in the first model (the null model). Three models were tested to explain behaviour (Aggressiveness, Gregariousness and Activity):

- Mod1 (called the null model): random intercept for the group variable and trials as fixed effect
- Mod2: To test inter individual differences in behavioural score, we added to Mod1 a random intercept for individuals within groups.
- Mod3: we added to Mod2 a random slope by trials to test for behavioural consistency.

The goodness of fit was analyzed using associated residuals with specific tools for non-Gaussian distribution called half-normal plot, based on a re-sampling method to calculate theoretical quantiles (Hinde and Demétrio 1998). Since these models are nested, we used a likelihood ratio test (LRT) to test for the effect of each term (West *et al.* 2011).

In order to test for correlation between activity and aggressiveness, we first calculated predicted values of our best models. Then, we compared predicted values for aggressiveness and activity at each time (trial 1, 2, 3 and 4) using Spearman correlation test similarly to what was done in Biro *et al.* (2010). Body size (weight or length) at the start (before trial 1), the middle (after trial 3) and the end (after trial 4) of the experiment, was also correlated to predicted values of aggressiveness, activity and gregariousness using a Spearman test.

Results

The activity score differed significantly between individuals within groups, since adding a random intercept for individuals significantly improved the null model (model 2 better than model 1, Table 6). However, adding a random slope did not improve significantly the model (model 2 better than model 3, Table6). Thus, the slope between trials was considered to be the same for all individuals and rank order was conserved over time (Fig. 36). Aggressiveness differed between individuals within groups (model 5 better than model 4). In addition the slope differed between trials in the best model (model 6 better than model 5, Fig. 36), which implies that rank order was not conserved over time (within individual differences). Gregariousness differed between individuals within groups (model 8 better than model 7, Table 6), but also within individuals (model 9 better than model 8, Table 6, Fig. 36).

Models	Fixed effect	Estimate	SE	z-value	p-value
(2) Activity~Trial + (1 Group/ind)	Intercept	-2.07	0.49	-4.2	< 0.001
	trial2	-0.41	0.56	-0.7	0.46
	trial3	-0.51	0.57	-0.9	0.37
	trial4	-1.27	0.67	-1.9	0.05*
(6) Aggressions~trial + (trial Group/ind)	Intercept	-2.84	0.48	-5.9	< 0.001***
	trial2	2.33	0.49	4.7	< 0.001***
	trial3	3.24	0.55	5.9	< 0.001***
	trial4	0.81	1.08	0.8	0.45
(9) Contacts~trial + (trial Group/ind)	Intercept	-0.57	0.18	-3.1	< 0.01**
	trial2	0.16	0.16	1	0.31
	trial3	0.27	0.25	1.1	0.29
	trial4	1.19	0.28	4	< 0.001***

Table 7: Estimates of the fixed effects (trials) for best models 2, 6 and 9.

In the best models (model 2), overall activity did not significantly decrease between trial 1 and trials 2 and between trial 1 and trial 3. However, mean activity was significantly lower in trial 4 when compared to the initial activity (Table 7). In the best model (model 6), aggressiveness significantly increased in trial 2 and 3 when compared to trial 1. Then, aggressiveness decreased in trial 4 to reach the level similar to that observed in trial 1 (Table 7). In the best model (model 9), gregariousness significantly increased only in trial 4, when compared to trial 1 (Table 7).

Estimated values of activity and aggressiveness from each best model (model 2 and model 6) were positively correlated between each other in the trial 2 ($\rho = 0.72$, p -value < 0.001), trial 3 ($\rho = 0.41$, p -value < 0.002) and trial 4 ($\rho = 0.79$, p -value < 0.001) but not in trial 1 ($\rho = 0.2$, p -value $=0.12$). We did not detect any significant relationship between size and aggression level over the experiment, despite a tendency of small/lighter fish to be more aggressive during trial 1 (length, $\rho = -0.24$, p -value $=0.06$; weight, $\rho = -0.21$, p -value $=0.11$). Predicted values of gregariousness were positively correlated to initial size in trial 1 (length, $\rho = 0.27$, p -value $=0.04$; weight, $\rho = 0.12$, p -value $=0.35$), but not in other trials. No correlations between size and activity were found.

Discussion

Activity, aggressiveness and gregariousness differed between individuals within aquaria (different intercepts). Rank order consistency over time was observed for activity, indicating that all individuals displayed the same BRN. Conversely, specific behavioural responses were observed for some individuals while others exhibited sharply different responses in both aggressiveness and gregariousness, highlighting a great behavioural plasticity over time. Nevertheless, at each trial (excepting trial 1, where aggressiveness was probably to low), aggressiveness was positively correlated to activity, pointing out the existence of a behavioural syndrome in juvenile eels.

While context was considered as equivalent (*i.e.* same number of individuals, experimental feature, temperature), the mean score of the 3 investigated behaviours differed between aquaria. This finding underlined that conspecifics might also have been considered as “context”, as proposed by Magnhagen (2007), so far as social stimuli might have changed from an aquarium to another. Thus, differences between aquaria in rank order consistency in both gregariousness and aggressiveness could have arisen from different “personalities” or

“delivered stimuli” within the randomly formed group. Conversely, activity might have been less under conspecifics’ influence in this species.

Studying the gradual establishment of PTs without taking the social environment into account might produce sharply different results. For instance, in two strains of rainbow trout artificially selected for their physiological and behavioural responses to stress (high HR and low, LR, cortisol response, Pottinger and Carrick 1999), isolated fish from one strain exhibited the same locomotor activity than those from the other strain (Overli *et al.* 2002). However, when kept in group (n=30) LR fish exhibited higher level of activity than HR fish (Schjolden *et al.* 2006). Thus, social interactions might have accounted for differences in locomotor activity between both groups. Interestingly, in another experiment involving both selected lines, LR fish were shown to be more aggressive than HR fish (Pottinger and Carrick, 2001). Aggressiveness and activity are often related to each other, likely through physiological factors. In the present experiment, a positive correlation was found between activity and aggressiveness, but no links were found between these PTs and the biometric characteristics of individuals. Nevertheless, we cannot rule out that other physiological factors were associated with these behavioural patterns. For instance, thyroid hormone level was shown to be positively correlated to climbing behaviour in glass eel (Edeline *et al.* 2004, 2005, 2006) and elvers (Imbert *et al.* 2008).

The correlation strength between aggressiveness and activity varied throughout eel ontogeny, obviously in relation to individual inconsistency in aggressive behaviour over time. In stickleback, Bell and Stamps (2004) showed that boldness was correlated to aggressiveness, but individuals that were highly aggressive and bold as juveniles were not necessarily those that were highly bold and aggressive as adults. The existence of a positive relationship between a consistent behaviour (activity) and an inconsistent one (aggressiveness) in the present study underlined the importance of being plastic to cope with the environment. Indeed, while one behavioural trait might confer advantage in a given situation, it can be deleterious in another situation. Activity level appears to be independent of the other individuals, while aggressiveness toward conspecific might have changed according to the potential opponent and/or to the motivation of each challenger to gain food. Indeed, plasticity in aggressiveness may have first arisen due to the necessity to obtain food, since aggressive acts were mostly observed when food was delivered in developing glass eels (Bardonnnet *et al.* 2005c, 2009). In an experiment where yellow damselfish were raised alone, aggressiveness was consistent in different contexts (temperature) while the level of activity of each individual varied but both were positively correlated (Biro *et al.* 2010). Extending the reasoning of

authors, it can be suggested that contextual plasticity in activity pattern was the consequence of different BRNs linked to their different sensitivity threshold for temperature. Conversely, the same BRN regulated aggressiveness, possibly because their temperature sensitivity threshold for aggressiveness was the same. In sum, this indicated that fish may have adjusted differentially their behaviour to cope with the environment (biotic/abiotic), but a behavioural syndrome still persisted. Similarly to the environment, ontogenesis can also influence behaviour, since the overall activity decreased in the same time than gregariousness increased. In all cases, individual stability (slope = 0) was not detected in any of the PTs investigated, indicating that in eel, behaviour was invariably linked to ontogeny and social environment.

Whatever the aquaria, 13 % of the individuals (8/60) displayed very high level of activity over time and were also highly aggressive compared to the other. The consistency in activity over time meant that this behaviour can easily be predicted. This is of particular interest for the ecology of this species. Once the tidal limit crossed by glass eels, the watershed colonization processes would be characterized by two distinct phases (Ibbotson *et al.* 2002). Firstly, elvers would disperse upstream according to a density dependent process. Secondly, yellow eel randomly diffuse in the watershed, either downstream or upstream. Feunteun *et al.* (2003) proposed to distinguish two sub-groups, the “pioneers” that migrate upstream of the watershed whatever the density and the environmental conditions and the “founders” that migrate inshore until they find a suitable and free habitat. So, in the wild some individuals displayed a high level of activity apparently not linked to environmental condition. The difference in activity pattern between the two groups detected in the present experiment and the persistence of this behaviour over 7 months supported Feunteun *et al.*'s hypothesis (up cited). The density dependent hypothesis is often invoked to explain dispersal (Lobon-Cervia, 1995; Briand *et al.* 2005b, Ibbotson *et al.* 2002). However, it was recently shown that density (either 50 or 12 ind.m⁻²) did not impact the percentage of elvers that were migrating upstream (climbing behaviour, Imbert *et al.* 2008). Present results are in agreement with this observation. Indeed, the number of active fish differed according to aquaria whilst densities were similar (64 ind.m⁻²). Interestingly, Imbert *et al.* (2008) also pointed out a very high consistency in behaviour over 6 days (almost 60 % of fish displayed consistent climbing behaviour). The consistency in activity over a long time period (7 months) and a short time period (nycthemeral scale, Geffroy *et al.*, unpublished data.) is of interest to predict colonization and settlement into the watershed. Overall this suggests that the intrinsic characteristics (*i.e.* physiological and/or behavioural) of individuals, rather than the density of individuals, can explain why some elvers migrate upstream.

Conclusion

The existence of a behavioural syndrome in juvenile eels is of importance in this species characterized by environmental sex determination. The sex determination appeared to be linked to the density of individuals and likely occurred during the first months of freshwater life (Huertas and Cerda, 2006). If we consider individuals in the present experiment as two groups, active/aggressive and their opposites, it is possible that those fish that were highly active under our experimental conditions would be those that in the wild will colonize the upstream part of the watershed, where most females develop (reviewed in Davey and Jellyman, 2005). For instance, Legault (1996) detected some elvers (6% of the recruits) 250 km upstream the estuary, highlighting the capacity of some eels to invade the system within their first months of freshwater life. We currently keep these eels in order to know whether these different behavioural traits will allow discriminating males from females.

Chapitre 4

Synthèse Article 4 : Influence de la densité du réseau social sur le niveau relatif d'agressivité chez le juvénile d'anguille

Questions: Dans quelle mesure la cohésion du groupe (familiarité ou densité du réseau social) influence le degré d'agressivité des individus ? Est-ce-que le degré de cohésion du groupe influence la cohérence inter-individuelle des comportements agressifs ?

Résultats: A partir des modèles mis en place dans le chapitre précédent, les rangs des individus en fonction de leur agressivité dans le temps ont été déterminés. De plus la cohésion du groupe a été estimée avec un indice de densité. Les groupes (aquariums) composés du même nombre d'individus ont montré des différences de grégarité et d'agressivité. Les groupes pour lesquels la densité du réseau était la plus élevée étaient les moins agressifs. De plus, les groupes formés d'individus très grégaires étaient ceux pour lesquels les comportements agressifs étaient les plus cohérents dans le temps (c'est-à-dire les groupes où l'ordre des rangs occupés par les individus était globalement conservé).

Conclusion: Il est possible que l'information sur les tendances agressives de certains individus circule vite au sein des groupes très cohésifs. Cette information est ensuite utilisée pour ne pas être "sur-agressif" envers des individus connus pour être plus forts (ou plus agressifs), un principe connu sous le nom de "dear enemy phenomenon". Ces résultats permettent de proposer un mécanisme qui entraînerait la stabilité de certains comportements *via* l'apprentissage et qui serait dépendant de l'environnement social. Ce dernier ne doit donc pas être sous-estimé lors d'études sur la personnalité animale.

Social network density influences rank-order consistency in aggressiveness

(Soumis Proceedings of the Royal Society B)

Benjamin Geffroy^{1,2}, Noëlle Bru³, Simplicie Dossou-Gbété³ and Agnès Bardonnnet^{1,2,*}

¹INRA, UMR 1224 Ecobiop, Pôle d'Hydrobiologie, Quartier Ibaron, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France

²UPPA, UMR 1224 Ecobiop, UFR des Sciences de la Côte Basque, allée du parc Montaury, 64600 Anglet, France

³UNIV PAU & PAYS ADOUR, Laboratoire de Mathématiques et de leurs Applications de Pau, UMR CNRS 5142, FED 4155 MIRA, avenue de l'université, 64000 Pau, France

Abstract

The emergence of an animal's personality may be the result of a trade-off between genetics and experience. Nevertheless, personality traits have long been determined while ignoring the social context, which could reasonably well, contributes to the experience of an animal. It is well known that individuals are able to modulate their behaviour according to the context or the social environment. For instance, many studies show that familiarity diminishes aggressiveness, although little is known about the actual underlying processes. In the present experiment we hypothesize that familiarity may positively influence consistency in aggressiveness by avoiding over-aggressive acts in further encounters. To test this hypothesis, we undertook a longitudinal study on individually marked juvenile eels (glass eels) and monitored both aggressiveness and gregariousness over 7 months. As expected, groups of fish well-connected to each other displayed an overall lower level of aggressiveness compared to groups of fish that were less connected. In addition, rank order consistency in aggressiveness was higher in groups of fish that were highly-connected, compared to group of less-connected fish. We propose that consistency in aggressiveness, a prerequisite for the inference of it as a personality trait, may be highly influenced by the initial social context.

Introduction

Differences in behaviour between individuals throughout time and/or contexts, termed personality or behavioural syndrome, was detected in a range of species (Gosling and John 1999). Nevertheless, it remains difficult to disentangle the “genetic” personality from the one arising from experience. Heritability of some personality traits (PTs) has been found in several species (Overli *et al.* 2002, Drent *et al.* 2003, Brown *et al.* 2007) and is likely to be around 0.4 (van Oers *et al.* 2005). Accordingly, the genetic pool of an individual cannot alone explain the origin of personality and a non-negligible part results from previous experience and/or environment (reviewed in Stamps and Groothuis 2010) For instance, small changes in temperature were shown to modify reef fish aggressiveness and boldness, but rank order was conserved at any temperature (Biro *et al.* 2010). Animal personality has long been determined in apparatus where individuals were kept alone or in a dyadic context (Johnsson 1997, Bell and Stamps 2004), without taking the social environment into account (Wilson and Godin 2009). While all these studies have provided considerable advances on factors allowing the emergence of PTs, they constitute only a “snapshot of a more complex social fabric” (Krause *et al.* 2010). The social environment, i.e. interspecific or conspecific interactions, should not be underestimated when assessing behavioural differences between individuals (Bergmuller and Taborsky 2010). Indeed, there is strong evidence that individuals are able to modulate their behaviour toward conspecifics and that such behavioural changes are influenced by relations individuals previously had (Dugatkin 1997).

Numerous studies have shown that long term relationships between individuals were not random and that individuals preferentially assorted according to phenotypic characteristics (reviewed in Krause *et al.* 2000). However, independently of size, sex and colour, the choice of a partner might also result from previous information about this partner. Accordingly, cooperation and foraging success were shown to influence the assortative matching between individuals (Dugatkin and Alfieri 1991 a,b, Dugatkin and Wilson 1992, Swaney *et al.* 2001). These selective choices are at the basis of the concept of reciprocal altruism introduced by Trivers (1971). Regarding adaptive significance of specific associations, familiarity was shown to have direct fitness consequences by decreasing mortality risks (Milinski 1987) and increasing growth rate (Seppa *et al.* 2001).

There is currently very little information about the influence of the social network on behavioural consistency. Matessi *et al.* (2010) investigated in an artificial network (where fish were separated by glass) how aggressiveness of the Siamese fighting fish (*Betta*

splendens) was modified according to the phenotypic characteristics of the closest neighbour. These authors detected that fish displaying very high level of aggressiveness were consistent in this behaviour no matter which neighbours they had, while less aggressive fish modified their behaviour according to their neighbours. The converse (i.e. personality influencing the social network structure) was demonstrated in a study involving stickleback (Pike *et al.* 2008). Accordingly, the social network structure may account for differential experience between individuals and studying the dynamic of the establishment of the social network at the earliest stage (juvenile) might be of interest when studying PT (Stamps and Groothuis 2010, Krause *et al.* 2010, Oosten *et al.* 2010).

Eel is a good model to investigate social network structures, since (i) individuals are highly gregarious from the earliest stage (the glass eel stage ≈ 7 cm long) (Dou and Tsukamoto 2003, Bardonnnet *et al.* 2005c), (ii) contacts between individuals are easy to monitor given that glass eels are often entwined together in shelters and (iii) sex differentiation occurs beyond 20 cm in this species with environmental sex determination (Colombo and Grandi 1996, Melia *et al.* 2006); thus, preferential association should not be infer to the sex of a partner in young stages. The present study aims to examine the link between familiarity and consistency of aggressiveness over time in eels. First, we investigate if individuals that are well connected are generally less aggressive than those that have fewer interactions. Secondly, we test the hypothesis that familiarity can lead to behavioural consistency in a given PT, in the present case, aggressiveness. Glass eels were caught at the entrance of estuary and randomly placed in groups of eight individuals in similar aquaria. Visible implant elastomere tags allowed tracking glass eels individually over time and both social interactions and aggressiveness were monitored.

Material and Methods

(a) Experimental context

Glass eels (sample size, $n = 1300$) were captured in November 2009, at the beginning of a nocturnal flood at the mouth of courant d'Huchet estuary (Molliet, South-Western France, 43°51' N, 1°23' W). On the morning following their capture, they were placed in an experimental flume to be sorted according to their propensity to migrate with the flow or to remain sedentary, defining 2 migratory groups (Geffroy and Bardonnnet 2012). Then, 64 randomly chosen individuals (32 that were sedentary and 32 that migrated with the flow) were

measured (± 0.5 mm) and weighed after blotting (Sartorius CP 153 balance, ± 0.1 mg). Four aquaria (50 cm long, 25 cm large and 25 cm high) per migratory group were filled up to 15 cm high using river Nivelles freshwater. Water was re-circulated through filter and UV light. A grid was placed under each tank, dividing it in 32 squares of 6.5 cm^2 to allow precise fish location. In each tank, eight pieces of artificial vegetation mimicking *Elodea* shelters (10 cm high) were placed on the aquarium floor, regularly spaced along a line at 5 cm from the front glass of the aquarium. Eight individuals per aquaria were marked using 4 different colour (red, yellow, blue and orange) of Visible Implant Elastomer (VIE tag) implanted subcutaneously on either the ventral part or the dorsal part. These tags were chosen because they were previously shown not to impact either survival or behaviour of glass eels (Imbert *et al.* 2007). Each social group was composed of eight marked individuals that were placed in 8 aquaria. Glass eels were acclimatized for one week before first behavioural observation. Experiment lasted for 7 months and glass eels were fed with live bloodworms (BW) *Chironomus plumosus*. The amount of delivered and consumed BW per aquarium and per day was noted. Temperature was recorded using VEMCO thermometers (1 measure per hour) throughout the experiment and mean temperature was 11.7 ± 0.7 .

(b) Behavioural observations

(i) Main behavioural characteristics in a social environment

Direct behavioural observation took place at 70 cm away from the front of each aquarium avoiding any visual disturbance. Fish were observed twice a day, once in the morning (11.0–11.50) and once in the afternoon (13.00–16.30). Glass eels are usually very active during the night and in experimental condition, the end of the morning was identified as the period where eels are the quieter (Degani and Lee-Gallagher 1985, Degani *et al.* 1989). Thus observation of gregarious behaviour took place at that time (11.0–11.50), and each group (aquarium) was observed for 5 minutes to identify fish that were in contact with each other on the floor or in shelters. During the afternoon sampling, each group of fish was observed for 20 minutes to count aggressive acts between individuals during food distribution.

Food items (live bloodworm) were delivered one by one during the 20 minutes of monitoring. Each time a bloodworm (BW) was consumed, another one was added into the aquaria. Three specific aggressive interactions were identified in keeping with a previous study (Bardonnnet *et al.* 2009): a nose push, where the focal fish push the eating individual; a bite delivered by the focal fish toward the eating individual; a stole, where the focal individual grabs or tries to

grab the BW from the mouth of another individual. All these aggressive acts, delivered or received were recorded using a vocal recorder by the same observer (BG). The number of BW eaten by each individual was also noted. During the period of observation, fish were fed at half their normal appetite to be sure that feeding occurred during daylight observation. Four distinct measures were considered:

-Gregariousness = Total number of contacts for each fish with other(s) fish

-Aggressiveness = Total number of aggressive acts delivered by a fish towards other(s) fish

-Network density describes the extent to which individuals are inter-connected (cohesion of the group) and is measured as the sum of tie values divided by the number of possible ties in the network.

-Rank order consistency in aggressiveness describes the extent to which rank order in aggressiveness is kept constant over time. An index of stability is calculated as the mean variance in rank order per group over time; it takes into account the number of fish within group (indeed 3 fish died in 2 aquaria during the 7 months). As an illustration, in a group of 8 fish, given that one individual is ranked 1 over the 4 trials, and that another one is ranked 2, then 6, 4 and 3, the mean variance in rank order for this group is (variance (1,1,1,1) + variance (2,6,4,3) + ... up to the 8th fish)/8.

(ii) Temporal measurement design

We observed fish over four distinct trials (trial 1, trial 2, trial 3 and trial 4 respectively in December 2009, January, February and June 2010) covering a period of seven months. During all trials, aggressiveness and gregariousness were assessed for 9 days divided into two periods of 5 and 4 consecutive days, separated by 48H, except during the last trial where aggressiveness was assessed for 6 days only (due to flashing light during some afternoon observations).

(c) Data analysis

Initial weight and size were compared between groups (aquaria) using ANOVA. Differences in aggressiveness between groups of fish for each trial were assessed using the Kruskal-Wallis test.

In order to test for a difference in aggressiveness level between individuals over time, we used a generalized linear mixed model (GLMM) to calculate their behavioural reaction norm (Dingemanse *et al.* 2010). Trials were considered as an ordinal variable and were coded as a

time unit. According to the peculiarity of the studied variable that was number of aggressive acts, i.e. counts, the distribution used in GLMM was Poisson where the mean was proportional to the trial duration. Hence, when using the corresponding natural link function, trial duration appeared as an offset. Three models were carried out:

- Mod1 (called the null model): To test for differences between groups, we used random intercept for the group variable and trials as fixed effect.
- Mod2: To test inter-individual differences in behavioural score, we added to Mod1 a random intercept for individuals within groups.
- Mod3: To test for behavioural consistency, we added to Mod2 a random slope by trial.

The goodness of fit was analyzed using associated residuals with specific tools for non-Gaussian distribution called half-normal plot (see electronic supplementary material), based on a resampling method to calculate theoretical quantiles (Hinde and Demétrio 1998). Since these models are nested, we used a likelihood ratio test (LRT) to test for the effect of each term (West *et al.* 2011).

Rank order in aggressiveness for each aquarium was back-calculated using estimated values of model 3. The total number of aggressive acts per group was compared to rank order consistency in aggressiveness per group using a Spearman test. Differences in gregariousness between groups of fish and between trials were tested using Kruskal-Wallis test.

Spearman test was used to test for the correlation between rank order consistency in aggressiveness and mean network density. All statistical analyses were performed using R software (R Development Core Team 2009), in particular package sna for designing social networks and package lme4 for generalized linear model with mixed effects.

Results

(a) Groups characteristics

Initial weights and lengths per aquaria were similar (ANOVA, weight: $F_{7,56} = 0.40$, p-value = 0.89; length : $F_{7,56} = 0.86$, p-value = 0.54). In a previous experiment we had not detected significant differences in aggressiveness and gregariousness between migratory batches (Geffroy and Bardonnnet 2012) during the 3 first months. However, gregariousness significantly differed between groups of fish (aquaria) at all trials (Kruskall- Wallis test, p-values < 0.01). In addition, mean level of gregariousness was similar during the first 3 trials,

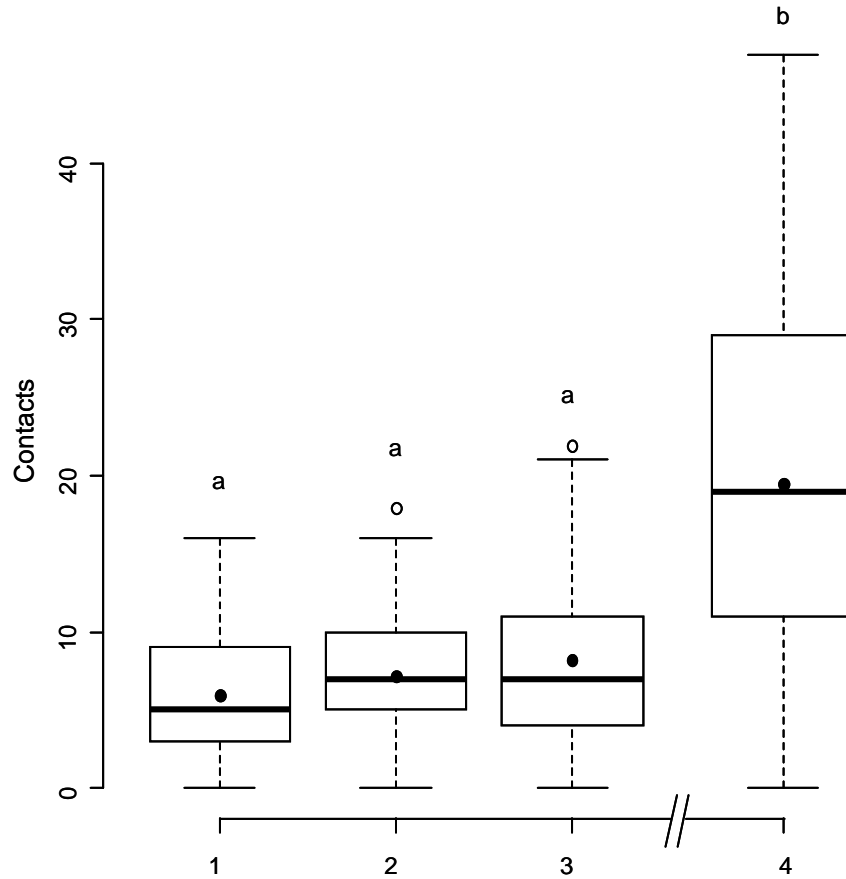


Fig 37. Total number of contacts that occurred during the 4 trials at 1, 2, 3 and 7 months, respectively. Statistical differences between trials are represented by small letters (Pairwise Wilcoxon Test p-value < 0.001). Results that did not differ significantly are represented by the same lower case. Box plots show the median represented by lines, first and third quartiles as well as extreme values and outliers represented by open circles outside the box. Mean values are represented by a full black circle.

Models	Df	AIC	logLik	Chisq	Df	p-value
1 Aggression~ trial + (1 Group)	5	2319.79	-1154.89			
2 Aggression~ trial + (1 Group/ind)	6	1693.00	-840.50	628.79	1	< 0.001***
3 Aggression~ trial + (trial Group/ind)	24	746.46	-349.23	982.54	18	< 0.001 ***

Table 8: Models estimating aggressions over trials: model 1, with a random intercept for the group (aquarium); model 2, with a random intercept for individuals within groups added to model 1 and model 3, with a random slope between trial added to model 2. Comparison between models was done using LRT.

while it significantly increased in trial 4 (Pairwise Wilcoxon test, Trial1-Trial4 p-value < 0.001, Trial2-Trial4 p-value < 0.001, Trial3-Trial4 p-value < 0.001, Fig. 37).

The level of aggressiveness also differed between groups in trials 1, 2 and 4 (Kruskal-Wallis test, p-values < 0.01) but not in trial 3 (Kruskal-Wallis test, p-values = 0.15). According to model 3, the level of aggressiveness was higher in both trial 2 and 3 when compared to trial 1 (p-value < 0.001), but no difference was detected between trial 1 and trial 4 (p-value = 0.45).

(b) Modelling the evolution of individual behaviour

Adding “individuals effect” as a random variable in model 2 improved significantly the model 1 (lower AIC in model 2), meaning that, within each aquaria, individuals differed in their level of aggressiveness (Table 8). The slope also differed between individuals and trials in the best model (model 3, lower AIC than model 2, Table 8), meaning that estimated rank order in aggressiveness was, on average, not consistent over time. Nevertheless, consistency differed quite a lot according to aquaria (see the 2 examples, Fig.38b).

Variance in rank order for aggressiveness over the 4 trials (which is a measure of consistency of this behaviour) was positively correlated to the mean number of aggressive acts per group during the whole experiment and almost reached significance (Spearman test rho= 0.71, p-value = 0.058).

(c) Interaction between individuals

In all trials, network density was negatively correlated to mean level of aggressiveness per group of fish, but except in trial 2, correlations were not significant (Spearman test Trial 1 rho = -0.34, Trial 2 rho = -0.74 p-value < 0.05, Trial 3 rho = -0.24, Trial 4 rho = -0.51).

A negative correlation (Spearman test rho= -0.57, p-value = 0.15) was detected when comparing the overall mean network density to aggressiveness consistency (i.e. mean variance in aggressiveness rank order over the 4 trials). Because gregariousness increased over time and significantly differed in trial 4 (after 7 months of growth) when compared to trials 1, 2 and 3, the mean network density for the first 3 trials (Trial 1,2,3) was first calculated and compared to mean variance in aggressiveness rank order of the first 3 trials (Fig. 39). Then, mean network density for 3 and 7 months (trial 3 and trial 4) was compared to mean variance in aggressiveness rank order between 3 and 7 months (trial 3 and trial 4, Fig. 39). During the first 3 months, a significant negative correlation between mean variance in

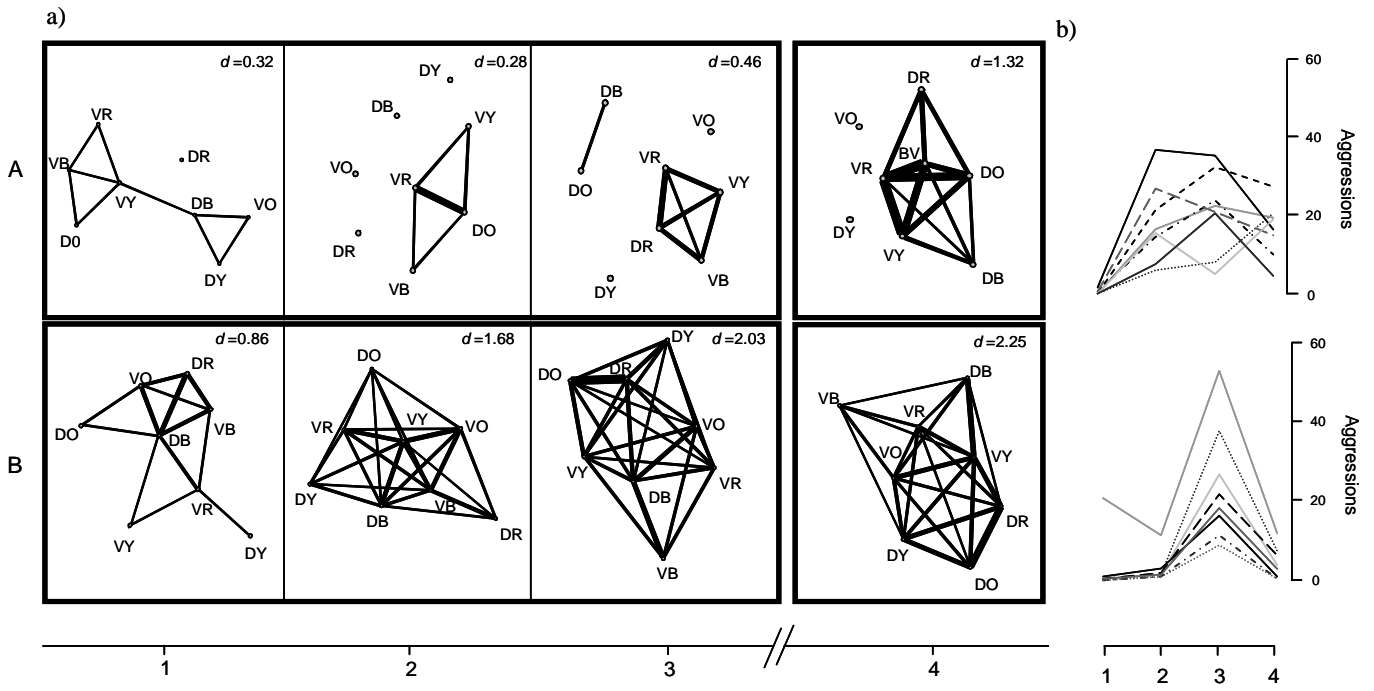


Fig. 38. a) Graph representing network density (d) of two aquaria (A and B) over time (Trial 1, 2, 3 and 4). Nodes noted : VR, VB,VO,VY,DR,DB,DO,DY represent individuals according to their VIE tag coding (location (Ventral or Dorsal) and colour (Red, Blue, Orange, Yellow)). b) Predicted values for aggressive acts over time according to model 3 for the two aquaria. Note that consistency in aggressiveness was more pronounced in aquarium B compared to aquarium A.

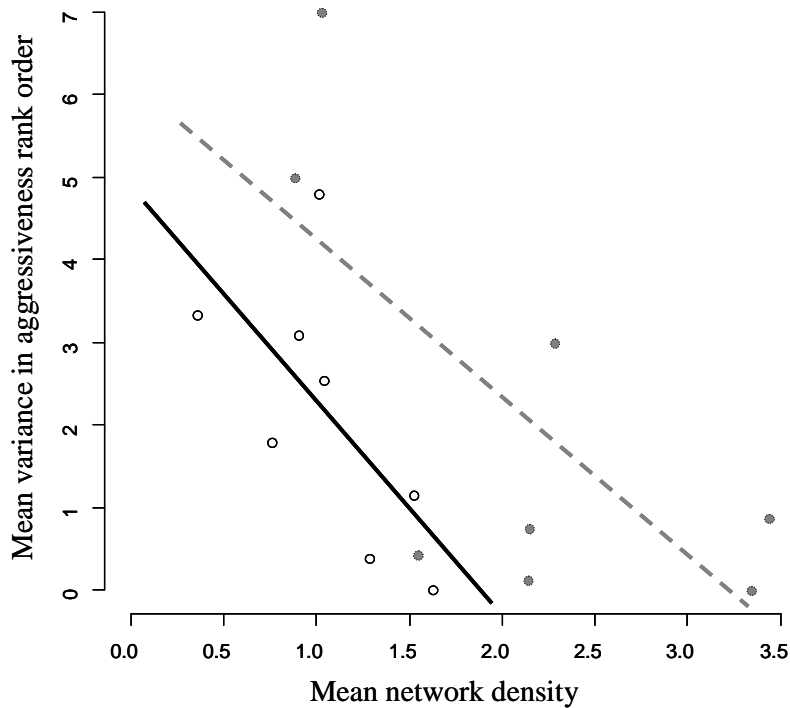


Fig. 39. Correlation between mean network density and mean variance in rank order for aggressiveness for the first 3 trials (empty circles, black line $R^2 = 0.43$) and for trial 3 and trial 4 (full circles, grey line $R^2 = 0.48$). See the result section for statistical analysis. Each circle represents a group of fish.

aggressiveness rank order and mean network density was detected (Spearman test, $\rho = -0.73$, $p\text{-value} < 0.05$). A negative correlation between these variables also emerged when trial 3 and 4 were considered, but it was not significant (Spearman test $\rho = -0.45$, $p\text{-value} = 0.27$).

Discussion

Our data support the initial proposal that familiarity diminishes aggressiveness in developing glass eels, since in all trials network density tended to be negatively correlated to aggressiveness. In addition, present results provide compelling evidence that over-aggressiveness observed between unfamiliar fish (low network density) might lead to rank order upheaval within groups.

Eels are known to be highly gregarious species (Medcof 1966, Dou and Tsukamoto 2003, Bardonnet *et al.* 2005c). In the present study, the number of contact per individual increased over time. Stability of associations may first result from the life history strategy of species. Thus, in schooling fish species, benefits of interacting with conspecific might be higher (i.e. avoidance of predators) than in aggressive and solitary fish (Ward and Hart 2003). At the intra-specific level, the advantage of being gregarious may depend on the environment (habitat, predator pressure, prey abundance and catchability) and on ontogenesis. In the present experiment, environment was kept constant, and the increase in gregariousness may have rather occurred in relation with ontogenesis. Gregariousness in eels has been observed at all stages, and even large eels have been observed lying together under both wild and experimental conditions (but see Tesh 2003).

The network density represented how groups of the same number of fish were organized and indicated that in some aquaria some individuals might have none or very few interactions out of feeding periods (Fig. 38a). During the feeding period, almost all individuals went into activity and aggressive acts were observed. However, a few did not interact, even at that time. It is difficult to assess whether these few fish spent most of their time in shelter to avoid aggressive acts or whether they did not detect food. Indeed, different level of aggressiveness may have also resulted from differential capacity in food detection (since aggressivity was only observed during food delivery). Nevertheless, this observed pattern (remaining inactive during food delivery) applied to only a few fish (only 2 fish for the whole period). The level of aggressiveness differed between groups of fish and was influenced by network density (familiarity). We found that the higher the network density the lower the aggressiveness, but this was significant only in trial 2. These results are consistent with similar studies on others

fish species, showing that familiarity is linked to a diminution in aggressive acts (Johnsson 1997, O'Connor *et al.* 2000). For instance, sticklebacks were more aggressive toward unfamiliar conspecifics than toward familiar individuals when sharing a food source (Utne-Palm and Hart 2000).

Cognitive capacities of fish have long been underestimated, but recent studies have provided compelling evidence that some teleost were able to memorize and recognize several partners (Griffiths and Magurran 1999, Croft *et al.* 2005). The two most important ways that fish have for detecting other fish are chemical and visual cues (Colgan 1983). In eel, the former might outclass the latter in eels (Huertas and Cerda 2006, Huertas *et al.* 2008). Kin recognition is often involved in preferential association (reviewed in Ward and Hart 2003). However, in eels, this event seems to be very unlikely because of the specific life cycle that characterizes this panmictic species, where individuals reproduce within a common spawning site (the Sargasso Sea) (Schmidt 1922) and larvae randomly disperse.

The best model representing aggressiveness throughout trials underlined differences between and within individuals (Mod3). This implies that rank order for aggressiveness was disrupted most of the time. However, it appeared that in some groups, the consistency of this behavioural trait was more pronounced than in other groups. Noteworthy, mean network density was positively correlated to consistency in rank order over the first 3 trials. The same tendency was found between trials 3 and 4 as well as for the whole period. Such result suggests that fish sparsely connected might have been over-aggressive toward other fish from the same group, possibly due to the fact that individuals did not recognize each other. This is consistent with previous results in sea trout (*Salmo trutta*), which showed that any initiator of conflicts has a greater chance to win against familiar individuals than against unfamiliar opponents (Höjesjö *et al.* 1998), likely because unfamiliar fish will be over-aggressive due to the lack of knowledge about the opponent's fighting ability. This process is also known as the "dear enemy phenomenon" (Fisher 1954), where aggression is greatest between competitors that hardly interact at all (Ward and Hart 2003). The fact that individuals rarely interact may have led to the higher overall aggressiveness observed in groups where rank order was disrupted very often. Conversely, fish that were often interacting with each other were less aggressive and rank order was more consistent between trials. Hence, familiarity could lead fish that recognize the rank of a partner to avoid aggressive acts in later encounter. Bergmüller and Taborsky (2010) suggested that emergence of personality traits may be linked to avoidance or provocation of social conflicts. These authors proposed that in a same environment or ecological niche, individuals first display the same behaviour, and this

probably maximises conflicts. Then, individuals will progressively develop specific behaviours by “character displacement” which could reduce competition and thus be more advantageous and stable (Bergmuller *et al.* 2010). Present results are in agreement with this hypothesis and also suggest that a PT, such as aggressiveness, may progressively develop depending on the encountering rate with others fish (i.e. group experience).

The present study sheds a new light on the link between familiarity and aggressiveness. While it is generally well admitted that familiarity decreases overall aggressiveness, the present results provide a possible mechanism to explain this pattern. By the concomitant use of social network and the monitoring of aggressive acts at the individual level, we have shown that aggressiveness did not decrease *per se* for familiar fish, but rather than aggressiveness increased in an “over-expressed” manner between individuals that did not know each other. In addition, present results highlight the importance of social environment in the settling of personality traits since gregariousness differed within groups but also, between groups. As mentioned by Krause *et al.* (2010), other empirical work are still needed to identify the link between rank in a social network and the gradual forming of personality in order to increase the realism of future models in this area of research.

Acknowledgements

Benjamin Geffroy PhD thesis was funded by Univ Pau & Pays Adour (ED 211). The project was supported by funding from the Office National de l’Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) and by the Interreg IV B Atlantic area transnational program (European Regional Development Fund), in the context of the Arc Atlantic Resource Conservation program (AARC). We wish to thank Emmanuel Huchet for setting up the aquarium. We also thank Martin Walton for English language corrections and improvement of the manuscript as well as Jacques Labonne, Cedric Tentelier and Bastien Sadoul for stimulating discussions. All works herein complies with current French national laws on the handling of animals.

Chapitre 5

Synthèse Chapitre 5 : Relation entre Métabolisme standard, croissance et comportements

Questions: Existe-t-il des différences de métabolisme entre civelles d'automne et civelles de printemps ? Dans quelle mesure le métabolisme standard influence-t-il la croissance des individus à 3 mois et à 7 mois ? Existe-t-il un lien entre le métabolisme standard et certaines variables comportementales ? Le métabolisme standard au stade civelle est-il corrélé au métabolisme standard des anguilles en début d'argenture ?

Résultats: Aucune différence de métabolisme standard relatif (rSMR) n'a pu être détectée entre civelles de printemps et civelles d'automne. La croissance à 3 mois n'est pas corrélée au rSMR initial des individus, alors qu'une relation positive entre ces variables est détectée (bien que non significative, $p = 0,08$) entre 3 et 7 mois. De plus rSMR tend à être positivement corrélé avec les variables comportementales qui ont un lien avec la volonté de se nourrir. Ainsi, les individus qui poussent les individus qui se nourrissent ou qui chapardent la nourriture dans la bouche des autres ont un rSMR plus élevé que ceux qui ne chapardent pas. La corrélation positive entre rSMR et croissance entre 3 et 7 mois pourrait donc passer par une corrélation avec un plus fort appétit et donc une forte prise de nourriture. Aucune corrélation n'a pu être détectée entre le rSMR des civelles et celui des adultes.

Conclusion: Le métabolisme pourrait avoir un lien avec le futur sexe des individus dans la mesure où il influence la croissance, possiblement *via* la stimulation de l'appétit. Bien que chez beaucoup d'animaux des expériences menées à court terme indiquent une cohérence entre le métabolisme mesuré au temps t et celui mesuré au temps $t+1$, la constance du niveau du métabolisme sur le long terme semble beaucoup moins évidente (en tous cas chez l'anguille).

Chapitre 5 : Relation entre Métabolisme standard, croissance et comportements

Introduction

Le métabolisme standard (SMR) correspond à l'énergie nécessaire à un individu pour assurer ses fonctions vitales au repos. L'intérêt d'étudier le métabolisme des individus est double dans la mesure où il est intimement lié à la croissance (revue de Jobling, 1981) et dès le plus jeune âge, au sexe (Garn et Clark, 1953). De façon générale, les individus qui ont un métabolisme standard élevé ont une bonne croissance quand les quantités de nourriture ne sont pas limitantes et vice-versa (Metcalf, 1986). Cependant, il a été mis en évidence que les jeunes saumons pouvaient aussi moduler leur métabolisme standard relatif⁵ (rSMR) lorsque les quantités de nourriture devenaient limitantes et augmenter leurs rSMR lorsque les conditions redevenaient plus favorables (O'Connor *et al.* 2000).

Chez de nombreuses espèces et notamment chez les anguilles adultes, les mâles ont un métabolisme plus élevé que les femelles (Amérand *et al.* 2010). Chez l'humain le métabolisme au repos des hommes est supérieur de 23 % à celui des femmes (Arciero *et al.* 1993).

Le métabolisme est sous l'influence de nombreuses variables environnementales, notamment la température. Chez les poikilothermes, tels que les poissons, il a pu être montré que le métabolisme augmentait de façon exponentielle au niveau cellulaire et individuel avec la température (Gillooly *et al.* 2001). La salinité peut également influencer le métabolisme des individus. Les premières expériences sur le métabolisme des civelles d'anguille européenne ont montré que la consommation d'oxygène était plus faible en eau salée qu'en eau douce (Fontaine et Raffy, 1932). Une étude plus récente a plutôt conclu à une absence d'effet au-delà de 48H chez des civelles japonaises (Kim *et al.* 2006). La pression atmosphérique peut aussi jouer un rôle important, Sebert *et al.* (1995) ayant montré que confrontées à de hautes pressions les anguilles jaunes étaient capables de diminuer de 40% leur consommation.

⁵ rSMR correspond à la consommation d'oxygène d'un individu au repos relative à son poids.

La taille des animaux est également un facteur crucial pour expliquer la consommation d'oxygène à l'échelle inter- et intra-spécifique. Une étude portant sur les œufs de différentes espèces de poissons a montré que la taille des œufs permettait d'expliquer 99% de la variance de la consommation d'oxygène (revue de Kamler, 2008). Chez l'anguille, la température et le poids agissent de concert pour expliquer la consommation d'oxygène. En effet chez des groupes d'anguilles (n = 30) de petites tailles (10 g en moyenne) le rSMR est 2 fois supérieur à celui des grosses anguilles (90 g en moyenne) à 18°C et 3 fois supérieur à 27°C (Degani *et al.* 1989). Pour comparer plusieurs individus avec des poids différents, on utilise une échelle logarithmique car l'augmentation de la masse est supérieure à l'augmentation du métabolisme. Le phénomène est connu sous le nom d'hétéroscédasticité (Nevill, 1994). Le métabolisme d'un individu est ainsi lié à son poids par la relation allométrique :

$$\ln M = a + b(\ln P)$$

Où M est le métabolisme, P le poids de l'individu et a et b, deux constantes (Kleiber 1961).

Chez les poissons juvéniles et adultes, la valeur de b serait approximativement de 0.8 (Winberg 1956). Clarke et Johnston (1999) confirment ce résultat en estimant la valeur moyenne de b chez 69 espèces de poissons à 0.79 (SE 0.11). Un exposant inférieur à 1 indique que le métabolisme relatif (par unité de poids) est plus important chez les petits individus que chez les grands. Cette particularité vient du fait que la proportion de structures métaboliquement inertes (graisses, squelette,...) augmente avec le poids.

Le but de la présente étude est d'estimer dans quelle mesure le métabolisme standard peut être lié au comportement et à la croissance chez la civelle, mais également de chercher une possible relation entre métabolisme précoce et sexe futur des individus.

Matériel et Méthodes

La mesure du métabolisme a été effectuée peu après la capture des civelles d'automne et de printemps (cf. Matériels et Méthodes de la Partie I, pour une description plus complète du protocole). Après 2 ans et demi de captivité (dont 6 mois à 11.5°C, puis 2 ans à 17°C), les individus survivants de plus de 30 cm ont été soumis au même protocole de mesure d'oxygène après 15 jours de mise à jeun à 11°C. La mesure du métabolisme au repos était effectuée en fin de matinée (9 h 00 – 13 h 00), période où la consommation d'oxygène est la plus faible (Degani et Lee-Gallagher, 1985 ; Degani *et al.* 1989).

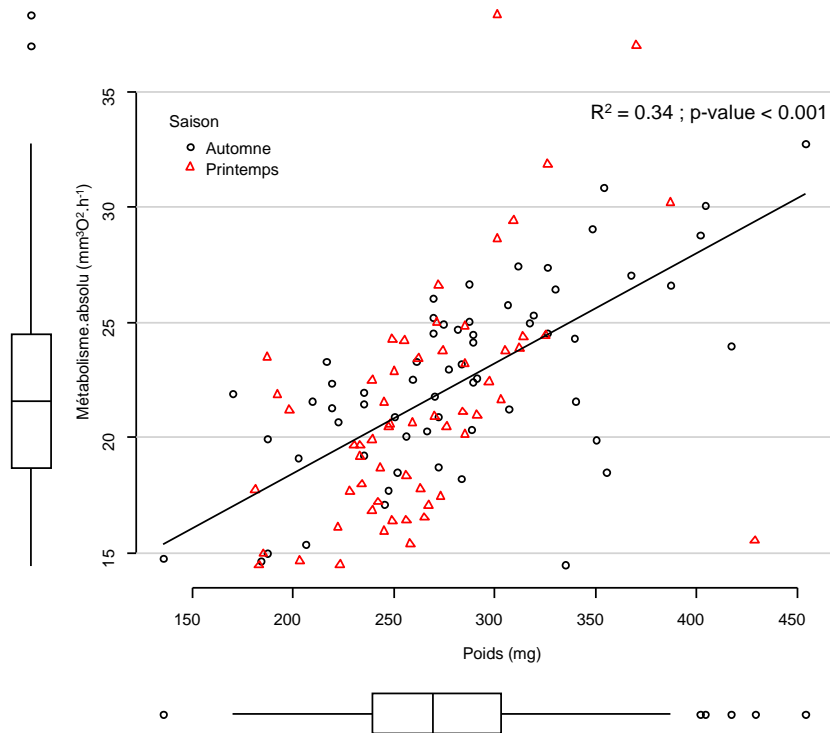


Fig. 40. Relation linéaire entre métabolisme absolu et poids initial (moment de la mesure de consommation d'oxygène) des individus d'automne (en noir) et de printemps (en rouge).

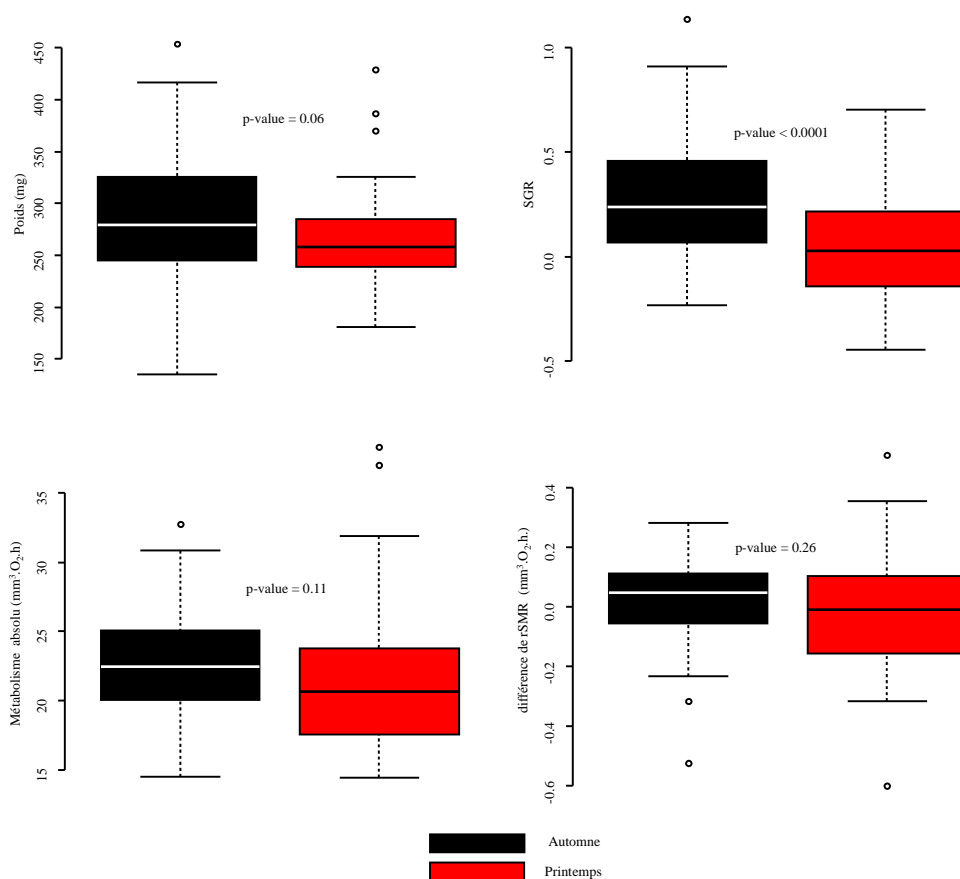


Fig. 41. a) Poids initial b) croissance (SGR) entre 0 et 3 mois ; c) Métabolisme absolu et d) rSMR des individus d'automne (en noir) et de printemps (en rouge). Seule la croissance entre 0 et 3 mois diffère significativement entre individus d'automne et de printemps.

Le calcul du métabolisme relatif (rSMR) a été effectué à partir du poids des individus, tout comme sur les civelles et non à partir de leur surface corporelle. Dans la mesure où ce poisson utilise de façon importante (35 % de l'absorption totale) la respiration cutanée (Kirsh et Nonnotte, 1977), l'utilisation de la surface pour le calcul du métabolisme relatif aurait pu s'avérer plus pertinente (Sébert *et al.* 2004). Néanmoins, chez les civelles tout comme chez les adultes, la relation poids/consommation d'oxygène était meilleure que la relation surface/consommation d'oxygène. Cela tient peut être au fait que la formule de calcul de la surface donnée par Sébert *et al.* (2004), et utilisée ici, concernait des individus plus gros (70 à 1250 gr) et que le calcul de la surface des civelles n'est pas totalement juste (elles étaient considérées comme des tubes parfaits de forme ellipsoïdale). Après la mesure de leur métabolisme standard, les individus de plus de 30 cm ont été endormis, puis tués avec une dose létale de Benzocaïne (2 ml/L) pour être ensuite sexés histologiquement.

L'analyse de la relation entre comportement et rSMR a été effectuée à partir de modèles linéaires généralisés avec effets mixtes (GLMM ; loi de Poisson) avec un intercepte aléatoire pour l'effet aquarium. Le matériel et méthodes est décrit de façon précise dans la section dédiée de la Partie I pour le métabolisme et de la Partie II pour l'histologie.

Résultats

Métabolisme et Croissance

La relation allométrique entre consommation d'oxygène et poids des civelles (Fig. 40) ne différait pas significativement en fonction de la saison de capture. Elle peut être donnée par la formule : $\ln M = 0.58 (\ln P) - 0.18$ (avec 0.58 : exposant b et -0.18 : l'intercepte).

Comme la consommation d'oxygène au repos des civelles d'automne était similaire à celle des civelles de printemps (Fig. 41c), le rSMR a été calculé dans un premier temps comme s'il ne s'agissait que d'un seul groupe. À partir de ce calcul, il n'a pas été possible de détecter une différence de consommation d'oxygène relative au poids (rSMR) entre lots saisonniers (Fig. 41d) et ce, malgré une différence de poids marquée mais non significative (p-value = 0.06) entre civelles d'automne et civelles de printemps (Fig. 41a). De plus, le rSMR n'a pas permis d'expliquer les différences de croissance à 3 mois entre lots saisonniers (Fig. 41b). Le calcul d'un rSMR spécifique à chaque lot saisonnier n'a pas non plus permis d'établir de lien significatif entre le métabolisme et la croissance à 3 mois ($SGR_{0,3}$), ceci bien que l'on observe

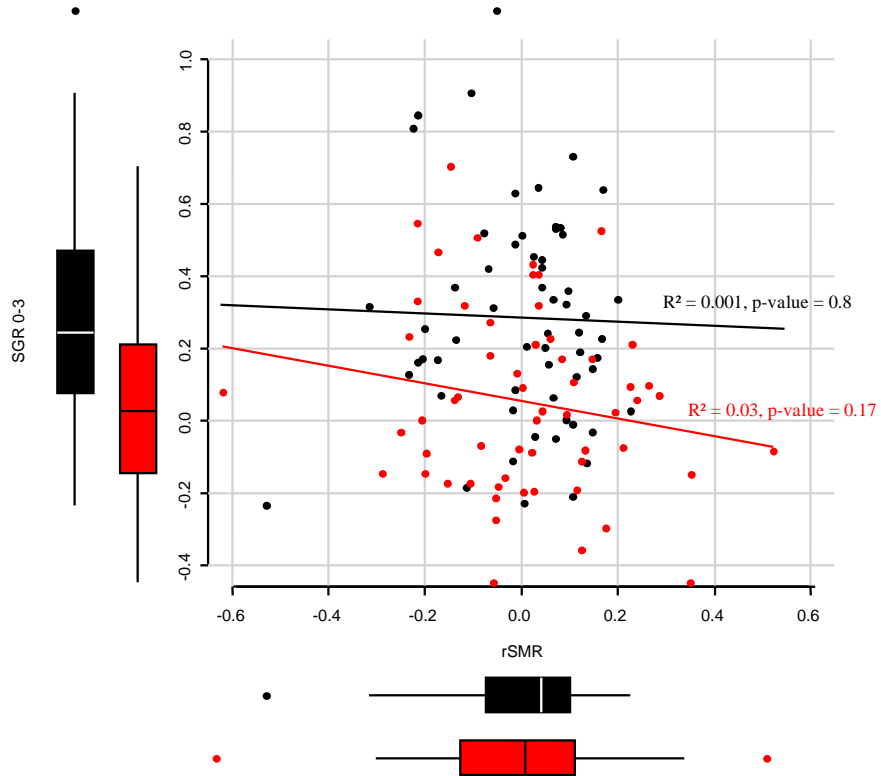


Fig. 42. Relation linéaire entre métabolisme standard relatif (rSMR) initial (T=0) calculé spécifiquement pour les individus d'automne (en noir) et de printemps (en rouge) et la croissance (SGR) entre 0 et 3 mois.

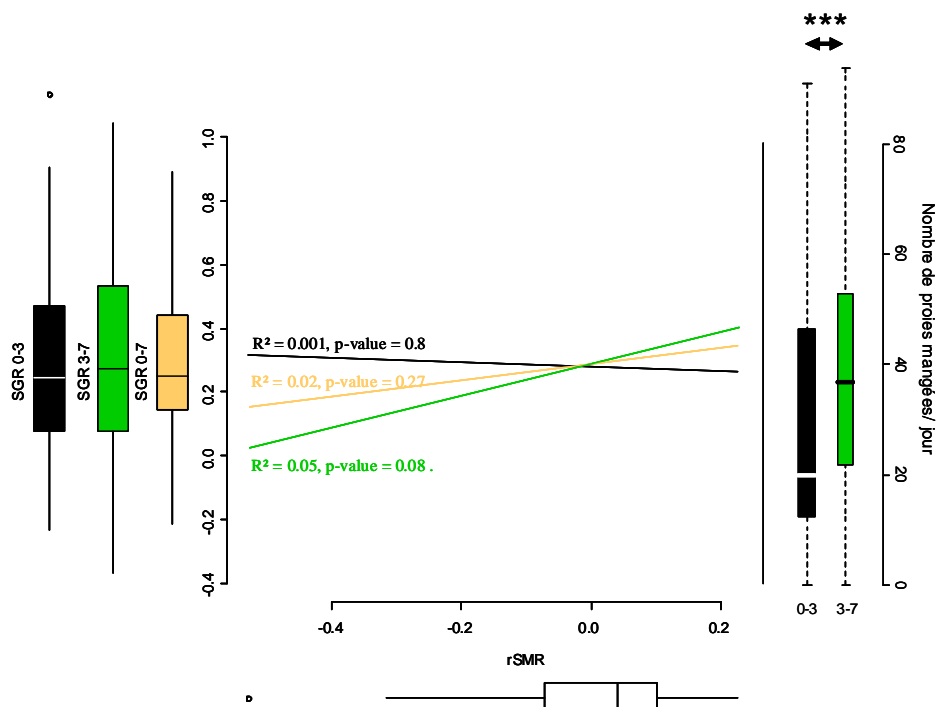


Fig. 43. Relation linéaire entre métabolisme standard relatif (rSMR) initial (T=0) et la croissance des individus d'automne entre les différentes périodes (0-3 mois ; 3-7 mois et 0-7 mois). Le nombre de proies mangées par jour correspond au nombre total de chironomes mangés dans tous les aquariums entre les différentes périodes pour les individus d'automne.

une légère tendance négative entre rSMR et croissance à 3 mois (p-value = 0.17) chez les civelles de printemps (Fig. 42). La formule pour chaque lot est : Printemps : $\ln M = 0.67(1nP) - 0.7$ et Automne $\ln M = 0.50(1nP) + 0.26$.

L'étude prolongée de la croissance entre 3 et 7 mois (SGR₃₋₇) chez les individus d'automne a permis de détecter une meilleure corrélation entre le SGR et le rSMR (Fig. 43).

En effet, sur cette seconde période, la corrélation positive entre métabolisme et croissance semble plus marquée, bien que non significative (p-value = 0.08, Fig. 43). Lors de la première période, le rSMR n'était pas corrélé au nombre de chironomes mangés aux sessions 1, 2 et 3 pour les civelles d'automne (respectivement $R^2 = 0.01$; 0.02 et 0.02 et p-value > 0.8 pour tous). Une légère tendance positive apparaît à la session 4 ($R^2 = 0.11$) mais n'est pas significative (p-value = 0.4).

Métabolisme et Comportements

Aucun lien n'a été trouvé entre rSMR et le nombre d'attaques portées pendant la période d'alimentation pour les individus d'automne et de printemps confondus (Tableau 9). En revanche, le nombre total d'événements « pousses » sur les premiers mois était positivement corrélé au rSMR (Tableau 9). On a également détecté une corrélation positive significative entre le fait de chaparder la nourriture dans la bouche des autres individus et le rSMR (Tableau 9, Fig. 44). Aucune relation n'a pu être détectée entre rSMR et activité de nage (jour + nuit) aux sessions 1, 2, 3 et 4 (Pearson Test p-value : 0.49 ; 0.37 ; 0.64 ; 0.6 ; respectivement). De la même façon, aucune corrélation n'a été détectée entre rSMR et grégarité aux sessions 1, 2, 3 et 4 (Pearson Test p-value : 1 ; 0.73 ; 0.64 ; 0.84 ; respectivement).

Modèle :	rSMR	p-value	R ²
(1) Attaques totales	+	0.39	
(2) Chironomes Chapardés	+	< 0.05	0.34
(3) Pousses	+	< 0.001	0.49
(4) Morsures	+	0.85	

Tableau 9 : Relation linéaire entre métabolisme standard relatif (rSMR) et variables comportementales sur les 3 premiers mois. Les p-values sont obtenues à partir de 4 modèles linéaires généralisé mixtes (GLMM) avec un intercepte aléatoire pour l'aquarium et utilisant une loi de Poisson. Ces modèles ont été effectués sur l'ensemble des données (civelles d'automne + printemps). Le R² donne le pourcentage d'explication de la variable d'intérêt (rSMR).

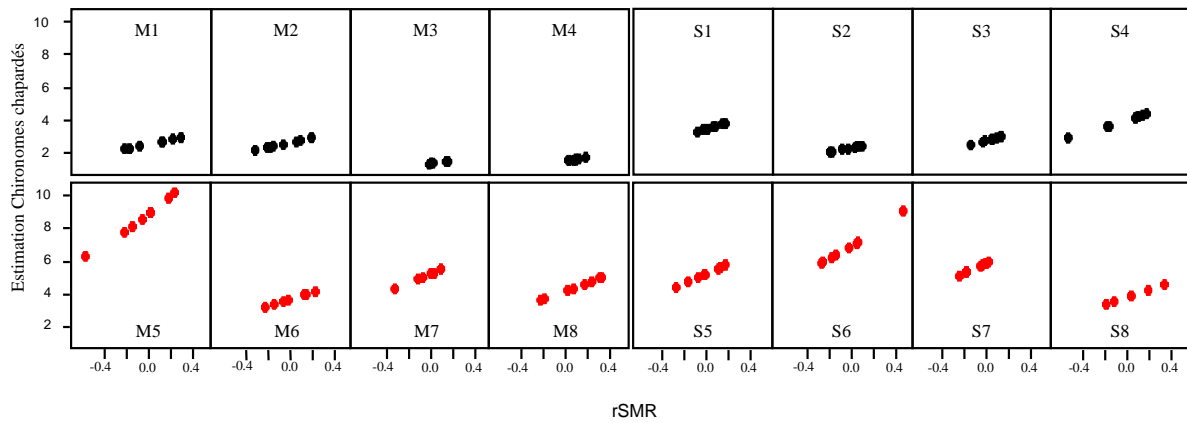


Fig. 44. Valeurs prédites par le modèle (2) du nombre de chironomes chapardés pendant les 3 premiers mois (somme des observations) en fonction du rSMR des individus. On note une corrélation positive dans quasiment tous les aquariums d'automne (en noir) et de printemps (en rouge).

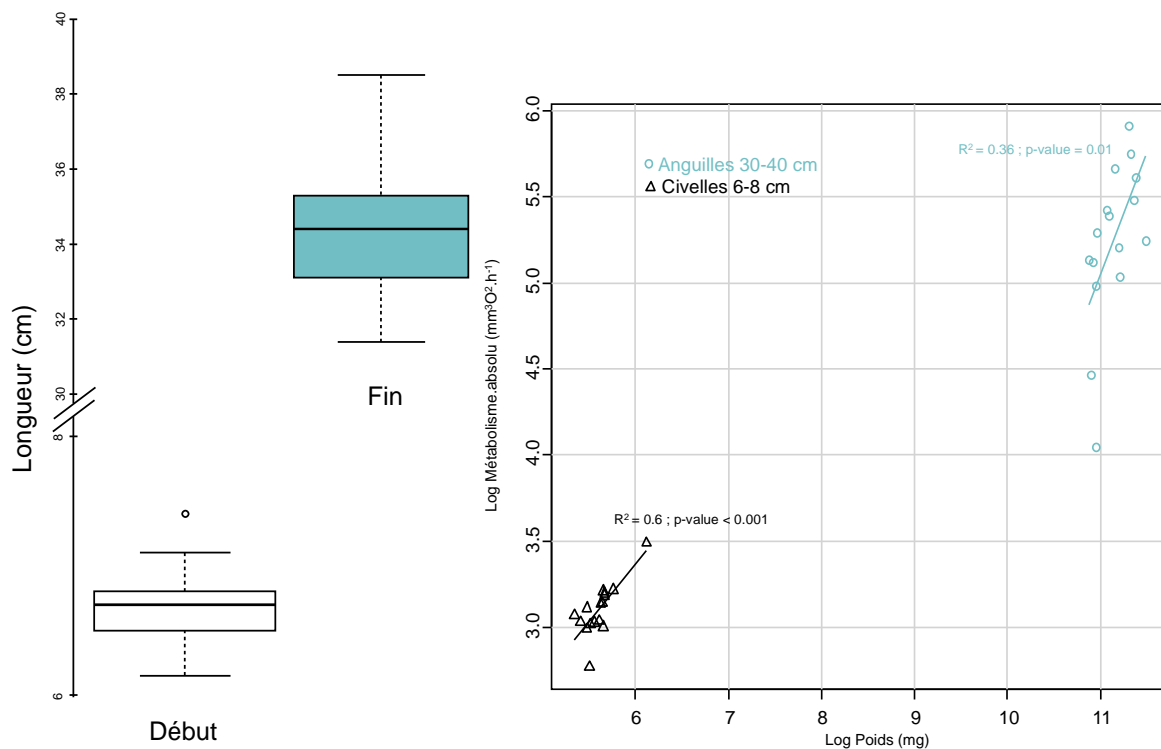


Fig. 45. a) Box plot de la taille des individus dont le métabolisme a été mesuré au début (en blanc, stade civelle) et à la fin de l'expérience (en vert, stade anguille) ; b) Relation linéaire entre le log du métabolisme absolu et le log du poids (au moment de la mesure de consommation d'oxygène) au début (triangle noir, $n = 16$) et à la fin de l'expérience (cercle vert, $n = 17$) chez les individus de printemps et d'automne confondus.

Répétabilité du métabolisme et influence du Sexe

Seuls 23 individus sur 128 ont survécu après deux ans et demi d'élevage. Il n'a pas été détecté de mortalité différentielle liée au rSMR initial. Parmi les survivants, 17 avaient atteint la taille nécessaire (> 30cm) pour être sexés (Fig 45a). Tous ces individus étaient des mâles. Quatre individus morts avant d'avoir atteint cette taille limite semblaient également être des mâles.

La mesure du métabolisme a été effectuée sur les 17 mâles. La comparaison entre SMR initial (t=0) et SMR final (t= 2.5 ans) a été réalisée sur 16 individus (car la mesure du métabolisme n'avait pu être faite sur une civelle de printemps). La corrélation entre le poids et le métabolisme au repos des anguilles était moins bonne que celle des civelles, mais significative ($R^2 = 0.36$ sur les 16 anguilles vs $R^2 = 0.6$ sur les 16 civelles, Fig 45b).

De façon étonnante, la consommation d'oxygène des anguilles au repos est négativement corrélée à la consommation d'oxygène des civelles au repos (Fig. 46). Néanmoins on peut noter que 2 individus « tirent » fortement cette relation. En revanche, la corrélation entre le rSMR des civelles et le rSMR des anguilles n'est pas significative (Fig 47).

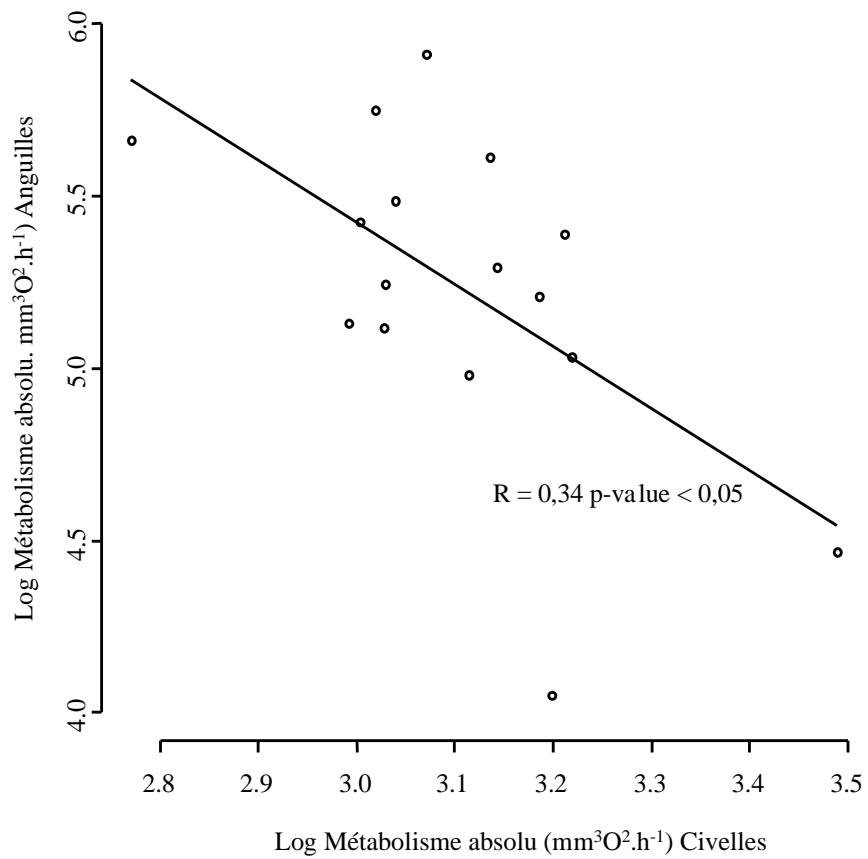


Fig. 46. Relation linéaire entre le log du métabolisme absolu initial (civelles, t = 0) et log du métabolisme absolu final (anguilles, t = 2.5 ans) avec n = 16.

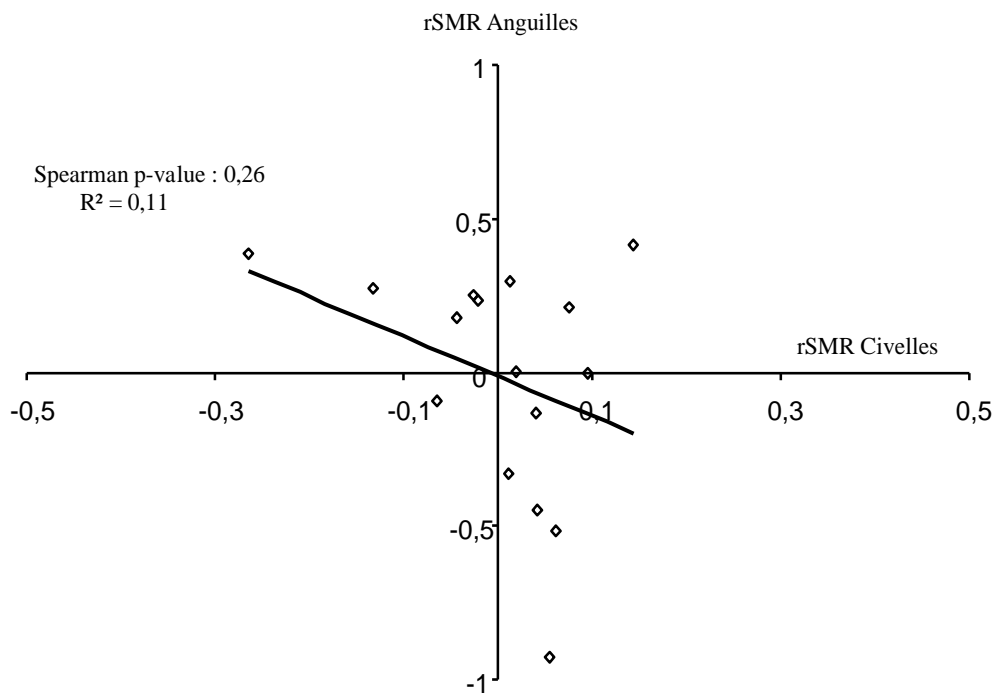


Fig. 47. Relation linéaire entre le rSMR initial (civelles, t = 0) et le rSMR final (anguilles, t = 2.5 ans) avec n = 16.

Discussion

Répétabilité du métabolisme

Il n'a pas été détecté de mortalité différentielle en fonction du rSMR initial des individus. Chez la truite, aucune différence de mortalité associée au rSMR des individus n'a pas non plus été trouvée (Álvarez et Nicieza, 2005).

La consommation moyenne des anguilles (~ 70 gr) au repos dans notre expérience était 205 ± 19 (SE) $\text{mm}^3\text{O}_2\cdot\text{h}^{-1}$ à 11°C . A titre de comparaison, la consommation au repos chez des anguilles de même poids était de $784 \text{ mm}^3\text{O}_2\cdot\text{h}^{-1}$ à 25°C (Owen, 2001). Clarke et Johnston (1999) qui ont effectué une revue sur le métabolisme des poissons ont estimé la consommation d'anguilles de 50g au repos à $1924 \text{ mm}^3\text{O}_2\cdot\text{h}^{-1}$ à 15°C . Ces auteurs ont constaté que parmi 6 ordres de poissons téléostéens étudiés (et 55 espèces) les anguilles étaient les poissons avec les plus faibles métabolismes absolu et relatif. L'anguille est un des rares poissons à pouvoir survivre hors de l'eau pendant de nombreuses heures et à pouvoir s'adapter à des eaux contenant de très faibles niveaux d'oxygène (Wood et Johanssen, 1973), où des poissons plus actifs (comme la truite) ne pourraient pas survivre. Les consommations assez faibles observées ici par rapport à la littérature sont sans doute liées à la température faible utilisée lors des tests (11°C).

Très peu d'études sur la répétabilité du métabolisme standard ont été effectuées sur d'aussi grandes périodes, car cela implique un suivi individuel à long terme. Nespolo et Franco (2007) ont réalisé une revue sur le sujet montrant que sur 47 espèces animales la corrélation entre métabolisme initial et métabolisme final était significative sur 42 espèces. Néanmoins, de toutes les études présentées dans cette revue, une seule avait atteint une durée comparable à la notre (913 jours, Rønning *et al.* 2005). Dans leur étude les auteurs ont montré que la répétabilité du métabolisme était la même après 1.5 mois et après 2.5 ans chez le mandarin diamant *Taeniopygia guttata* (Rønning *et al.* 2005). Après deux ans et demi, le coefficient de corrélation intra-classes était de 0.57, ce qui indique tout de même une certaine plasticité chez les oiseaux. Dans notre étude le métabolisme relatif des adultes n'est pas corrélé au métabolisme relatif des juvéniles, ou alors négativement. Chez les poissons, l'étude de la répétabilité du métabolisme a été réalisée chez seulement 3 espèces, le saumon atlantique *Salmo salar* (répétabilité sur 4 mois), le killi *Fundulus grandis* (répétabilité sur 1 mois) (d'après la revue de Nespolo et Franco, 2007) et plus récemment chez la loche épineuse *Cobitis taenia* (répétabilité sur 5 mois, Maciak et Konarzewski, 2010). Chez la loche épineuse

le coefficient de corrélation de Pearson était de 0.68 dans des conditions de normoxie et de 0.73 dans des conditions d'hypoxie (Maciak et Konarzewski, 2010). Chez les juvéniles de saumon atlantique, une corrélation positive ($r=0.68$) a été détecté entre rSMR initial et rSMR après 4 mois (McCarthy, 2000). L'auteur souligne cependant que cela n'est vrai que lorsque la nourriture n'est pas limitante. Dans la présente expérience, la nourriture a pu être limitante car la mesure du métabolisme a été effectuée après 15 jours de jeûne. De plus, les individus ont été élevés à 11°C lors des 6 premiers mois puis à 17°C le reste du temps (2 ans) et à nouveau 11°C (pendant les derniers 15 jours). La sensibilité à ces facteurs (température et privation de nourriture) peut être variable d'un individu à l'autre et peut potentiellement expliquer cet écart par rapport à l'attendu (*i.e.* répétabilité du métabolisme). Des périodes d'apnée ont été enregistrées chez les anguilles *Anguilla anguilla* et varient en fonction des poissons (Belaud, 1975). Chez *Anguilla australis*, 10 individus sur 11 avec une taille comprise entre 400 g et 1.3 kg ont montré des périodes d'apnée pouvant durer 30 minutes ou plus (Forster, 1981). Ce facteur pourrait également influencer la mesure de la consommation d'oxygène au repos chez les anguilles adultes de notre expérience. Il est aussi possible que la corrélation négative soit réelle, en lien avec l'histoire de vie particulière de l'espèce et notamment le timing de la seconde métamorphose.

Métabolisme et Croissance

Dans nos conditions de mesure du métabolisme chez les civelles (11°C), la relation établie entre consommation d'oxygène et poids des individus est très proche de celle obtenue chez des anguilles élevées à 15°C et dont le poids est compris entre 0.3 gr et 6.5 gr ($\ln M = 0.57$ (1nP) – 1.9, Degani et Lee-Gallagher, 1985). Clarke et Johnston (1999), ont estimé la valeur des différents paramètres de cette même équation à partir d'une méta-analyse basée sur 69 espèces de poissons téléostéens. La relation trouvée à partir de leurs données ($\ln M = 0.79$ (1nP) – 5.43) est assez différente de ce que l'on observe chez l'anguille, probablement en relation avec le métabolisme respiratoire particulier de cette espèce qui est pour 30% cutané. Il est intéressant de noter que la consommation d'oxygène des civelles est faible comparativement à d'autres espèces comme la truite. En effet, le métabolisme de routine⁶ mesuré chez des alevins de truite émergents (100 mg) est compris entre 13 et 21 mm³O₂. h⁻¹ à

⁶ Le métabolisme au repos est appelé métabolisme de routine chez les alevins émergents qui possèdent encore des réserves vitellines.

une température similaire (Régner *et al.* 2010), ce qui est dans la même gamme que ce qui est observé pour des civelles 2 à 3 fois plus grosses.

Durant la première partie de l'étude (entre 1 et 3 mois), le métabolisme relatif n'a pas été corrélé à la croissance, ou alors de façon légèrement négative pour les civelles de printemps. Cela s'explique peut-être par le fait qu'aucune corrélation n'a été détectée entre chironomes mangés lors des sessions 1, 2, 3 et le rSMR des individus. Or le nombre de chironome mangé pendant les périodes d'observations est la variable la mieux corrélée à la croissance (Geffroy et Bardonnnet, 2012). En outre, les individus font face à de nombreux changements morphologiques pendant ces premiers mois (notamment un raccourcissement et l'acquisition d'une forme plus cylindrique) en lien avec la métamorphose, ce qui pourrait engendrer des coûts supplémentaires. On a pu également constater lors de cette phase, que l'activité de nage était négativement corrélée à la croissance (Geffroy et Bardonnnet, 2012) et que la quantité de nourriture ingérée était très faible.

Lors de la seconde période de l'étude (entre 3 et 7 mois pour les individus d'automne), la plus grande variabilité de croissance entre individus, de même que l'augmentation significative de la consommation totale de proies pendant la période 2 (Fig. 43) comparativement à la période 1 pourraient permettre d'expliquer le fait que la corrélation entre SGR et rSMR tende à être positive ($p=0.08$). De plus, le nombre de proies mangées pendant la session 4 est légèrement corrélé au rSMR ($R^2 = 0.11$), bien que non significativement. Il est probable que lors de cette seconde période de croissance, les coûts associés à la métamorphose soient complètement assimilés pour une majorité d'individus (87 % des individus sont au stade 6A3 ou 6A4) et que les individus avec le plus fort métabolisme obtiennent un plus grand bénéfice (en termes de SGR) de l'abondance de proie. Chez deux populations de capucette sélectionnées pour leurs capacités différentes à croître, il a été montré que le génotype « croissance rapide » avait un rSMR plus élevé que le génotype « croissance lente » (Arnott *et al.* 2006). Cependant Álvarez et Nicieza (2005) ont souligné le possible biais que pourraient introduire les conditions dans lesquelles sont placés les poissons. En effet, une corrélation négative et/ou aucune corrélation entre rSMR et SGR a été détectée sur des populations de jeunes truites sauvages (*Salmo trutta*) alors qu'une corrélation positive ($R^2 = 0.05$, $p= 0.01$) était détectée chez des truites (*Salmo trutta*) d'aquaculture, soulignant le rôle prépondérant et de fait, potentiellement artéfactuel, de l'apport en nourriture (Álvarez et Nicieza, 2005).

La croissance, et plus particulièrement la synthèse protéique requiert de l'énergie (Brafield et Llewellyn, 1982). Cette énergie est en partie apportée par l'oxygène.

Le métabolisme respiratoire est alors divisé en 3 compartiments tel que :

$$R = R_s + R_f + R_a$$

Où R_s est le métabolisme standard (ici rSMR), R_f est le coût métabolique de la synthèse protéique et R_a le coût métabolique associé à la locomotion (d'après Priede, 1985). Chez les anguilles adultes (70 gr) il est prédit que $R_s = 11\%$ $R_f = 49\%$ et $R_a = 34\%$ de la consommation d'oxygène totale (Owen, 2001). Les 6 % restant étant associés à l'erreur d'estimation de chaque compartiment. Néanmoins deux précisions doivent être apportées à ce modèle car il est difficile de partitionner des processus physiologiques dans de simples compartiments :

- 1) On ne sait pas dans quelle mesure les différents compartiments co-varient. Un faible R_s (rSMR) n'entraîne pas forcément un fort R_f
- 2) Le R_s peut également inclure des coûts liés à la synthèse protéique nécessaire à la maintenance.

Dans le cas présent, l'apport de nourriture et l'efficacité de la synthèse protéique peuvent différer entre individus ayant des rSMR similaires, notamment durant la première période au cours de laquelle la prise alimentaire se met en place. Cela explique sans doute, en plus du processus de métamorphose, l'absence de relation entre métabolisme et croissance durant cette phase. Par la suite, on observe une corrélation positive entre rSMR et croissance, ce qui laisse supposer une co-variance entre R_s et R_f . On a vu dans les chapitres précédents que certains individus pouvaient être très actifs, alors que d'autres semblaient au contraire complètement passifs. Il est donc probable que l'activité montrant un niveau de variance inter-individuelle marquée, soit une source de variance dans la relation entre métabolisme standard et croissance. Degani et Lee-Gallagher (1985) concluent plutôt à une corrélation négative entre métabolisme et croissance. Ils proposent que chez les anguillettes, les individus ayant eu une croissance faible ont une consommation d'oxygène en activité ($R_s + R_f + R_a$) plus élevée que les individus ayant eu une forte croissance.

Il est donc intéressant d'interroger maintenant les liens entre comportement et métabolisme.

Métabolisme et Comportements

Plusieurs exemples de la littérature ont mis en évidence un lien entre le métabolisme et certains comportements. Il a notamment été montré chez le saumon que les individus les plus dominants avaient le plus fort rSMR (Metcalfé *et al.* 1995). Dans le cas présent, le seul lien qui a pu être établi est la corrélation positive du rSMR avec le nombre de « pousses » et le nombre de « chapardages ». En revanche, le métabolisme standard des civelles n'a pu être relié à leur activité de nage qui pourtant montre des niveaux très variables. Ainsi, la seule relation mise en évidence est celle entre le métabolisme et des comportements agressifs qui peuvent être assimilés à une forte motivation des individus à obtenir de la nourriture. Chez les salmonidés, le rSMR est un des facteurs physiologiques qui stimule la première prise alimentaire, car un fort métabolisme est associé à une utilisation plus rapide des réserves vitellines (Metcalfé *et al.* 1995 ; Régnier *et al.* 2012). Notre étude souligne qu'un fort métabolisme conduit certaines civelles à agir de façons plus téméraire que d'autres pour obtenir de la nourriture, bien que cela ne se traduise pas forcément par un succès (car le rSMR n'est pas corrélé au nombre total de chironome consommé et le nombre de chironomes chapardés ne l'est que dans une faible mesure $R^2 = 0.03 ; 0.14 ; 0.03$, respectivement aux sessions 1,2 et 3).

Au-delà du lien entre métabolisme et « appétit », le comportement de pousse et de chapardage mérite d'être discuté. En effet, ces comportements peuvent traduire une forte motivation à trouver de la nourriture, mais ils ne représentent pas un échantillonnage optimal de la zone de nourrissage. Il s'agit plutôt du harcèlement de l'individu qui a réussi la prise alimentaire. On pourrait donc interpréter ces comportements dans le cadre de la stratégie « **producer-scrounger** » (**producteurs/chapardeurs**) développée par certains individus et décrite pour la première fois par Barnard et Sibly (1981). L'examen des données sur un total de 27 jours d'observation (pendant les 3 premiers mois) montre que 15 % des individus n'ont jamais chapardé de nourriture, 51.5% ont chapardé entre 1 et 4 fois, 22.5% entre 5 et 9 fois et 11 % plus de 10 fois. La distinction entre chapardeurs et producteurs n'est cependant pas stricte et certains individus peuvent passer d'une stratégie à l'autre. Néanmoins, respectivement 77% et 92 % des individus qui chapardaient à la session 1, chapardaient également aux sessions 2 et 3. De plus 77% des individus qui chapardaient à la session 2 chapardaient aussi à la session 3. Il semble par ailleurs que cette faculté à chaparder la nourriture se soit installée progressivement dans les groupes de civelles (pourcentage d'individus qui chapardent lors de la session 1 : 10 % ; session 2 : 64 % et session 3 : 68 %).

Elle est donc probablement liée à de l'apprentissage. Dans un modèle de base, il y a un partage de l'information. L'individu qui découvre une source de nourriture se voit très rapidement rejoint par les autres. C'est ce que l'on observe de façon grossière chez les civelles. Cela implique que les individus qui sont à la recherche de nourriture sont aussi capables, de façon simultanée, de surveiller les autres membres du groupe. Sur cette base, certains membres développeraient une tactique alternative et se spécialiseraient sur le chapardage.

La majorité des études concernant ces stratégies se sont focalisées sur les oiseaux (*e.g.* Giraldeau et Livoreil, 1998). La condition physique des individus jouerait un grand rôle sur l'émergence de ces différentes stratégies. Ainsi, il a été montré que la tactique « chapardeur » apparaissait chez les moineaux ayant les plus faibles réserves (Lendvai *et al.* 2004). Au-delà des réserves, il a été montré récemment chez les mandarins diamants *Taeniopygia guttata* que les individus avec le plus fort rSMR étaient ceux qui utilisaient le plus la tactique « chapardeurs » (Mathot *et al.* 2009). Nos résultats vont dans le même sens et il semble que ce soit la première étude sur les poissons reliant rSMR et comportements « producteurs/chapardeurs ».

Partie II

Croissance et Sexe

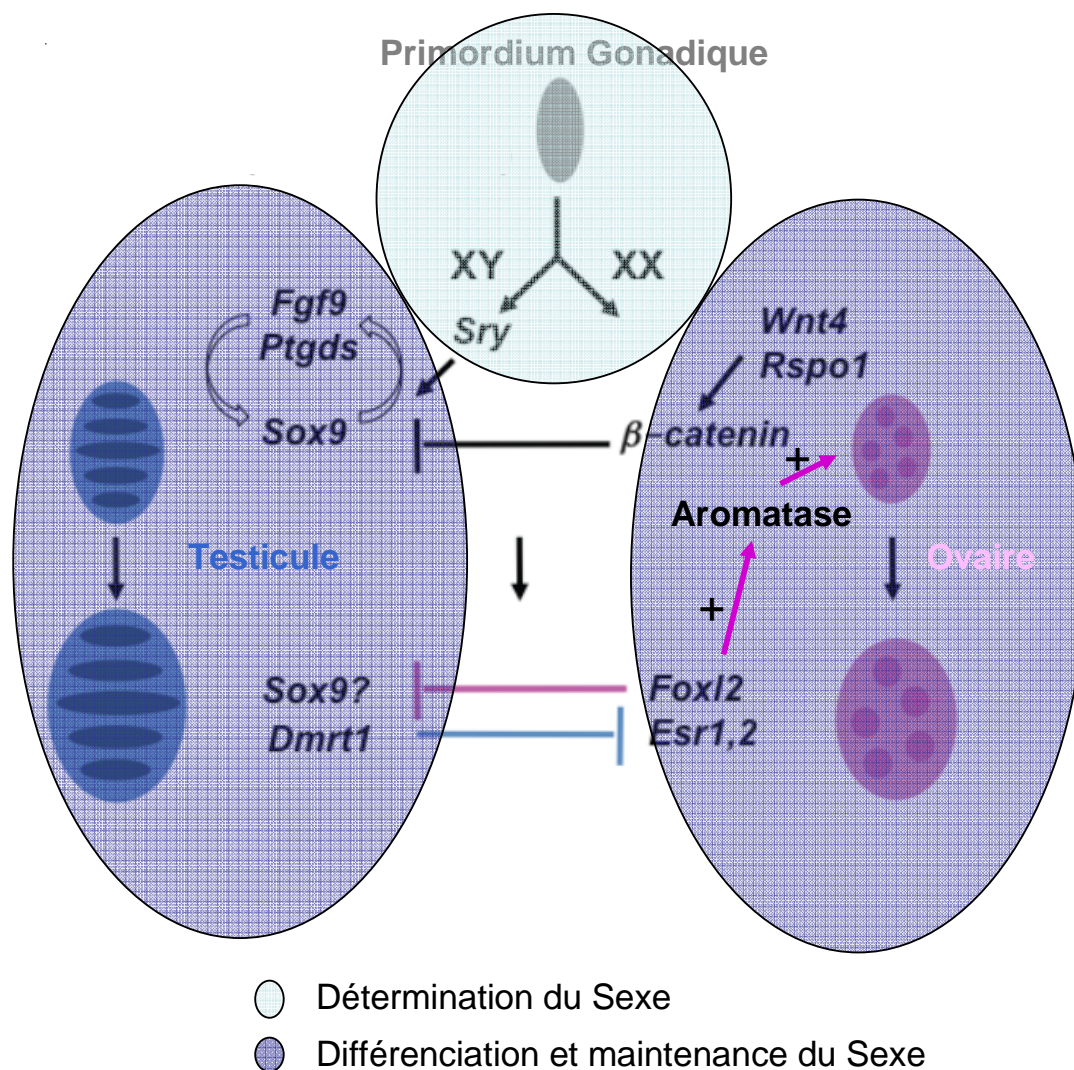


Fig. 48. Schéma descriptif de la détermination et de la différenciation du sexe chez les mammifères. Les principaux gènes impliqués dans le déterminisme du sexe, la différenciation sexuelle et le maintien des tissus gonadiques sont indiqués en italique. Modifié d'après Uhlenhaut *et al.* (2009).

Différenciation sexuelle et Allocation sexuelle

Différenciation sexuelle

Il convient de bien distinguer détermination et différenciation du sexe. Le premier terme se réfère à la première évidence (chronologique) de l'expression des fonctions et des structures propres à chaque sexe. Par exemple, chez les mammifères, cela correspond à l'expression du gène *sry* porté par le chromosome Y, qui conduit à la différenciation du primordium gonadique en testicule (Fig. 48). Le second terme fait référence aux fonctions et structures mises en place par chaque sexe et affectant un certain nombre de tissus et d'organes (Angelopoulou *et al.* 2012). La détermination du sexe, entraîne l'expression d'une cascade spécifique de gènes, qui permettent la différenciation de la gonade (Fig. 48).

Allocation sexuelle

L'allocation sexuelle est définie comme la distribution des ressources d'un organisme pour la fonction mâle *versus* la fonction femelle. Cela peut prendre la forme d'un ajustement du sexe ratio des descendants (la plupart du temps contrôlé par la mère), de la production d'œufs *versus* la production de sperme pour les individus hermaphrodites simultanés, ou de la direction et du « timing » du changement de sexe pour certains organismes (Warner, 1988).

Dans cette partie, les 4 cas majeurs définissant le caractère adaptatif de l'allocation sexuelle en fonction de l'environnement sont présentés :

a) Ajustement du sex-ratio des descendants : cas des guêpes parasitoïdes

L'exemple le plus connu est celui des guêpes parasitoïdes, du genre *Lariophagus*. Chez ces espèces haplodiploïdes, les femelles pondent un œuf par hôte et peuvent « choisir » d'investir préférentiellement dans un fils ou une fille en fonction de la qualité (taille) de l'hôte (Charnov *et al.* 1981). Ces auteurs montrent en effet que si l'hôte est grand, la femelle produira une fille et si l'hôte est petit, la femelle produira un fils. Ce caractère semble adaptatif, car les femelles se développant dans de grandes hôtes vont avoir un succès reproducteur relatif plus grand que des mâles se développant dans de grands hôtes. Ainsi, les chances de la mère d'avoir ses gènes disséminés dans la population augmentent de façon plus importante en produisant des filles de grande taille que lorsque des fils de grande taille sont produits.

b) Hermaphrodisme simultané, taille de l'individu et environnement social

Chez les espèces hermaphrodites simultanées, il existe un biais dans l'allocation sexuelle qui est lié à la taille de l'individu. Si ces derniers sont dans un environnement qui leur permet d'atteindre une grande taille comparativement à leurs congénères, alors ils vont investir préférentiellement dans la fonction femelle (synonyme d'une plus grande fécondité) au dépend de la fonction mâle (Schärer *et al.* 2001). Cela suggère également que la fonction femelle sera plus « coûteuse » en énergie, car seuls les gros individus sont capables d'assumer cette production différentielle. Néanmoins, le biais observé dépend en premier lieu de l'environnement social. En effet, lorsque les possibilités d'accouplement sont limitées, il y a un biais vers la fonction femelle, et inversement (revue de Schärer, 2009).

c) Hermaphrodisme séquentiel et environnement social : cas de la crépidule

La crépidule, *Crepidula norrisiarum*, est un hermaphrodite protandre chez qui le changement de sexe est dépendant de la taille de l'individu, mais également des caractéristiques phénotypiques des autres individus. Les mâles fonctionnels, élevés seuls, changent de sexe une fois la taille de 16 mm atteinte. Mais il a été montré que la structure du groupe influence le changement de sexe. En effet, les mâles changent plus rapidement de sexe si un mâle de taille inférieure est présent, mais ne changent pas de sexe si une femelle est présente (Warner *et al.* 1996). De ce point de vue, il s'agit bien d'une stratégie conditionnelle de changement de sexe qui permet de s'adapter et de tirer le meilleur avantage des conditions locales.

d) Expression conditionnelle du sexe : cas du cichlidé midas

Le cichlidé midas (*Amphilophus citrinellus*) est, à ma connaissance, le seul cas rapporté de détermination du sexe taille-dépendant (Francis, 1990, Francis et Barlow, 1993). Bien que cette découverte fût récemment remise en cause par Oldfield (2011), le cadre théorique qu'elle présente mérite d'être rapporté. En effet, cette espèce a pour particularité d'avoir un développement sexuel qui serait l'exact miroir de celui proposé pour l'anguille (voir Discussion). Chez le cichlidé midas les mâles ont une plus grande taille à maturité que les femelles. Cet avantage leur permet (1) de défendre leur territoire (Rogers et Barlow, 1991) et (2) d'avoir accès à de plus grandes femelles (McKaye, 1977 ; Rogers et Barlow, 1991) afin de maximiser leurs valeurs sélectives. Selon Francis et Barlow, (1993), les avantages à être mâle

pour des individus de grande taille seraient supérieurs (en termes de succès reproducteur) à ceux d'être femelle. Dans leurs expériences, les plus gros individus deviennent mâles lors de la différenciation sexuelle et les plus petits deviennent femelles (Francis et Barlow, 1993). Ce résultat serait irréversible. Une manière plus explicite de définir ce type d'allocation sexuelle est de considérer que cette stratégie ressemble en tous points à celle utilisée par les espèces protogynes (avantage supérieur à être mâle lorsqu'une grande taille est atteinte), en dehors du fait qu'elle se manifeste lorsque la gonade des individus est encore indifférenciée (par opposition à un changement du sexe mâle fonctionnel → femelle fonctionnelle). Chez les individus protogynes, il est prédit que la fonction mâle est plus coûteuse que la fonction femelle et que les femelles grossissent plus vite ; l'inverse est prédit chez les espèces protandres (Warner, 1988).

Dans le cadre de cette thèse, la compréhension des mécanismes physiologiques conduisant au développement de tel ou tel sexe sera abordée sous différents angles :

- Dans la première partie (Chapitre 6), le processus de différenciation sexuelle de l'anguille est étudié. Pour cela, l'analyse histologique des différents stades de développement de la gonade est réalisée, et l'expression du gène de l'aromatase impliqué dans la conversion des androgènes en œstrogènes est mesurée.
- Dans la seconde partie (Chapitre 7), la découverte de deux cas d'intersexualité tardive est évoquée et discutée d'un point de vue mécanistique, mais également évolutionniste.
- Dans la troisième partie (Chapitre 8), les conditions de densité et la croissance des individus sont étudiés. Le but est de déterminer si le processus de croissance peut être influencé par le nombre d'individus et s'il existe une croissance différentielle en fonction du sexe. Cette partie est discutée dans le cadre de l'allocation sexuelle dans la discussion générale.

3 Matériel et Méthodes II

Dans la mesure où l'expérience précédemment décrite présentait un risque majeur (faible nombre d'individus à élever sur 2 ans), une autre expérience sur un plus grand nombre d'individus, menée par Agnès Bardonnnet, avait été mise en place avant le début de ma thèse pour anticiper d'éventuels problèmes. Cette expérience avait pour but de comprendre l'effet de la densité et de la croissance sur le sexe des individus. Pour cela 1400 civelles, dont 400 marquées individuellement, ont été élevées dans des conditions de densité différentes pendant plus de 3 ans. Mon implication dans cette expérience concerne essentiellement le sexage des individus, le traitement des données acquises et la participation aux différents points de mesures (poids/longueur). L'essentiel de mon travail sur la différenciation sexuelle et l'obtention d'un marqueur précoce du sexe femelle (l'aromatase) s'est déroulé à Rennes en collaboration avec Yann Guiguen et Alexis Fostier de l'INRA SCRIBE.

En plus des anguilles provenant de l'élevage sur la densité, j'ai aussi travaillé sur des anguilles sauvages prélevées en milieu naturel. Un douzaine d'anguilles pêchées sur la Nivelle, ont permis de mettre au point le protocole de dosage de l'aromatase. Par ailleurs, des anguilles provenant d'une population sex-biaisée femelle ont été prélevées par pêche électrique en Juin 2011 afin de tester l'outil mis au point pour une détermination précoce du sexe.

1/ Prélèvement des civelles et design expérimental de l'expérimentation sur la densité

Un lot de civelles a été pêché au tamis à main à Moliets, en entrée d'estuaire le 26 mars 2009. Suite à cette pêche, 250 grammes de civelles a été relâché dans chaque section du fluvarium. Le but était d'obtenir des individus avec une forte propension à migrer (M+) et une faible propension à migrer (M-) (comme décrit dans le Matériel et Méthodes de la partie précédente). A la suite de ce tri unique (contrairement à l'expérience précédente où il y a eu double tri), les individus M+ et M- ont été mesurés, pesés et leur stade de développement a été déterminé selon les critères d'Elie *et al.* (1982), le 30 mars 2009. Cette date marque le début des expériences sur la croissance. Ensuite, les civelles sont mesurées, pesées à intervalles plus ou moins réguliers. Au total, 10 dates de mesures ont été réalisées.

Les structures d'élevage se composent de :

- 8 grands bacs de **0.8 m²**

4 bacs contenant un effectif initial de **50** individus

4 bacs contenant un effectif initial de **125** individus

- 8 petits bacs de **0.2 m²** :

4 bacs contenant un effectif initial de **50** individus

4 bacs contenant un effectif initial de **125** individus

Ce qui se traduit par 4 conditions de densités différentes : **62, 156, 250 et 650 ind/m²**.

Dans chaque bac, 25 civelles ont été marquées avec des VIE tags (orange, vert, rouge), chaque individu recevant 2 couleurs différentes sur différentes localisations de manière à obtenir 25 combinaisons. Parmi les 25 civelles marquées dans chaque bac, la moitié était M+ et l'autre moitié M-. Les individus restant non marqués étant équilibrés en terme d'effectif (M+/M-).

Conditions d'élevage

L'élevage a été réalisé dans les structures expérimentales de l'INRA. Pendant les 6 premiers mois, grâce à la thermorégulation à 17°C d'une réserve de 25 m³ permettant l'alimentation en circuit ouvert des 16 bacs, puis dans une pisciculture expérimentale où l'eau provenait d'une source chaude à 17°C, permettant d'éviter toute contamination externe (*e.g.* polluants). L'alimentation des poissons s'est faite à base d'œufs de merlu (recommandé dans Rodrigue et al. 2005) pendant 8 à 15 jours. Ces œufs ont progressivement été remplacés par de l'aliment spécialement conçu pour les anguilles (DAN-EX AAL, Biomar). Pendant l'élevage, les individus sont nourris (sur la base de 2% de la biomasse du bac avec ajustement hebdomadaire progressif selon la consommation) avec des granulés de taille croissante (1.2 mm, puis 1.5 mm, et enfin 2 mm). Cet aliment possède les caractéristiques suivantes : 48-50% de protéines, 26-28% de lipides, 11-13% de carbohydrates, 0.3-0.6% de fibres, 6.6-7.1% de cendres et 1.2-1.3% de phosphore. L'énergie brute de la nourriture est comprise entre 23.7-24.1 MJ/kg en fonction de la taille des granulés.

numéro bac	bains utilisés	durée d'immersion	Action
1	Alcool 70°	1h	
2	Alcool 70°	1h	
3	Alcool 96°	1h	Déshydratation progressive des tissus
4	Alcool 96°	1h	
5	Alcool 96°	1h	
6	Alcool 96°/Butanol	3h	Incorporation de l'agent « éclaircissant »,
7	Butanol	3h	
8	Butanol	3h	Préparation des échantillons à la paraffine
9	Butanol	3h	
10	Paraffine	1h	Pénétration progressive de la paraffine
11	Paraffine	2h	
12	Paraffine	2h	dans les tissus

Tableau 10 : Détail du programme de déshydratation.

Deux abris grillagés de 10 cm de diamètre sur 25 cm de long, contenant des élodées artificielles, étaient disposés en dessous de la surface de l'eau.

Suivi individuel de la croissance

Les individus ayant dépassé 16 cm après un an et demi d'élevage (le 08/07/2010) ont été marqués individuellement avec un PIT-tag (transpondeur) introduit dans la cavité péritonéale. A partir du 07/02/11, les individus ont commencé à être sexés pour :

- 1) Mieux comprendre le processus de différenciation sexuelle (Chapitre 11)
- 2) Tester l'hypothèse d'une croissance différentielle liée au sexe et aux conditions de densité (Chapitre 12)

Histologie

Fixation des échantillons

Suite à chaque prélèvement, les gonades dédiées à l'analyse microscopique ont été déposées dans des cassettes puis plongées dans du liquide de Bouin durant 6 à 8 h afin de fixer les échantillons. Le Bouin permet d'éviter la dégradation des tissus et de les raffermir. Les échantillons sont ensuite rincés à l'eau claire, afin d'éliminer le Bouin, et conservés dans du formol 10%.

Déshydratation et inclusion des échantillons :

Avant la déshydratation progressive des tissus, les échantillons sont à nouveau rincés à l'eau claire. La déshydratation des échantillons consiste en une série de bain d'alcool de concentration croissante (Tableau 10) qui permet à la paraffine (hydrophobe) de mieux pénétrer les tissus. Ces étapes sont réalisées dans le robot Citadel 1000 (Life Sciences International, Cergy Pontoise, France) selon les techniques de Gabes (1968). Les gonades sont ensuite incluses manuellement dans la paraffine à 70°C.

bac	produit	temps	Action
33	chauffe	15 min	Réchauffer la paraffine
1	toluène	10 min	
2	alcool 100°	03 min	
3	alcool 96°	03 min	
4	alcool 70°	05 min	
31	rinçage	01 min	Enlever les résidus avant coloration
5	eau distillée	01 min	
6	alun de fer	30 min	Mordantage (sels métallique pour préparer la fixation de la coloration aux tissus)
29	rinçage	05 min	
7	hématoxyline	30 min	Colore les noyaux, et tissus acides
31	rinçage	05 min	
8	acide picrique	10s	Différenciation
9	carbonate de lithium	05 min	Arrêt de la différenciation
30	rinçage	30 min	
10	OrangeG	30s	Colore les tissus basiques (ex: hématie)
30	rinçage	02 min	
11	bleu d'aniline	45s	Colore en bleu turquoise le collagène
24	alcool de montage 96°	02 min	
25	alcool de montage 96°	02 min	Déshydratation progressive pour préparer l'échantillon au milieu de montage
26	alcool de montage 100°	02 min	
27	Toluène	10 min	Milieu de montage
durée totale		2h45	Montage à l'afcolène

Tableau : 11 Détails du programme de coloration des lames

Coupes et colorations

Les blocs de paraffine sont coupés à l'aide d'un microtome. L'épaisseur de coupe est fixée à 5-6 μm . Une fois la lame montée, de l'albumine à 0,5% est ajoutée sous les coupes afin que les échantillons restent collés sur la lame. Avant coloration, les lames préparées sont mises à sécher à 37°C durant une nuit pour assurer l'adhérence des coupes sur les lames. La coloration des lames s'effectue *via* un automate (MICROM, HMS 760X) comportant 34 bacs. La coloration choisie (Tableau 11) est une coloration topographique trichrome (hématoxyline de Régaud, Orange G et bleu d'aniline) couramment utilisée pour l'étude des cycles sexuels. En effet, cette coloration permet notamment d'identifier le réseau chromatinien du noyau et de définir le stade de développement de la cellule. Une fois la coloration finie, les lamelles sont montées sur les lames à l'aide d'afcolène.

Les observations et photographies sont réalisées au microscope photonique Leica DMRB équipé d'un système d'imagerie Olympus DP71 couplé au programme Cell* d'Olympus.

2/ Prélèvement des anguilles pour tester la méthode sur une population sex-biaisée

Le but de cette expérience est d'essayer de déterminer si l'ARN codant pour l'aromatase (enzyme qui convertit les androgènes en œstrogènes, cf Chapitre 10) est présent chez des individus dont les gonades sont encore (histologiquement) indifférenciées, mais proviennent d'une population supposée produire une majorité de femelles. Pour cela un total de 29 anguilles de taille comprise entre 15 et 28 cm ont été prélevées par pêche électrique avec l'appui technique de l'U3E de Rennes dans la rivière Oir (ORE Petits Fleuves Côtiers, 48°37'N, 1°17'W) connue pour produire plus de 80% de femelles (Acou *et al.* 2009).

Préparation des échantillons pour l'expression du gène codant pour l'aromatase

Les gonades des 17 individus⁷ de plus de 20 cm ont été prélevées afin de quantifier l'expression du gène codant pour l'aromatase. Une gonade était utilisée pour l'extraction des ARN totaux et l'autre gonade était utilisée pour le sexage histologique (cf Chapitre 10).

⁷ Trois des individus présentaient les nématodes *Anguillicola crassus*, dans leur vessie natatoire

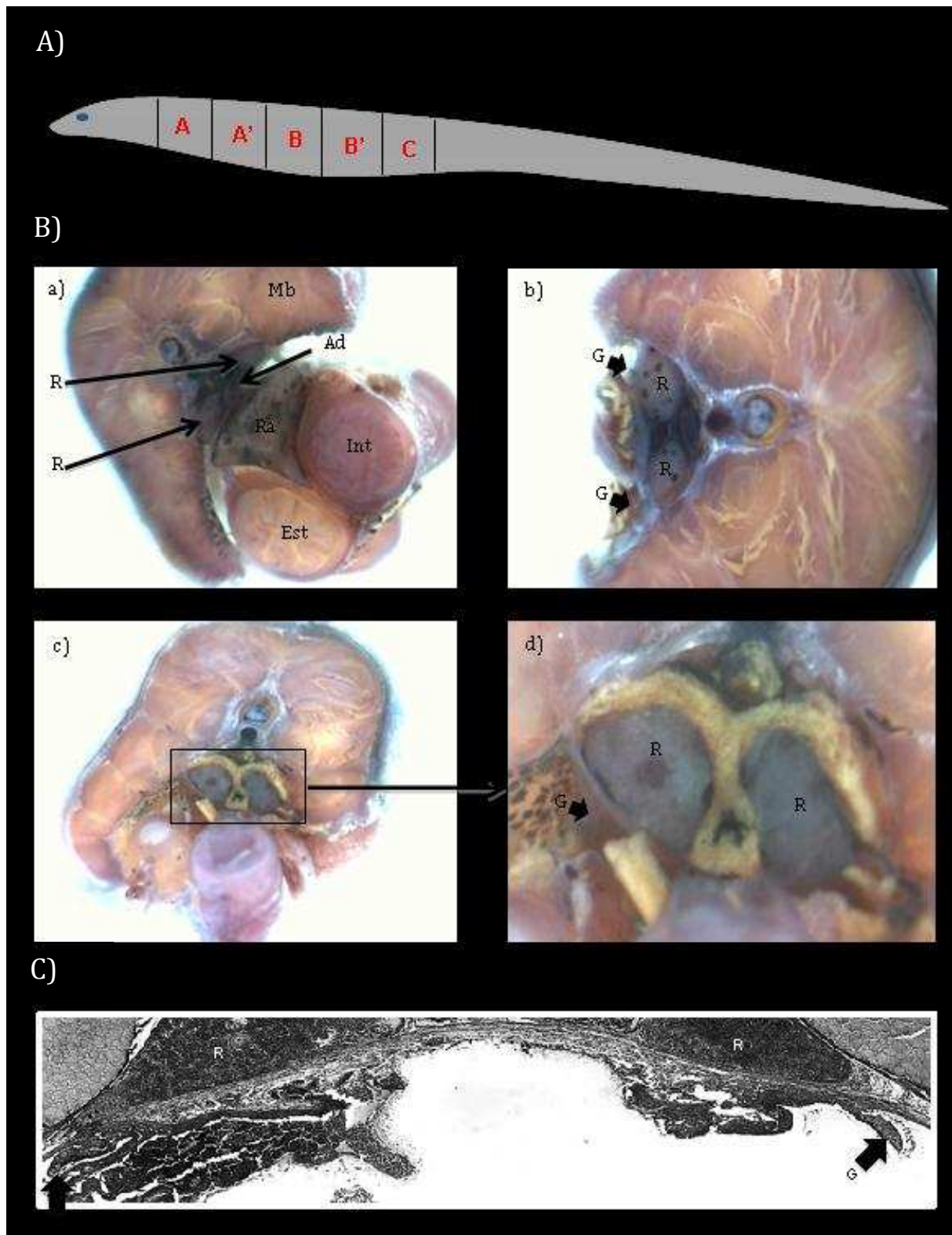


Fig. 49. A) Schéma des Tronçons d'anguillettes provenant de la rivière Oir. B) Tronçons d'anguillettes a) B de l'individu de 15,3 cm et 5,31 gr ; b) C de l'individu de 19,9 cm et 12,22 gr ; c) C de l'individu de 15,3 cm et 5,31 gr et d) agrandissement de c). C) Coupe transversale d'une anguille présentant les 2 gonades. Ad Aorte dorsale, Est Estomac, G Gonade, Int Intestin, Mb Muscle blanc, R Rein, Ra Rate.

Préparation des échantillons pour l'hybridation *in situ*

Dans la mesure où il s'est avéré très difficile de prélever les gonades de petits individus (< 20 cm), une expérience d'hybridation *in situ* a été mise au point afin de savoir si l'aromatase était exprimée chez des jeunes stades d'anguille chez qui l'épaisseur maximale de la gonade est de 300 µm (à titre de comparaison, l'épaisseur d'un cheveu est \approx 100 µm). Les douze anguilles⁸ restantes ont donc servi à cette étude. Après avoir été pesées, mesurées et disséquées, elles ont été soumises à une dose létale de benzocaïne (2 ml/l of water).

Chez les plus gros individus, la majorité des viscères a été enlevé afin de permettre à la sonde ARN (voir ci-après pour la synthèse de la sonde) de mieux pénétrer la gonade. Les individus sont découpés en 3 tronçons A, B et C (Fig. 49 A), qui serviront à l'hybridation *in situ*.

Les tronçons intermédiaires (A' et B') sont conservés pour l'analyse histologique. Chaque tronçon (A, B et C) est placé dans 50 ml de paraformaldéhyde (PAF, Electron Microscopy Sciences) à 4% dilué dans du PBS, puis immergé dans le fixateur pendant une nuit à 4°C dans des tubes stériles. Les échantillons sont ensuite rincés dans du méthanol et placés dans 24 puits contenant du méthanol (Fig. 50). Cette plaque est conservée à -20°C jusqu'au moment de l'hybridation.

Sous clonage pour sonde ARNm

Les ARN totaux de deux ovaires prélevés sur des anguilles pêchés en milieu naturel sont extraits à l'aide de Tri Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH). Les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus suite à une transcription inverse (cf Chapitre 10 pour plus de détails dans l'article). Ces ADNc sont ensuite amplifiés par polymérase chain reaction (PCR) en utilisant les amorces constitués avec le logiciel Primer3 (Rozen et Skaletsky, 2000) à partir de la séquence de l'aromatase décrite par Tzchori *et al.* (2004). Deux types d'amorces ont été constitués et validés lors d'une étude préliminaire (Fig. 51) afin d'amplifier des fragments de différentes longueurs (901pb et 545pb, Tableau 3). La PCR est réalisée avec 1.25 µl de Tampon x 10, 0.125 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase, 0.125 µl de dNTP (25 mM chaque), 0.5 µl d'amorces, 2µl de cDNA dilué 25x et 8.5 µl d'eau DEPC. Quarante cycles sont ensuite réalisés : Dénaturation, 1 minute à 95°C, puis 30 secondes à 60°C pour la fusion des amorces et 1 minute 30 à 72°C pour l'élongation.

⁸ Deux des individus présentaient les nématodes *Anguillicola crassus*, dans leur vessie natatoire.

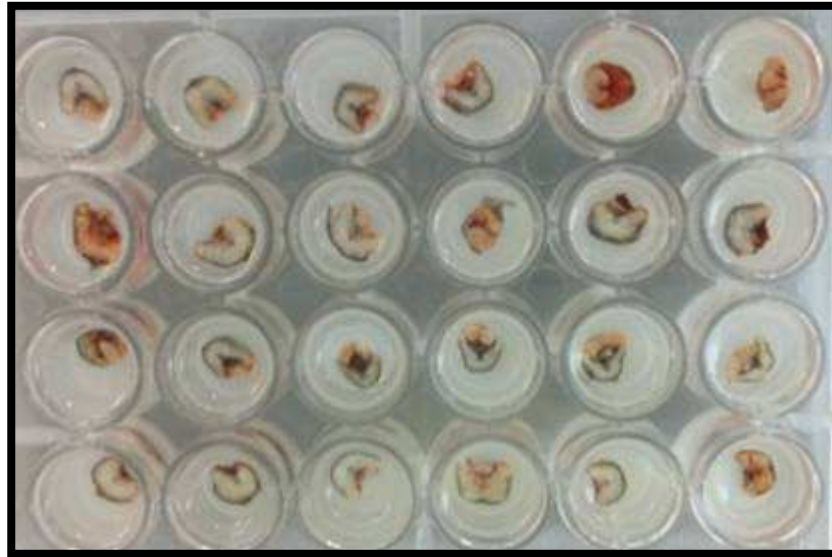


Fig. 50. Plaque contenant les 3 différents tronçons de 8 anguilles.

Nom	Amorces (5'-3')	Taille amplicon (pb)
S2	ggagacgatcatccttagcaggt	901
AS2	gttcgttccttgaaaaccttgt	
S2	ggagacgatcatccttagcaggt	545
AS1	atgcagcatcatccagcttctc	

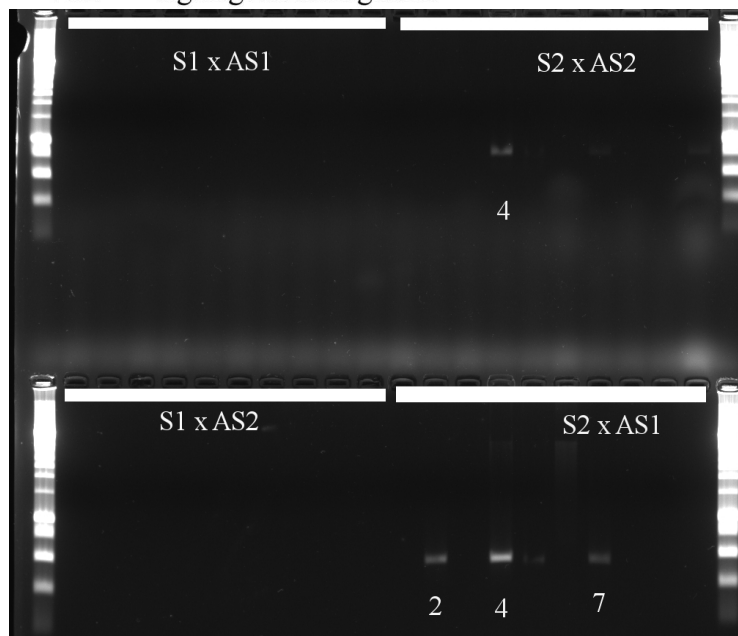


Fig. 51. Amorces utilisées et migration sur gel des amplicons PCR. Les numéros correspondent aux individus collectés pour l'étude préliminaire.

Ligation

Les amplicons obtenus sont ligués dans un plasmide pGEM[®]-T easy Vector (Promega). Pour cela 1.5 µl de produit PCR sont ajoutés à 2.5 µl de rapid ligation buffer 2x, T4 DNA ligase, 0.5 µl de pGEM[®]-T Easy Vector (50 ng) et 0.5 µl de T4 DNA ligase (3 Weiss units/µl) dans des tubes de 0.5 ml laissés 1 heure à incuber à température ambiante. La description du vecteur de clonage est représentée Fig. 52. Ce vecteur possède 2 sites d'initiation de la transcription SP6/T7 qui permettent d'obtenir des amorces sens et antisens.

Transformation

Les tubes sont centrifugés et 3µl de chaque produit de ligation sont ajoutés dans des tubes stériles de 1.5 ml en présence 50 µl de bactéries *Escherichia coli* thermo-compétentes (One Shot[®] TOP10 Invitrogen). Puis, les tubes sont incubés sur glace pendant 20 minutes et placés dans un bain-marie à 42°C pendant 45 secondes (dans le but de déstabiliser les membranes plasmiques des bactéries pour permettre la pénétration des plasmides). A la suite du bain-marie, les tubes sont aussitôt remis sur glace 2 minutes. Le mélange obtenu est complété avec 250 µl de médium S.O.C. (ajouté sous hotte), et incubé 1 heure à 37°C sous agitation. Les bactéries sont placées dans des boîtes de pétrie contenant le milieu de culture suivant : Luria Bertani (LB)/ampicilline/IPTG/X-Gal et mises à incuber pendant une nuit à 37°C.

Des colonies blanches et bleues sont obtenues dans chaque boîte de pétrie. Seules les colonies blanches sont récupérées car elles n'expriment pas le gène *lacZ*, ce qui laisse supposer qu'elles ont inclus le fragment d'ADN d'intérêt. Les bactéries non résistantes à l'ampicilline sont théoriquement mortes, n'ayant pas inclus les plasmides avec le gène de résistance à l'ampicilline Amp^r.

Les bactéries sont re-suspendues dans des tubes de 14 ml contenant 6 ml de milieu Luria Bertani (LB) avec ampicilline (1µl/ml) maintenue sous agitation à 37°C toute une nuit. Une PCR est ensuite réalisée afin de savoir si ces bactéries ont bien inclus l'insert. La PCR est réalisée avec 1.25 µl de Tampon x 10, 0.125 µl de Jump start Taq DNA Polymerase, 0.125 µl de dNTP (25 mM chaque), 0.5 µl d'amorces, 1 µl de bactéries et 8.5 µl d'eau DEPC. Trente cinq cycles sont ensuite réalisés : Dénaturation, 1 minute à 95°C, puis 30 secondes à 60°C pour la fusion des amorces et 1 minute 30 secondes à 72°C pour chaque cycle. Le produit de PCR est ensuite mis à migrer sur gel d'agarose. Deux bandes d'environ 545 pb ont été

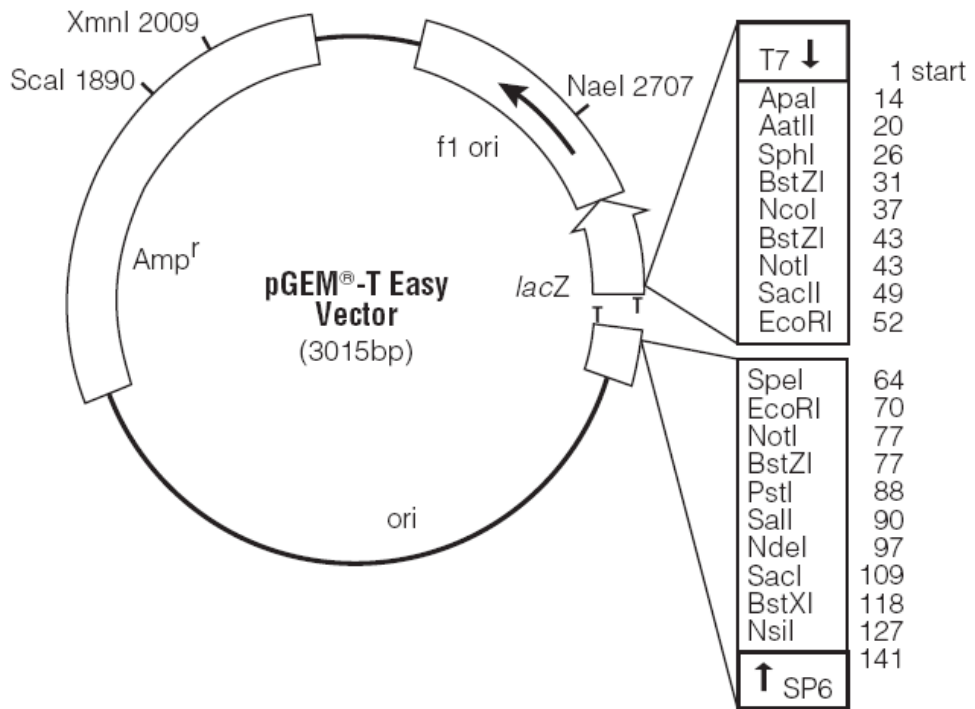


Fig. 52. Schéma représentant les caractéristiques du vecteur de clonage utilisé avec les sites d'initiation de transcription SP6/T7.

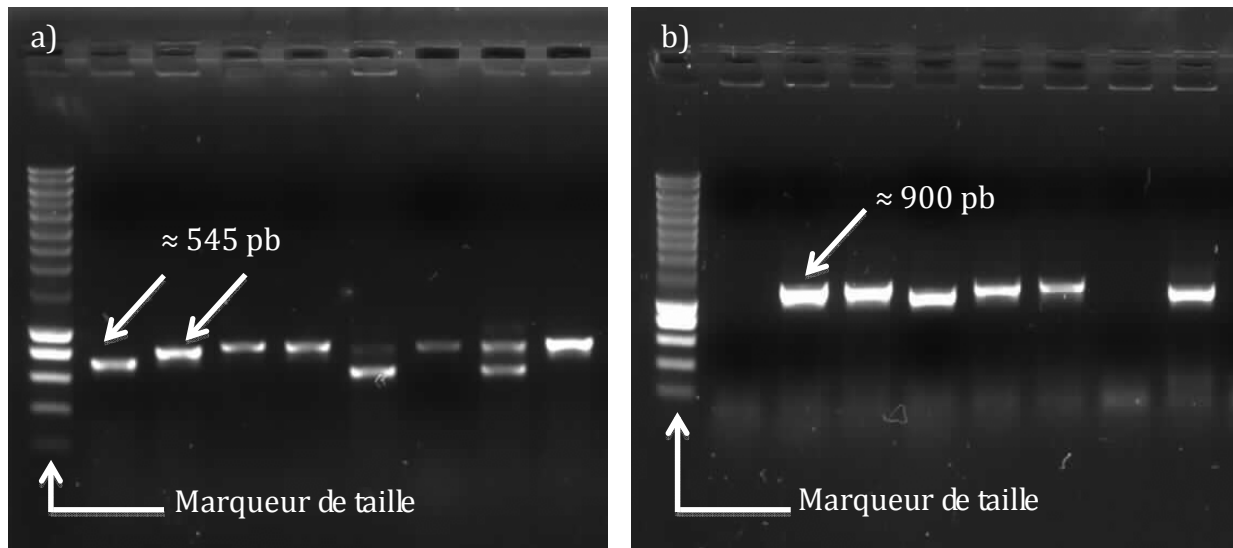


Fig. 53. Migration sur gel d'agarose à partir des colonies obtenues en utilisant a) la sonde 545 pb et b) la sonde 900 pb. A noter que 2 bandes sont présentes pour les colonies 545pb.

obtenues pour la « petite sonde S2/AS1 » (Fig. 53a) et une seule bande d'environ 900 pb est obtenue pour la « grosse sonde S2/AS2 » (Fig. 53b).

Extraction du clone de la Bactérie

Pour cela, le kit NucleoSpin® Plasmid DNA purification (Macherzy-Nagel) est utilisé.

L'extraction du clone comprend plusieurs étapes :

- Centrifugation des cultures bactériennes (tubes de 2 ml) à 11000g pendant 30 secondes
- Le surnageant est enlevé et le culot re-suspendu dans 200 ml de buffer A1
- Ajout de 200µl de Buffer A2
- Mélange délicat par inversement des tubes
- Incubation à température ambiante 5 minutes afin que s'effectue la lyse
- Ajout de 240 µl de Buffer A3 et mélange délicat par inversement des tubes
- Centrifugation des tubes 10 min à 11000g
- Récupération du surnageant et transfère sur colonne Nucleospin Plasmid
- Centrifugation des tubes à 11000g pendant 1 minute
- Ajout de 500µl de tampon AW dans la colonne et centrifugation 1 minute à 11000g
- Ajout de 600 µl de tampon A4 et centrifugation durant 1 minute à 11000g
- Séchage de la membrane en silicate par centrifugation 2 minutes à 11000g
- Ajout de 50 µl de tampon AE incubé 1 minute à température ambiante
- Centrifugation 1 minute à 11000g et récupération des plasmides.

Les plasmides contenant les inserts de 3 tailles (2 d'environ 545 pb et 1 d'environ 900 pb) sont envoyés au séquençage afin de connaître le sens d'insertion des fragments d'ADN. Seules les colonies correspondant aux tailles de fragments attendus (545 pb et 900pb) sont conservées.

Extraction de l'insert du vecteur par PCR

La concentration en ADN est mesurée à 260 nm au NanoDrop 1000 Spectrophotometer en vue d'effectuer une PCR (5 µl tampon, 0.5 µl Jump start Taq DNA Polymerase, 0.5 µl dNTP, 2 µl amorces sens et antisens et 4 µl ADN) sur ces plasmides avec 100ng/µl d'ADN. Le cycle de PCR débute par 1 minute à 95°C suivie de 35 cycles : Dénaturation, 30 secondes à 95°C,

Réactifs	Quantité (µl)
rARP (10mM)	4
rCTP (10mM)	4
rGTP (10mM)	4
rUTP (10mM)	2,6
xUTP = digoxigenine	1,4
Tampon (5x)	8
DTT (100 mM)	4
RNAsine	1
Eau RNase free	5,8 ou 5,65
Polymerase (T7 ou SP6)	2,2 ou 2,35
ADN	3

Tableau 12 : Composition du mix permettant l'élaboration de la sonde-dig.

puis 30 secondes à 60°C pour la fusion des amorces et 3 minutes à 72°C pour chaque cycle. Le cycle se finit avec 10 minutes à 72°C.

Synthèse de la sonde-dig ARN

A partir des inserts ADN, les sondes anti-sens ARN sont synthétisées grâce à une enzyme polymérase spécifique : SP6 pour la sonde de 901 pb et T7 pour la sonde de 545 pb (Kit Promega, Riboprobe in vitro transcription system). La composition du mix permettant l'élaboration de la sonde-dig est indiquée dans le tableau 12.

La digoxigénine-UTP (Roche) est utilisée comme marqueur de l'uracile. La digoxigénine est ensuite reconnue par un anticorps (DigA) qui est une protéine synthétique de type anticorps. Cet anticorps est couplé à un marqueur fluorescent (dye) qui émet une lumière dont la longueur d'onde est dans le violet.

Le mix est incubé 2 heures à 37°C, puis :

- Ajout de 1 µl de DNaseRQ1 et de 1 µl de RNAsine
- Incubation 15 minutes à 37°C
- Ajout de 40 µl d'eau RNase free, 40 µl Acétate d'ammonium (7,5 M, 4°C) et 300 µl d'éthanol 100 % (-20°C)
- Incubation 2 heures à -20°C
- Centrifugation 45 minutes à 14000 g à 4°C
- Elimination du surnageant
- Ajout d'1 ml d'éthanol à 70% (-20°C)
- Centrifugation 15 minutes à 14000 g à 4°C
- Elimination du surnageant
- Les culots sont séchés pendant 2 minutes au bain-marie à 37°C
- Les culots sont suspendus dans 50 µl et 1 µl de RNAsine

La quantité d'ARN est mesurée à 280 nm au NanoDrop 1000 Spectrophotometer. La concentration en ARN de la sonde-dig correspondant au fragment de 901pb était de 600 ng/µl.

Protocole d'hybridation

L'hybridation *in situ* est réalisée par le robot In Situ Pro VS (Intavis, Köln, Allemagne). Les échantillons sont tout d'abord progressivement réhydratés dans du PBS-T (Phosphate Buffer Salin à 0.01 M/pH 7,4 avec Tween 0,1%) à température ambiante. Le démasquage est effectué avec une solution de protéinase K (25 µg/ml) pendant 20 minutes à 37°C et est stoppé par ajout de PBS-T/Glycine (2mg/ml). Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois pendant 20 minutes dans du PBS-T et fixés dans du PAF/PBS à 4 % pendant 20 minutes. Puis les tronçons sont placés dans du tampon de pré-hybridation (formamide à 50%, SSC 5x, 0,1 Tween 20, héparine à 0.005 % et ARNt de levure à 0,1 mg/ml eau DEPC) deux fois 1 heure à 65°C. L'hybridation est effectuée à 65°C pendant 16 heures dans du tampon d'hybridation contenant 1 µg/ml de la sonde-dig préalablement synthétisée.

Les échantillons sont successivement rincés dans du formamide à 50%/SSC 2x dans de l'eau DEPC à 65°C, puis dans du SSC 2x/1% Tween 20 à 55°C et du SSC 0,2x/1% Tween 20 à 55°C. Enfin, ils sont rincés 4 fois 30 minutes dans du PBS-T à température ambiante et incubés pendant 1 heure dans une solution bloquante (Serum ovin 2%, 0,2% Tween 20, 0,2% Triton X100 dans du PBS). Le signal de la digoxygénine est révélé par des anticorps anti-digoxygénine couplés à une phosphatase alcaline à 1/2000^{ème} (Roche, n°1093274) pendant 5 heures. Les échantillons sont rincés 4 fois durant 40 minutes dans du PBS-T et placés 3 fois 30 minutes dans du tampon de coloration (120 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 120 mM Tris à pH 9.5 dilué dans de l'eau DEPC).

Pour l'étape de révélation de la coloration, les échantillons sont incubés dans le noir avec une solution de BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Roche 3.5 µl/ml), substrat de la phosphatase alcaline / NBT (Nitro Blue Tetrazolium, Roche 4.5 µl/ml), chromogène se liant au BCIP. Cette étape de révélation du marquage s'effectue sous contrôle (observation régulière des tronçons sous binoculaire) afin d'éviter la présence de bruit de fond lié au marquage aspécifique de certaines molécules. Après 8 heures, les tronçons sont rincés dans du PBS (3 fois), post-fixés dans du PAF 4%/PBS et à nouveau rincés (3 fois) dans du PBS.

Chaque tronçon est inclus dans la paraffine et des coupes de 5 µm sont réalisées. Les coupes sont placées sur des lames et déparaffinées. Une fois cette étape terminée, les lamelles sont montées sur les lames à l'aide de Mowiol (Tris-MWL 4-88) contenant du liquide de Hoechst (1µl/ml, agent fluorescent qui marque l'ADN des cellules en bleu).

Chapitre 6

Synthèse Article 5 : Nouveau regard sur le développement de la gonade chez l'anguille Européenne : mise en évidence d'une différenciation ovarienne directe

Questions: L'aromatase (enzyme qui convertit les androgènes en œstrogènes) est-elle plus exprimée dans les gonades femelles que dans les gonades mâles et intersexuées ? Si oui, dans quelle mesure ? Cette différence d'expression est-elle liée au stade de développement de l'ovaire ? L'aromatase peut-elle être un marqueur précoce du sexe chez l'anguille ?

Résultats: L'aromatase est plus exprimée dans les gonades femelles que dans les gonades mâles et intersexuées. Son expression varie en fonction du stade de développement de l'ovaire, avec un pic marqué lorsque les ovocytes ne sont pas de taille homogène et que de nombreux nids de méiocytes sont visibles. De plus, l'aromatase est fortement exprimée dans des gonades histologiquement indifférenciées d'individus supposés devenir femelles (provenant de la rivière Oir > 80% femelles). Contrairement à ce qui est rapporté dans la bibliographie, certains individus pourraient devenir mâles sans passer par un stade intersexué. Il semble également très peu probable que des gonades passant par un stade intersexué se développent en ovaire. Concernant les très petits individus (< 20 cm), un seul individu (sur 8) présente un signal positif indiquant une hybridation de la sonde (antisens) complémentaire de l'ARN codant pour l'aromatase. Ce résultat est un premier pas pour la faisabilité d'une telle étude.

Conclusion: L'étude approfondie des différents stades de développement de la gonade chez l'anguille permet de proposer un nouveau schéma de différenciation sexuelle chez cette espèce. De plus l'aromatase pourrait, dans l'avenir, servir de marqueur précoce du sexe et ainsi permettre aux gestionnaires d'estimer la production des rivières en futur géniteurs. Néanmoins d'autres analyses sont nécessaires pour confirmer ces résultats (*e.g.* dans une rivière sex-biaisé mâle et en utilisant d'autres marqueurs précoces du sexe).

New insights regarding gonad development in European eel: evidence for a direct ovarian differentiation.

Benjamin Geffroy ^{a,b}, Yann Guiguen ^c, Alexis Fostier ^c, Agnès Bardonne ^{a,b*}

(Fish Physiology and Biochemistry, Accepted avec modifications)

^aINRA, UMR 1224 Ecobiop, Pôle d'Hydrobiologie, Quartier Ibarron, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France

^bUPPA, UMR 1224 Ecobiop, UFR des Sciences de la Côte Basque, allée du parc Montaury, 64600 Anglet, France

^cINRA, UR1037 LPGP, Fish Physiology and Genomics, Campus de Beaulieu, F-35000 Rennes, France

*Corresponding author Address: INRA, UMR 1224 Ecobiop, Pôle d'Hydrobiologie, Quartier Ibarron, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France. e-mail : bardonne@st-pee.inra.fr

Fax : +33 (0) 5 59 54 51 52 Tel : +33 (0) 5 59 5159 73

Abstract:

In European eel, it has been proposed that the undifferentiated gonad would develop into either an intersexual stage (Syrski organ) or directly into an ovary. The Syrski organ could then develop into either an ovary or a testis. In the present study glass eels were raised until they reached a minimum size of 29 cm for sex histological assessment. In addition, some undifferentiated individuals with size encompassing 15 to 28 cm were sampled in a female-biased population (Oir River). We also investigated aromatase gene expression, which is known to be involved in the process of fish sex differentiation. Gonad histology revealed that intersexual eels were characterized by a small number of oocytes within a predominant testis-like structure. Males were significantly smaller than intersexual eels, which suggests that all males do not necessarily pass through an intermediate intersexual stage. Aromatase transcript levels in intersexual eels gonads and testes were similar but significantly lower than in ovaries, and were comparable between ovaries and undifferentiated gonads from the female-biased population. In addition, condition factor was lower in female than in intersexual individuals. Together, these results provide evidence that ovaries would not develop from the Syrski organ.

Keywords: Aromatase, Sex, European Eel, Gonad development, Growth.

Introduction

Among vertebrates, teleost fish represent a group where plasticity in sex differentiation is great. Factors as different as temperature, pH, density or social interaction were shown to influence sex differentiation (reviewed in Devlin and Nagahama, 2002). From an evolutionary perspective, the degree of fish sex lability would not be related to its taxonomical position but would change in relation to life history strategies and/or specific environmental characteristics (Mank et al. 2006). According to theory, in a panmictic species such as eel, selection pressures are likely to favour an environmental sex determination (ESD). Indeed, theory predicts that such determination occurs when offspring have no control on the type of environment they will encounter, and where one sex may confer an advantage over the other to adapt to this new environment (Charnov and Bull, 1977). In eel, field and laboratory data have led to the conclusion that the density of individuals is the main factor affecting sex differentiation, with crowding favouring maleness (reviewed in Davey and Jellyman, 2005). According to Colombo et al. (1984), the period of sex differentiation is not age dependent but rather size dependent and mathematical models estimated that this process occurs between 20 and 27 cm depending on fish provenance (Melià et al. 2006). The pattern of gonad development remains a matter of debate since an ambisexual organ was discovered in eel by Dr. Szymon Syrski (Syrski, 1874) and confirmed a few years later by Dr Sigmund Freud (Freud, 1877). Afterwards, many authors provided different interpretations concerning this intersexual stage. D'ancona (1950) and Kuhlmann (1975) suggested that the gonad pass through a transitory intersexual stage that develops progressively into a male or female gonad, whilst Bienartz et al. (1981) concluded that a juvenile intersexual stage does not occur. In an intensive investigation Colombo and Grandi (1996) suggested that the undifferentiated gonad might develop directly into an ovary or go through a testis-like ambisexual gonad called Syrski organ containing both male and female structures. According to them, the Syrski organ could then develop into an ovary or a testis. The most recent histological study conducted by Beullens et al. (1997 a,b) is in agreement with Colombo and Grandi (1996) despite the fact that they concluded that the transition from an intersexual gonad into an ovary would be quite unlikely. In all cases, little is known about the physiological processes that accompany morphological changes of the gonad. The ovarian aromatase (Cyp19a1a) plays a crucial role in sex differentiation and sex change in fish (Guiguen et al. 2010) since this enzyme is responsible for 17β -estradiol production through the catalysed conversion of androgens to oestrogens.

For instance, *cyp19a1a* gene is 10 to 100 times more expressed in females than in males rainbow trout's gonad (*Oncorhynchus mykiss*), long before any evidence of sexual differentiation based on histological criteria (Vizziano et al. 2007). In European eels, aromatase was immunolocalized with an antibody rose against a peptide mapping near the C-terminus of the human CYP19 in the gonad of some undifferentiated fish, in ovary as well as in the head kidney, but was absent in testes (Grandi et al. 2010). The gene encoding the aromatase was cloned in the Japanese eel *Anguilla japonica* (Ijiri et al. 2003) and the European eel *Anguilla anguilla* (Tzchori et al. 2004). Only one form of aromatase was detected in the European eel (Tzchori et al. 2004) and the Japanese eel (Jeng et al. 2012). In *Anguilla anguilla*, differential expression of aromatase according to sex has only been studied by Tzchori et al. (2004), who showed that *cyp19a1* gene expression was higher in adult females than in adult males. Concerning the temporal dynamics of aromatase in ovaries, *cyp19a1* gene expression appeared to fluctuate in late stages of oogenesis (from the oil droplet stage to the post-ovulated ovary) with a peak at the migratory nucleus stage in *Anguilla japonica* hormonally stimulated (Ijiri et al. 2003). However nothing is known concerning aromatase gene expression during the early stages of gonad differentiation. The goal of the present study was to investigate the histological processes of gonad development in eel and the dynamics of aromatase gene expression in the different gonadal types. In addition, we measured aromatase gene expression in undifferentiated gonads of a female biased population (Oir River).

Materiel and Methods

Animals

All works herein complies with current European and French national laws on the handling of animals. On March 26th 2009, 1400 glass eels were captured by professional fishermen at the entrance of the courant d'Huchet estuary (Molliet, South-Western France, 43°51' N, 1°23' W), and were immediately transferred to INRA experimental station. All eels were raised in 15 tanks supplied with thermo-regulated water ($17 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and fed with an artificial eel diet (Biomar, Dan-Ex). In February 2011, the 4 largest fish of each tank were anaesthetized and then killed with a lethal dose of benzocaine (2 ml/l of water), measured to the nearest millimetre and weighed (Sartorius CP 153 balance, ± 1 mg). Gonads were removed, the left one was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

The right gonad was put into Bouin's fluid for histological analysis. Macroscopically, two types of gonad were found based on Kuhlmann's description (1975): female's gonad referred as "frilled organ" and male's gonad referred as small "lobes". From this macroscopic description, only 5 females were detected during the first sampling. A larger sampling was conducted in July 2011 to obtain a greater number of females. From this second sampling, a total of forty-eight gonads were selected because they looked like a "frilled organ" or because it was difficult to assess the sex by macroscopic observation. A few males were also randomly chosen after the macroscopic observation of their gonads to measure the aromatase gene expression. The protocol for gonad sampling was the same than in February 2011.

On June 15th 2011, 29 eels measuring between 15 and 28 cm were caught in the Oir river (48°37'N, 1°17' W) known to produce over 80% of females (Acou et al. 2009). Among them, eels from 20 to 28 cm long were subjected to the same protocol for gonad sampling than described above. Concerning the 12 elvers (i.e. young's eels) shorter than 20 cm, the whole animal was sectioned in 2 parts of 1 cm each for histological analysis only, because gonad was not detectable by macroscopical examination.

Histology

Gonads and eels sections were fixed in Bouin's fluid for 6 to 8 hours, rinsed in clear water for 1 hour and stocked in a 10 % formaldehyde solution. Each gonad or eel section was dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 5-6µm thickness were stained with Regaud's haematoxylin, Orange G and Aniline blue using an automat device (MICROM, HMS 760X) (Gabe, 1968).

RNA extraction and reverse transcription

Based on the histology of the left gonad, 70 right gonads (48 from July and 22 from February 2011 sampling) were selected for RNA analysis in order to achieve a group containing a balanced number of the three sexual categories: male, female and intersex (Table13). Gonads were crushed with a disperser (Ultra-Turrax, IKA). Total RNA was extracted using Tri Reagent (Molecular Research Centre, Cincinnati, OH) according to the manufacturer's instructions. An aliquot of each tube was diluted in diethylpyrocarbonate distilled water to reach the value of $180 \pm 17 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ RNA. Then, 1.8 µg of RNA were reverse transcribed using 200U Moloney murine Leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega) and 2 µg

	Groups symbols	Undifferentiated		Females		Intersex		Males	
		U1	U2	F1	F2	I1	I2	M1	M2
Sampling period and location	February INRA Facilities	/	/	2(1)	3(3)	10(5)	13(11)	20 (2)	12(0)
	July INRA Facilities	/	/	6(6)	11(11)	14(14)	1(1)	9(9)	7(7)
	June Oir River	12(0)	17(16+1*)	/	/	/	/	/	/

Table 13 : Number of eels sampled for each stage of gonadal development in the Oir River or after rearing in the INRA facilities. Numbers into brackets represent the number of eels used for the measurement of aromatase gene expression.* Gonad with few oocytes in meiosis.

Gene name	Gene symbol	Accession number	Primers (5'-3')
Aromatase	<i>Cyp19a1</i>	*	GGAAATCCTTGGAGGATGATGTC ^a TACGCCCAACATTAAGGATGATG ^b
Elongation Factor 1- α	<i>ef1-α</i>	EU407825	ATTGTGGGAGTCAACAAGATGGA ^a GCTGACTTCCTTGGTGATTCCT ^b
β -actin	<i>βact</i>	DQ286836	AATCCACGAGACCACCTTCAACT ^a TGATCTCTTCTGCATTCTGTCG ^b

Table 14: Accession numbers and specific primer pairs used in quantitative real-time PCR. Primers were designed using the software Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000). *Primers for *cyp19a* were based on the sequence described in Tzchori et al. (2004) for *Anguilla anguilla*. ^aUpstream primer; ^bForward primer.

random hexamers (Promega) in a master mix containing 2mM dNTPs, 50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, pH 8.3, and supplemented with 25U of RNase inhibitor (RNasin; Promega). Reverse transcription products were then diluted to 1:50 for quantitative real-time PCR (qPCR). The same protocol for RNA extraction was used for gonads of the 17 eels harvested in the Oir River, but due to their smaller size, reverse transcription was carried out with 0.5 µg of RNA.

Quantitative real-time PCR

Aromatase RNA abundance analysis was done using qPCR based on the published data on European eel aromatase (Tzchori et al. 2004; Table 14). Eighty-seven samples (70+17) of cDNA were analyzed, using a kit provided with a SYBR Green fluorophore (Fast SYBR Green Master Mix; Applied Biosystem). Each well contained 4 µl of each cDNA, 1µl of primers (diluted 10 times) and 5 µl of SYBR Green. The Real-time PCR was run with the Step One Plus system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The hot start enzyme was activated 20 sec at 95°C, then the amplification was carried out using the following cycle: 95°C for 3 sec; 60°C for 30 sec; 40 times. After amplification, a melting curve was obtained according to the following protocol: 10 sec holding followed by a 0.05°C increase, repeated 80 times, and starting at 55°C.

Eukaryotic elongation factor 1- α (*eef1 α*), which is a suitable reference gene for quantitative gene expression studies in fish (Bland et al. 2012) and β -actin (*β act*) also reported to be a suitable reference gene (Geffroy et al. 2012) were compared for their ability to be used as an internal standard to normalize the signal (primers sequence of reference genes are reported in Table 13). A random subsample of 30 cDNA was run in triplicate in order to test inter-samples variability for both references genes (*β act* and *eef1 α*). *Ef1 α* was twice more stable than β -actin (mean standard deviation *eef1 α* : 0.34 and *β act*: 0.78 CT) and used for normalization.

Data Analysis

Eels were classified in groups according to their gonad type and developmental stage. Kruskal-Wallis test, followed by Wilcoxon pairwise comparison tests, were used to assess differences in aromatase gene expression, length, weight and condition factor (CF = weight/length³) between these groups. The exponent value in weight-length relationship was settled at 3 according to previous data obtained in eels (Verreycken et al. 2011; Geffroy and

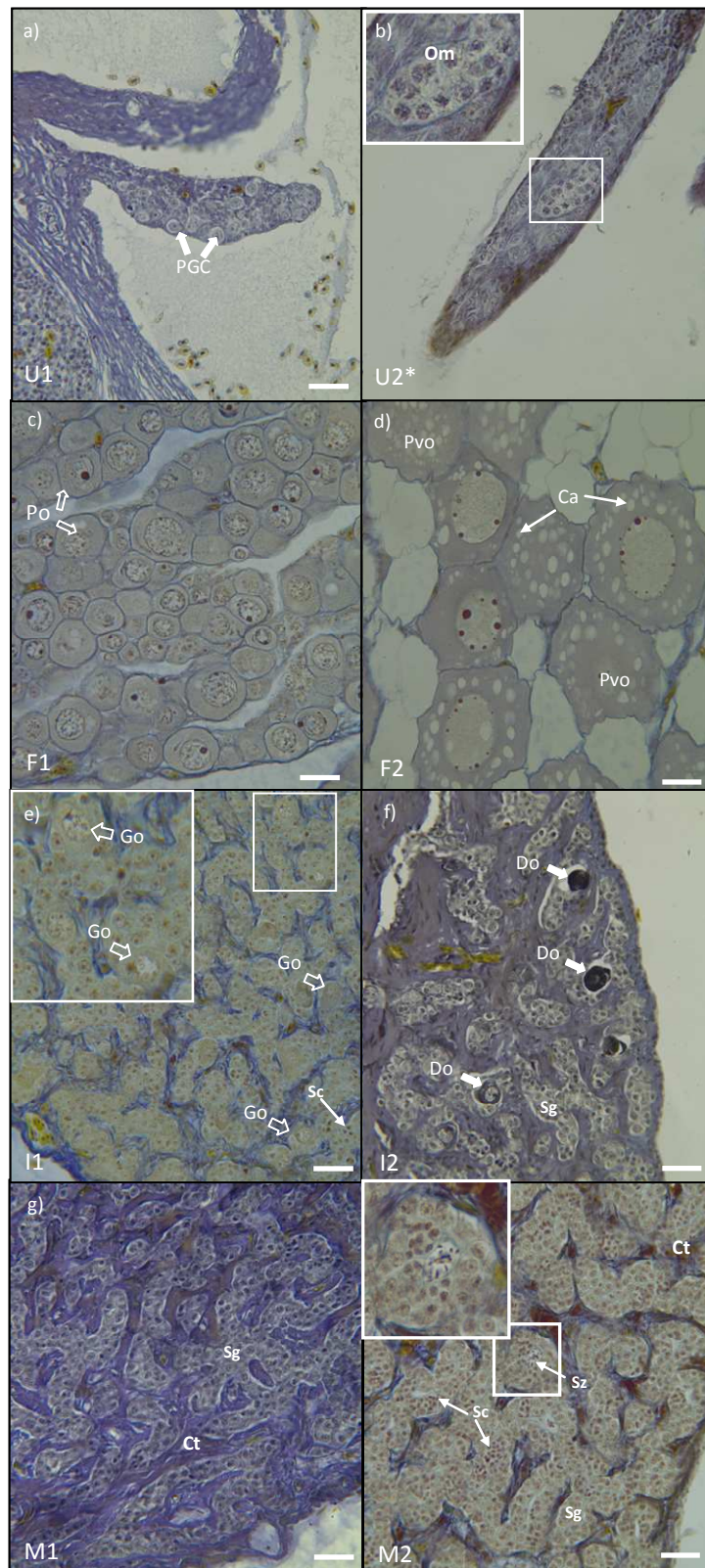


Fig. 54. Illustrations of the various development stages of eels' gonads. a) Undifferentiated gonad of a 16.3 cm long eel from the river Oir (U1 group) b) Gonad of a 22.6 cm long eel from the Oir (U2 group) c) Gonad of a 34.7 cm long eel from the F1 group d) Gonad of a 48.1 cm long eel from the F2 group e) Gonad of a 44 cm long eel from the I1 group f) Gonad of a 35.8 cm long eel from the I2 group g) Gonad of a 35 cm long eel from the M1 group h) Gonad of a 35.8 cm long eel from the M2 group. PGC, Primordial Germ Cell; Ct, Connective tissue; Do, Degenerating oocytes; Go, Growing oocytes; Sg, Spermatogonia; Sc, Spermatocytes; Sz, Spermatozoa; Po, Primary oocytes; Om, Oocytes in meiosis; Pvo, Previtellogenic oocytes (primary growth stage); Ca, Cortical alveoli. Scale bar : 30 μ m.

Bardonnnet, 2012). P-values were adjusted using the Holm method. Statistical analyses were performed using the R software (R Development Core and Team, 2009).

Results

Gonadal stage

Fifty-three percent of the 60 eels sacrificed during the first sampling were males, 39% were intersexual eels and only 8 % were females according to histological examination of gonads (Table 13). Among the 48 eels selected from the second sampling, 35 % were females, 33% were males and 31% were intersexual eels (Table 13). Gonads of all the eels from the Oir River with a size lower than 20 cm in length showed only primordial germ cells (PGC) and were classified as undifferentiated stage “U1”. The gonad cross-section of these eels contained between 13 and 45 PGC (Fig.54 a). Neither oogonia nor primary oocytes could be identified. Eels from the Oir River bigger than 20 cm were classified as undifferentiated stage “U2”. Among these 27 individuals, only one eel presented ovocytes in meiosis (Fig.54 b). This eel was however kept in this group for the statistical analysis of biometric and molecular data. Among fish from the rearing facilities, females were divided into 2 groups: “F1” showing gonads with germ cells ranging from oogonium stage to perinucleolus stage and less than 10 % of oocytes at the cortical alveoli stage (Fig.54 c); “F2” showing gonads with most of the oocytes at the cortical alveoli stage (Fig.54 d). The intersexual gonads were characterized by the presence of oocytes within a predominant male-like structure. Two kinds of intersexual gonads were recorded according to Kuhlmann (1975): those presenting only growing oocytes “I1” (Fig.54 e) and those presenting both growing and degenerating oocytes “I2” (Fig.54 f). Males were also divided into two groups: “M1” showing gonads containing cysts of spermatogonia embedded in compact connective tissue (Fig.54 g) and “M2” showing gonads with a similar structure to that described for the M1 group, but with some cysts containing spermatocytes (Fig.54 h). The number of eels for each developmental stage is given in Table 13.

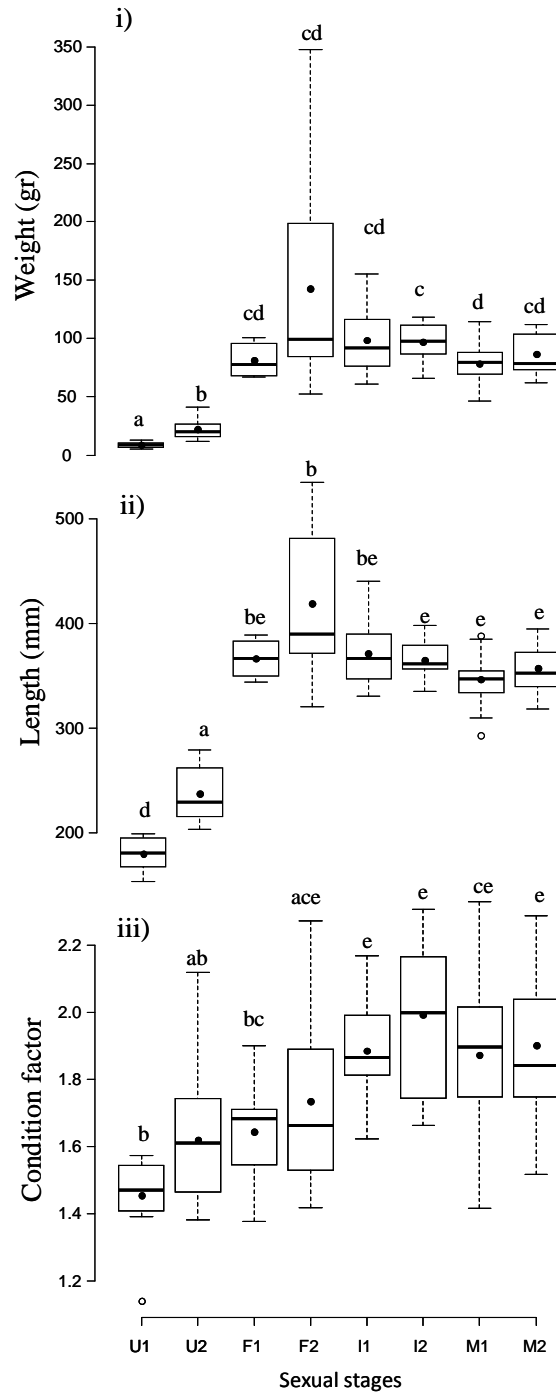


Fig. 55 i) Box and whisker plots of body weight (g) ii) length (mm) and iii) condition factor of the 137 eels killed for gonad examination. The interquartile range is represented by the box, the mean by the black circle, the median by the thick line and the outliers by open circles. The whiskers indicate maximum and minimum values. Significant differences between groups are indicated by different lower-case letters (Pairwise Wilcoxon test; $p < 0.05$). . "U1": undifferentiated eels 15 to 20 cm harvested in the Oir river, "U2": undifferentiated eels 20 to 28 cm harvested in the Oir river, "F1": Females with oogonias and less than 10% of oocytes at the cortical alveoli stage, "F2": Females with more than 90% of oocytes at the cortical alveoli stage, "I1": Intersexual eels with growing oocytes, "I2": Intersexual eels with both growing oocytes and degenerating oocytes, "M1": Males with spermatogonias, "M2": Males with spermatogonias and spermatoocytes.

Biometric features

Individual weight, length and condition factor were assigned to eels from each group. All eels from the rearing facilities were above 45 g body weight, with a narrow size distribution except for eels from the F2 group (Fig. 55). The smallest individual sampled in February was a male of the M1 group measuring 29 cm in length. Males from this group were slightly smaller than individuals from the I1 group ($p = 0.052$) and significantly lighter than eels from the I2 group ($p < 0.05$). The condition factor (CF) was significantly lower for females from the F1 group than for intersexual eels (I1 and I2) and males from the M2 group.

Aromatase gene expression

Transcripts abundance of ovarian aromatase gene (*cyp19a1*) relative to *eef1a* was significantly higher in gonads of both groups of female (F1, F2) when compared to male (M1, M2) and I1 intersex groups (Fig.56). Undifferentiated gonads from the U2 group exhibited a significantly higher relative *cyp19a1* expression level than any intersexual or male gonads, but did not differ significantly from the ovarian expression level. It can be noticed that the aromatase expression level of the gonad with few oocytes in meiosis was slightly higher than in other undifferentiated gonads, but was not classified outlier. In addition, differences between groups were still significant when this individual was discarded.

Discussion

Undifferentiated eels

The present study revealed that in a Brittany river (Oir river) almost all individuals with size encompassing 20 to 28 cm (except one) were still at an undifferentiated stage. Conversely, in Colombo and Grandi's study (1996) oocytes were found in some eels smaller than 20 cm. In their experiment, all gonads were differentiated after 22 cm. However, in a study conducted in North Wales Rivers, some eels of 36 cm were still at an undifferentiated stage while the smallest female identified was 23 cm long (Sinha and Jones, 1966). These authors suggested that sex differentiation might occur at different lengths according to their provenance, which has been further supported by mathematical models (Melià *et al.* 2006). The tardy gonad differentiation in the Oir River supports that length at differentiation could be higher at higher

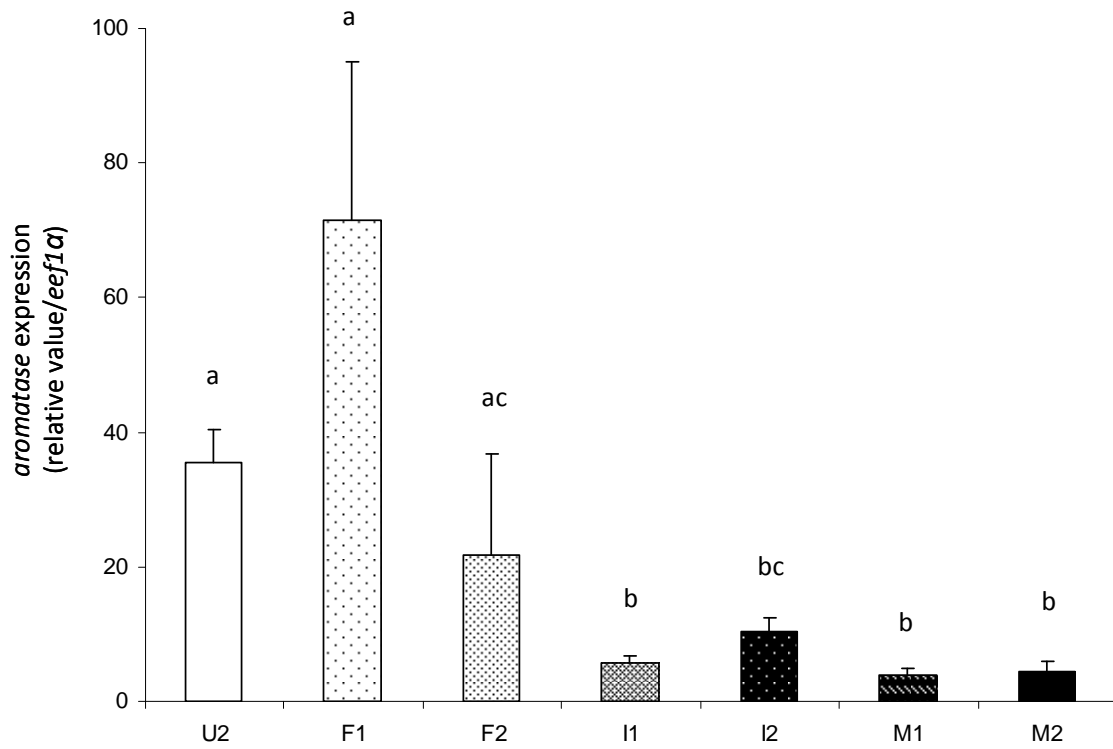


Fig. 56. Aromatase gene expression levels in gonads from the different groups of eels. Results (mean \pm standard error $p=0.05$) are represented through an arbitrary scale corresponding to the ratio between the expression of the specific gene and the eukaryotic elongation factor 1- α (eef1 α). Significant differences between groups are shown by different lowercase letters (Pairwise Wilcoxon test; $p < 0.05$. See Fig. 2. for groups symbols definition).

latitudes, where growing conditions are less favourable. Environmental conditions (temperature, production, water salinity) encountered by eels from the Italian lagoon might have induced a quicker gonadal development in relation with a more rapid growth, since both high temperature and brackish water have been reported to favour growth (Acou et al. 2003, Daverat et al 2012).

Intersexual eels

Variability in development was also observed in intersex gonads. Gonads of same-sized individuals could present either growing oocytes or degenerating oocytes in the so-called Syrski organ. However, these intersexual stages were characterized by the presence of a relatively small number of oocytes within a predominant testis-like structure. Intratesticular oocytes were identified in many gonochoristic species such as *Rutilus rutilus* (Jafri and Ensor, 1979), *Coregonus lavaretus* (Brown and Scott, 1988), *Phycis blennoides* (Rotllant et al. 2002) and *Dicentrarchus labrax* (Saillant et al. 2003). In this last study, 62% of males had testes including few oocytes while the other males did not show any sign of intersexuality. In the present experiment, many males were shorter and lighter than both groups of intersexual eels, at any sampling time (February or July). For instance, males from the first sampling were significantly smaller (mean length: 349 cm) than intersexual eels (mean length: 362 cm) sampled at the same time (T-Test, $p= 0.05$), suggesting that growth in length was higher for intersexual eels than for males. Interestingly, in the European sea bass, intersexual individuals were also significantly longer than males when the percentage of intersexual fish reached a peak (*i.e.* 191 days post-fertilization Saillant et al. 2003). Growth hormone (Gh) was shown to be a regulator of gonadal development in fish (Le Gac et al. 1993; Reinecke, 2010). The insulin-like growth factor-1 (Igf-1), secreted by various tissues in response to Gh, was also shown to stimulate gonadal steroid production (Lubzens et al. 2010). For instance, the Igf-1 was able to stimulate 17β -estradiol production by granulosa cells of the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Maestro et al. 1997). In addition, aromatase enzyme activity, as well as aromatase gene expression, was increased by Igf1 in the red sea bream ovaries (Kagawa et al. 2003) and trout ovarian follicle (Nakamura et al. 2003). It is noteworthy that in the present experiment, aromatase gene expression level was slightly higher in gonads of intersexual eels when compared to those of males, but differences were not significant. Thus, it is possible that higher growth rate was linked to the production of related growth factors (*i.e.* Gh or/and Igf1), which in turn acted by stimulating the differentiation of some primordial germ cells into

oocytes through an elevated 17β -estradiol production.

Males

The fact that most males were detected at a smaller size than most intersexual eels challenges the hypothesis of Colombo and Grandi (1996). These authors suggested that all males should develop through an intersexual stage because the threshold size of undifferentiated eels did not encompass that of males. However, the classification between intersexual and male gonad is confusing since

Grandi et al. (2000) classified some gonads as “Syrski organ” whereas no oogonia and/or oocytes were present. Similarly, Beullens et al. (1997a) classified some individuals as males, while growing oocytes were identified in their gonads. These two examples shed light on the different characteristics behind what is called a “Syrski organ”, making difficult comparison between studies. Nevertheless, and contrary to Colombo and Grandi (1996) proposal, present results suggest that males could differentiate directly from undifferentiated gonads. Besides problems in naming, it might be suggested that differences among studies in gonad development process might be somehow related to differences in growing pattern. In Colombo and Grandi (1996) and Beullens et al (1997a,b) studies, eels were raised at 24-25°C and most intersexual eels were smaller than males. Grandi et al. (2000) raised eels at 20-22°C and found some individuals with size encompassing 18-22 cm that presented a testis-like gonad without any sign of feminization. In the present study (eel raised at 17°C), most males were smaller than intersexual eels. All these observations suggest that in an environment favouring growth (such as high rearing temperature) the process of sex differentiation would occur earlier and an intersexual stage would always be observed, possibly in relation to the growth hormone hypothesis mentioned above. Eels reared under less favourable growing environments would differentiate at a larger size, and intersexual stage would not be obligatory. The widespread distribution of European eel certainly implies a great diversity in local production. This could result in very different growing patterns, which may explain diverse process in gonad differentiation.

Females

The condition factor (CF) of females appeared to be low when compared to other groups. This might be related to the fact that females were still at an early stage of development compared

to most males, when sacrificed. Indeed, the development process, from the yellow eel stage to the silver eel stage, is associated with an increase in CF (Durif et al. 2005). These differences in temporal energy investments between males and females throughout ontogenesis are likely linked to the different life history strategies of each sex, since males leave the watershed much earlier than females to reproduce (Tesh, 2003; Davey and Jellyman, 2005). The fact that the condition factor (CF) of intersexual eels was similar to that of males and significantly higher than the CF of females from the F1 group may indicate that these intersexual eels were in an early stage of the silvering process, alike males. In addition, the macroscopic appearance of the intersexual gonads was comparable to that of males and from an histological point of view, none of the developing female gonads from the F1 group presented signs of degenerated male tissue (which is in agreement with Beullens et al. (1997a) observations). From this evidence network, it is unlikely that in the present experiment ovary had developed from the intersexual stage.

Aromatase gene expression

Significant differences in aromatase gene expression between male and female gonads were found, in agreement with a previous study conducted on larger eels (Tzchori et al. 2004). These differences were within the range of what is observed in some other fish species (Guiguen et al., 1999; Trant et al. 2001; Barney et al. 2008; Liu et al. 2009; Rasheeda et al. 2010). High levels of aromatase expression are usually reported during the process of ovarian differentiation (reviewed in Guiguen et al. 2010). In the present experiment, aromatase gene expression was higher in gonads of eels expected to become females (U2 group) when compared to testes and intersexual gonads. This high aromatase gene expression level in the U2 group supports the evidence of a direct development from an undifferentiated gonad into an ovary, as suggested above. In some other fish species, higher levels of mRNA encoding aromatase were detected in females (or fish expected to be females), well before sex assessment through microscopic examination of the gonad (Trant et al. 2001; Luckenbach et al. 2005; Vizziano et al. 2007). When studying the temporal variation of aromatase in *Oreochromis mossambicus*, Esterhuysen et al. (2008) found that *cyp19a1* gene expression changed during ontogenesis. In the present experiment, the expression of *cyp19a1* also varied throughout ovary development, but differences between developmental stages were not significant. In addition, we did not detect any significant aromatase gene expression difference between male and intersexual gonads, while aromatase gene expression level was

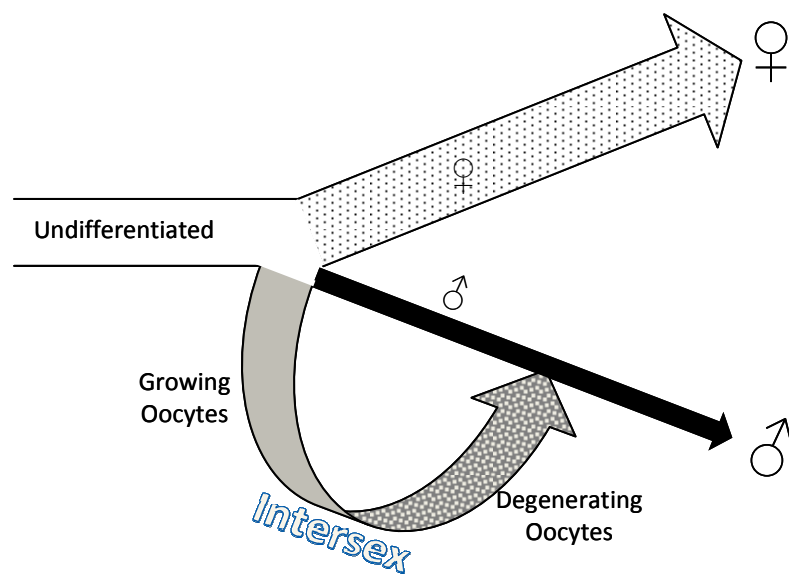


Fig. 57. Schematic illustration of gonadal development in eel. Male would differentiate either directly or through a Syrski organ. Female would differentiate directly from an undifferentiated stage.

significantly higher in ovaries than in gonads from the Intersex1 group. If these intersexual gonads presenting growing oocytes (I1 group) would develop into ovaries as proposed previously (Colombo and Grandi 1996), we might have expected a higher aromatase gene expression, *i.e.* comparable to those detected in ovaries (F1) or potentially developing ovaries (U2). This supports the evidence from histological observations that all intersexual gonads described in the present experiment will develop into male gonads.

Conclusion

Histological and endocrinal aspects investigated in the present study suggest a new possible scheme for eel gonadal development (Fig. 57). It differs from the one previously proposed by Colombo and Grandi (1996) but is rather close to the one proposed in sea bass *Dicentrarchus labrax* (Saillant et al. 2003). In this hypothetical model, male's gonad of the European eel would develop either directly from undifferentiated gonad tissue or through an intersexual organ containing growing oocytes that will degenerate (Fig. 57). Ovaries would develop directly from an undifferentiated gonad, since there is no endocrine or histological evidence for a female gonad development from the intersexual gonad.

Acknowledgements

B.G.'s PhD thesis was funded by from Univ Pau & Pays Adour (ED 211). We wish to thank Emmanuel Huchet, Jacques Rives and François Gueraud for their help in fish sampling. We are also grateful to the staff of the research unit 'Numéa' for their large support at different steps of the experiment, and to Elodie Jouanno, Chantal Cauty, Béatrice Collin and Claude Sevellec for their support in the histological and gene expression analysis. We also thank Valerie Thorburn Walton for English language corrections. The project was supported by funding from the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) and by the Interreg IV B Atlantic area transnational program (European Regional Development Fund), in the context of the Arc Atlantic Resource Conservation program (AARC).



Fig. 58. Résultats de l'hybridation in situ dans le tronçon B de l'anguillette (16 cm et 5 gr) prélevées dans l'Oir. Un marquage est visible sur la quasi-totalité des coupes du tronçon B. Echelle : 50 µm.

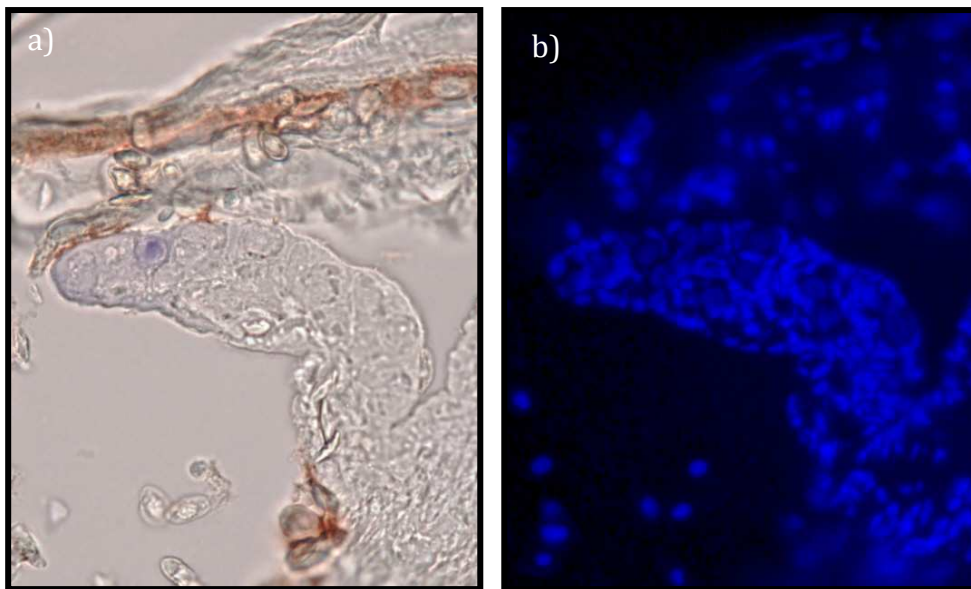


Fig. 59. Résultats de l'hybridation in situ dans le tronçon B de l'anguillette prélevées dans l'Oir de 16 cm et 5 gr. a) Un marquage est visible dans une cellule germinale, b) marquage au Hoechst, colorant l'ADN des noyaux.

Résultats Hybridation *in situ*

Les anguillettes de moins de 20 cm prélevées dans l'Oir ont été découpées en 5 tronçons de 1 cm. Comme décrit dans le Matériel et Méthodes, 2 tronçons ont servi à l'histologie et 3 tronçons ont été dédiés à l'hybridation *in situ* de la sonde ARNm de l'aromatase. Un premier test a été effectué sur 4 individus, mais un problème technique n'a pas permis d'obtenir des échantillons analysables. Un second test sur 8 échantillons s'est avéré plus concluant. Néanmoins, un seul individu présentait un marquage (Fig. 58) au niveau du tronçon B. Il convient de noter que les autres tronçons ne présentaient aucune trace de marquage. De plus, il paraît vraisemblable que pour une majorité d'échantillons, la pénétration de la sonde-dig a été empêchée par la présence de tissus collés à la gonade.

D'autres tests seraient nécessaires (en utilisant notamment une sonde sens), pour confirmer ou infirmer la présence d'ARNm codants pour l'aromatase dans les gonades d'anguillettes.

Il apparaît également que l'ARN codant pour l'aromatase est exprimé dans les cellules germinales primordiales (Fig 59). Ce résultat est paradoxal, car l'aromatase est généralement produite par les cellules somatiques stéroïdogènes.

Chapitre 7

Synthèse Article 6 : Cas insolites d'intersexualité tardive chez l'anguille Européenne, *Anguilla anguilla*

Ce chapitre concerne la découverte fortuite de 2 cas d'intersexualité très tardifs. Des individus présentant des gonades avec tous les stades de la spermatogénèse représentés et des ovocytes de toutes tailles, ont été observés. De plus, les niveaux d'expression du gène codant pour l'aromatase sont nettement plus importants dans ces gonades intersexuées que dans la majorité des gonades femelles. Cette découverte soulève de nombreuses questions sur les anguilliformes et sur la possible "auto-stimulation" conduisant au développement des 2 tissus sexuels.

Unusual cases of adult intersexuality in the European eel *Anguilla anguilla*

Geffroy B.^{a,b} Fostier A.^c Guiguen Y.^c Bardonne A.^{a,b*}

(*Sexual Development*, 2012, 6, 316-319)

^aINRA, UMR1224 Ecobiop, Pôle d'Hydrobiologie, Quartier Ibarron, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France

^bUPPA, UMR1224 Ecobiop, UFR des Sciences de la Côte Basque, allée du parc Montaury, 64600 Anglet, France

^cINRA, UR1037 LPGP, Fish Physiology and Genomics, SFR Biosit, Biogenouest, F-35000 Rennes, France

*Corresponding author Adress: INRA, UMR Ecobiop, Pôle d'Hydrobiologie, Quartier Ibarron, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France. e-mail : bardonne@st-pee.inra.fr

Fax : +33 (0) 5 59 54 51 52

Tel : +33 (0) 5 59 5159 73

Abstract

Two cases of intersexuality are reported for the first time in European eel, *Anguilla anguilla* (at the beginning of the silver eel stage), within 140 fish caught as glass eels in the south-west of France and reared in tanks at 17°C. Cysts containing spermatozoa were observed in ovaries with pre-vitellogenic oocytes. This feature is very uncommon, especially owing to the fact that male cells do not normally reach this stage in captivity, and an environmentally controlled transdifferentiation process may not be excluded. Besides, the expression of the gonadal aromatase gene (*cyp19a1a*) was found to be higher in these 2 intersexual fish compared to normal females although these results must be considered with caution since only 2 intersexual fish were available. A possible feminizing effect of this 'abnormal' up-regulation of aromatase is discussed.

Introduction

Genetic sex determination has been suggested in the 3 major species of temperate eels, i.e. *Anguilla anguilla*, *A. rostrata* and *A. japonica*, as in these species a pair of heteromorphic chromosomes has been observed in females [reviewed in Tesh, 2003]. Despite this feature, environmental factors can easily overcome genetic sex [Wiberg, 1983; Sola et al., 1984], pointing out the extreme lability of sex differentiation in eels.

At the juvenile stage, intersexuality was found to be common in the *Anguilla* genus [Colombo et al., 1984; Helfman et al., 1987; Kearney et al., 2011]. Indeed, both male and female gonad of the eel *A. Anguilla* can develop via a juvenile intersexual intermediate stage known as the Syrski organ. This organ is macroscopically similar to a developing testis but contains some degenerating or normal oocytes [Colombo and Grandi, 1996]. The ovary can also develop directly from the undifferentiated stage according to Colombo and Grandi [1996] and Beullens et al. [1997]. In the present study we found, in 2 adult specimens, ovarian and testicular tissues at an advanced stage of development in the same gonads. These fishes were called ‘adult intersexual’ eels (AI) in contrast to ‘juvenile intersexuality’ which has previously been described. In the past, few AI cases were identified in silver eel *A. dieffenbachii* [Lokman and Young, 1998] and *A. japonica* [Takahashi and Sugimoto, 1978; Takahashi, 1979; Satoh et al., 1992; Matsubara et al., 2008]. To the best of our knowledge, no such case has been reported for the European eel apart from Olivereau and Olivereau [1985] who described 2 intersexual cases in *A. anguilla* silver eels but only after a masculinizing 17 α -methyltestosterone treatment. In natural AI cases, male and female tissues were either separated [Takahashi and Sugimoto, 1978] or intermingled [Takahashi and Sugimoto, 1978; Takahashi, 1979; Satoh et al., 1992; Lokman and Young, 1998]. The AI European eels described in the present study were fortuitously identified during the course of a previous experiment aiming to compare aromatase gene expression between females, males and juvenile intersexual eels. Aromatase is involved in androgen conversion to estrogen and has been shown to be a key enzyme in ovarian differentiation [Guiguen et al., 2010]. Despite the fact that 2 separate aromatase genes, named *cyp19a1a* and *cyp19a1b*, have been identified in most teleosts, only a single gene, *cyp19a1a*, has been found in eels [Tzchori et al., 2004; Jeng et al., 2012]. In the present study, we describe 2 AI cases in *A. anguilla* and we also compare their gonadal aromatase gene expression (*cyp19a1a*) to those of normal ovaries.

Material and Methods

Animals

All works herein comply with current French national laws on the handling of animals.

Glass eels were caught by professional fishermen in marine water, close to the estuary of courant d’Huchet (Molliet, South-Western France, 43°51’N, 1°23’W) in March 2009. They were transferred to freshwater and reared in tanks supplied with thermo-regulated water

($17 \pm 2^\circ\text{C}$) in INRA experimental facilities and fed with an artificial eel diet (Biomar, Dan-Ex). The 2 intersexual specimens were detected among 140 eels that were longer than 29 cm, which is known as a threshold for histological sex differentiation [Colombo and Grandi, 1996]. After being anesthetized, and then killed with a lethal dose of benzocaine (2 ml/l of water), they were dissected. Two kinds of gonads were usually detected: a female's gonad looking like 'frilled organ' and a male's gonad looking like small 'lobes' [Kuhlmann, 1975]. All females' gonads ($n = 25$) were sampled and analyzed. The left gonad of each fish was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. The right gonad was used for histological sex assessment. Gonads were fixed in Bouin's fluid for 6 to 8 h, rinsed in clear water for 1 h and stocked in a 10% formaldehyde solution. Each gonad was embedded in paraffin and cut at 5-6 μm . Slides were stained with Regaud's hematoxylin, Orange G and Aniline blue -automatically (MICROM, HMS 760X) [Gabe, 1968].

RNA Extraction and Real-Time PCR

Gonads kept for molecular analysis were crushed with a disperser (Ultra-Turrax, IKA). Total RNA of each gonad was extracted using Tri Reagent (Molecular Research Center) according to the manufacturer's instructions. An aliquot of each tube was diluted in diethylpyrocarbonate-treated distilled water to reach the value of 183 ± 15 ng/ μl RNA. Then, 1.8 μg of RNA were reverse transcribed using 200 U Moloney murine Leukemia virus reverse transcriptase (Promega) and 2 μg of random hexamers (Promega) in a master mix containing 2 mM dNTPs, 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , and 10 mM dithiothreitol pH 8.3. Afterwards, the mix was supplemented with 25 U of RNase inhibitor (RNasin, Promega). Reverse transcription products were diluted 1:50. Aromatase primers were designed thanks to the Primer3 software and from the sequence given in Tzchori et al. [2004]

(forward: 5'-GGAAATCCTTGGAGGATGATGTC-3'; reverse: 5'-TACGCCCAACATTAAGGATGATG-3'). Primers for the reference gene, eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, *eef1a1* (forward: 5'-ATTGTGGGAGTCAACAAGATGGA-3'; reverse: 5'-GCTGACTTCCTTGGTGATTTCCT-3') were designed based on the *A. anguilla* sequence available in the GenBank (Accession no. EU407825).

Real-time PCR was performed on cDNA, using a kit provided with a SYBR Green fluorophore (Fast SYBR Green Master Mix; Applied Biosystems). Each well contained 4 μl of each cDNA, 1 μl of primers (diluted 10 times) and 5 μl of SYBR Green.

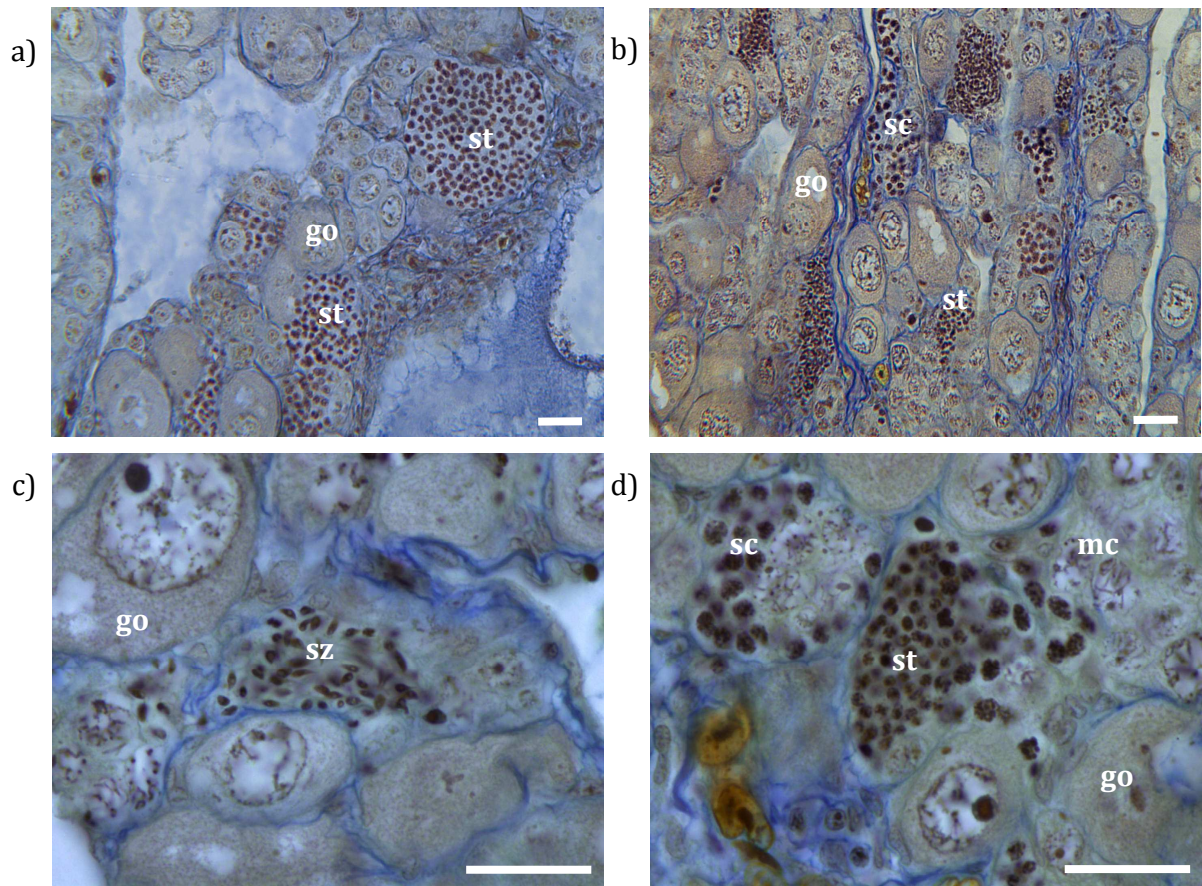


Fig. 60. a Gonads of AI1 specimen and b-d gonads of AI2 specimen showing spermatocytes (sc), spermatids (st) and spermatozoa (sz), together with meiotic cysts (mc) and growing oocytes (go). Scale bar 20 μ m.

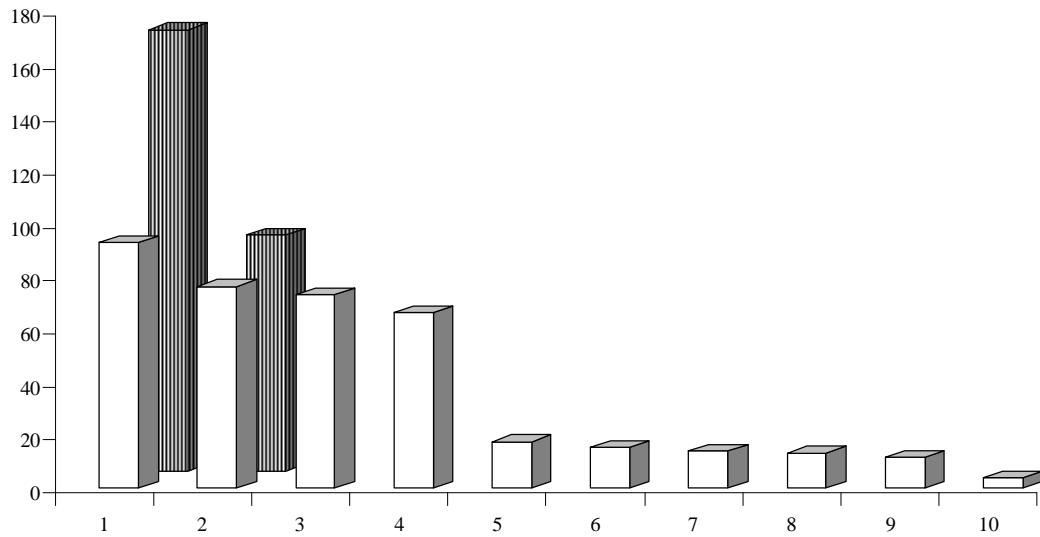


Fig. 61. Aromatase gene (*cyp19a1a*) expression in 10 ovaries (empty bars) of true females and 2 gonads of AI eels (greyed bars) relative to *eef1a1* expression.

The real-time PCR was run with the system Step One Plus (Applied Biosystems). The hot start enzyme was activated for 20 s at 95°C, then the amplification was carried out using the following cycle: 95°C for 3 s 60°C for 30 s, 40 times each. After amplification, a melting curve was obtained according to the following protocol: 10 s holding at 55°C followed by a 0.5°C (ok) increase, repeated 80 times. For the present study, aromatase gene expression was only compared between AI gonads and ovaries at the same developing stage (i.e. showing oocytes of different size at the cortical alveoli stage).

Results

AI gonads were macroscopically classified as ovaries. However, the histological analysis revealed that they contained spermatogonia, many nests of spermatocysts and spermatids as well as some spermatozoa intermingled between oocytes of different sizes (Fig. 60). Spermatozoa were found in the gonad of each AI eel. The size of the 2 intersexual specimens were 36.6 cm at 90 g (AI1) and 34.8 cm at 64.5 g (AI2), respectively. Among true females, we chose those having similar oocyte sizes as AI fish. The lengths of these 10 true females ranged between 32 and 39 cm and their body weight between 52 and 100 g. Aromatase gene expression in AI eels' gonads was higher than in 9 of the 10 analyzed ovaries (Fig. 61), whatever the size.

Discussion

As far as we know, this is the first study reporting the existence of AI eels at an advanced stage of maturation in *A. anguilla*. The proportion of AI eels was very low, representing 1.4% (2/140) of eels investigated at the microscopic level. This is comparable to what was found in *A. japonica* kept in similar conditions [Sato et al., 1992]. These authors designed an experiment to assess the effect of an estrogen treatment on sex ratio and found 1.7% of hermaphrodite eels in the control group. These eels were bigger (>50 cm) than the ones analyzed in the present experiment and their gonads looked like testes, suggesting that these individuals were at a very late stage of the development of the Syrski organ. Conversely, the gonads of the 2 intersexual European eels that we found were mostly composed of ovarian tissue, like the one observed by Lokman and Young [1998] in the New Zealand eel, *A. dieffenbachia*. It is possible that gonads of the AI eels in the present experiment developed through a juvenile intersexual phase as suggested for those in the experiment of Lokman and

Young [1998]. In eel, the sexual differentiation is under environmental control [reviewed in Davey and Jellyman, 2005] and the period during which environmental factors act upon sex differentiation is probably quite long [Colombo and Grandi, 1996; Holmgren et al., 1997; Melia et al., 2006]. Rearing conditions of the present study could have triggered a transdifferentiation process. However, AI specimens have also been found in the wild in other eel species [Takahashi and Sugimoto, 1978; Takahashi, 1979; Lokman and Young, 1998]. One may also suggest that endocrine disruptors could have lead to the occurrence of these 2 cases, as it is known for other fish species [reviewed in Bortone and Davis, 1994]. However, rearing water came from a pumping in a natural warm groundwater spring and so it appears unlikely that this water was contaminated by external chemical compounds.

The gene expression of aromatase being known to play a major role in fish ovarian differentiation was explored. The number of analyzed individuals was small since adult intersexuality seems to be a rare event in eels (2 intersexuals found among 140 fish) and, unfortunately, no statistical analysis could be performed. For whatever reason, aromatase gene expression was found to be higher in the gonads of the 2 intersexual adults when compared to most females at the same developing stage. It has been suggested that an increase in local steroid production stimulated gametogenesis in intersexual Japanese eels [Matsubara et al., 2008] and the coexistence of both testicular and ovarian tissues could enhance their respective development [Takahashi and Sugimoto, 1978]. In the experiment of Takahashi and Sugimoto [1978], small pieces of gonads were sampled by laparotomy before and after an *in vivo* hCG treatment, allowing to follow oocyte development. Interestingly, while oocytes reached the same size in intersexual eels and normal females at the start of the experiment (~250 μm), only the oocytes of the intersexual eels entered vitellogenesis following hCG treatment (oocyte size of intersexual eel: ~600--800 μm ; oocyte size of normal female: ~300 μm). Oocyte vitellogenesis could be triggered by the coexistence of a male tissue. Present results suggest that the up-regulation of genes encoding steroidogenic enzymes, such as aromatase, might have been involved in the over-development of both tissues.

Acknowledgements

B.G.'s PhD thesis was funded by from Univ Pau & Pays Adour (ED 211). The project was supported by funding from the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) and by the Interreg IV B Atlantic area transnational program (European Regional Development Fund), in the context of the Arc Atlantic Resource Conservation program

(AARC). We wish to thank Emmanuel Huchet, Jacques Rives and François Gueraud for their help in fish sampling. We are also grateful to the UR Numéa staff for their support at different steps of the experiment, and to Elodie Jouanno, Chantal Cauty, Béatrice Collin and Claude Sevellec for their support in the histological and gene expression analysis.

Chapitre 8

Synthèse Chapitre 8: Effet de la Croissance et de la Densité de population sur le sexe

Questions: Dans quelle mesure les conditions de densité influencent le sex-ratio ? Existe-t-il des différences de croissance en fonction des conditions de densité ? Existe-t-il des différences de croissance en fonction du sexe ?

Résultats: Dans les 4 conditions de densité initiales (62, 156, 250 et 650 ind/m²), une majorité de mâle a été produite (entre 60 et 100% des individus sexés). Les conditions avec le plus d'individus (125) ont produit significativement plus de femelles que les conditions avec moins d'individus (50). En revanche aucune différence de croissance n'a pu être détectée entre ces deux conditions. Les mâles semblent avoir une croissance en longueur légèrement supérieure à celle des femelles durant les premiers mois de vie en conditions d'élevage. Les différences de croissance en poids sont, en revanche, plus marquées. Bien que l'on ne puisse conclure directement sur la significativité des différences de croissance entre sexe, le modèle de croissance avec un taux exponentiel d'approche vers la taille asymptotique (variable K) différent entre chaque sexe, est le plus parcimonieux. De plus, les différences biométriques de taille, poids et coefficient de condition sont significatives (et en faveur des mâles) à partir de deux ans. Le taux de croissance des mâles s'atténue par la suite, ce qui n'est pas le cas de celui des femelles.

Conclusion: Les mâles semblent croître plus rapidement que les femelles durant les premières années de vie en conditions d'élevage. Le taux de croissance des mâles s'atténue par la suite (en relation avec la prise d'argenteure plus précoce), alors que celui des femelles augmente. Le facteur de condition des individus qui deviendront femelles semble plus élevé pendant les 6 premiers mois que celui des individus qui deviendront mâles, mais les différences ne sont pas significatives.

Chapitre 8 : Effet de la Croissance et de la Densité de population sur le sexe

Introduction

L'objectif de cette étude est de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'un déterminisme du sexe sous l'influence de la densité et/ou de la croissance. Ces deux facteurs sont en effet considérés comme les plus susceptibles d'influencer le déterminisme du sexe chez l'anguille (revue de Krueger et Oliveira, 1999 et revue de Davey et Jellyman, 2005). Ces constats découlent de plusieurs faits observés en milieu naturel (1) et en conditions d'élevage (2) :

(1) Dans le lagon de Comacchio, une brusque diminution des densités peut conduire à une augmentation significative de la proportion de femelles (Rossi *et al.* 1988).

En France, la rivière Frémur constitue un objet d'étude intéressant car la pression de pêche y est faible (Lafaille *et al.* 2006) et la densité d'individus y était très élevée (50 individus/100 m²) entre 1996 et 2000, avec une proportion de mâles de 77 %. A titre de comparaison, Carss *et al.* (1999) ont reporté en Angleterre que 71% des 1462 sites étudiés avaient moins de 5 ind/100 m². Dans le Frémur, la proportion de mâles a par la suite chuté à 58 % (entre 2001 et 2004), en lien avec une diminution drastique des densités (Legault *et al.* 2004, Lafaille *et al.* 2006).

Les conditions estuariennes (où se trouvent majoritairement les mâles) permettraient une bonne croissance (Daverat *et al.* 2012) comparativement aux conditions rencontrées en amont de rivières (où se trouvent majoritairement les femelles). Cependant, chez l'anguille de Nouvelle Zélande, la croissance augmente à mesure que la densité diminue en allant vers l'amont (Jellyman, 1997). Cela tient peut être au fait que de façon générale, les femelles atteignent des tailles à maturité supérieure à celle des mâles (Vøllestad et Jonsson, 1986, Vøllestad 1992, Wickström *et al.* 1996, Holmgren *et al.* 1997), et que la lecture d'âge par analyse des otolithes reste assez peu précise (± 1 an, Daverat *et al.* 2012). Dans cette récente étude une multitude d'informations sur la croissance des anguilles de nombreuses parties de l'Europe (n= 45759) provenant de la littérature ont permis d'estimer la croissance des individus à l'échelle annuelle par la lecture des otolithes.

En faisant abstraction du débat sur l'otolithométrie, l'analyse a mis en évidence une croissance supérieure en estuaire comparativement aux rivières et une croissance supérieure chez les femelles comparativement aux mâles (Daverat *et al.* 2012).

Néanmoins, les données récoltées en milieu naturel peuvent être obscurcies par de nombreuses autres variables telles que la pêche sélective des grosses anguilles (Naismith et Knights, 1990 ; Jellyman, 2001), une dispersion des anguilles liée au sexe (Ibbotson *et al.* 2002) et une mortalité sélective (Davey et Jellyman, 2005).

(2) Etudier l'impact de la densité et de la croissance sur le sexe en conditions expérimentales prend alors tout son sens, en dépit du fait que pour ces deux variables des résultats diamétralement opposés sont rapportés :

- Les mâles grossissent plus vite que les femelles (Kuhlmann, 1975 ; Helfman, 1987 ; Holmgren et Mosegaard 1996 ; Holmgren, 1997)
- Les femelles grossissent plus vite que les mâles (Poole and Reynolds, 1996 ; Degani *et al.* 2003 ; Huertas et Cerdà, 2006)
- Les fortes densités produisent une majorité de mâles (Egusa, 1979, Colombo et Grandi, 1996, Holmgren, 1996 ; Beullens *et al.* 1997 a,b ; Roncarati *et al.* 1997)
- Les fortes densités produisent une majorité de femelles (Huertas et Cerdà, 2006)

Compte tenu de la diversité de ces résultats, il apparaît clairement que faire la lumière sur le véritable facteur influençant le déterminisme du sexe est une tâche ardue. Il faut cependant noter que la plupart des études précédemment citées se sont focalisées sur la croissance après la phase de différenciation sexuelle ou ont mesuré la croissance moyenne annuelle entre le stade civelle et le stade argenté (*via* la lecture d'otolithes). Bien que très informatives, ces différentes études ne permettent pas de déterminer précisément le rôle de la croissance précoce sur le sexe. En effet, les conclusions tirées de ces différentes expériences ne peuvent être interprétées correctement car le fait de trouver une croissance inférieure chez les mâles peut être simplement dû à une plus faible longueur asymptotique atteinte par ces derniers en lien avec leur maturation précoce. De plus, la lecture des otolithes (qui suscite quelques débats, Holmgren, 1996) ne permet pas d'obtenir une information fine, car elle se fait à l'échelle de l'année. L'avantage, et l'avancée majeure, de la présente étude réside dans le fait qu'elle consiste en un suivi de la croissance au niveau individuel dès les plus jeunes stades

Prélèvement (P) Mesures (M)	CODE Date et âge approximatif	DATE	Intervalle entre les dates (jours)
M = tout	D1 - capture	30/03/09	-
M = tout	D2 - 1,5 mois	14/05/09	45
M = tout	D3 - 6 mois	20/09/09	129
M = tout	D4 – 1 an et 4 mois	08/07/10	291
M P = 64	D5 – 2 ans	07/02/11	214
M = tout	D6 – 2 ans	21/02/11	14
M = 444 P = 171	D7 – 2,5 ans	12/07/11	141
Tri par taille		26/07/11	155
M* = 55 P = 21	D8 – 2,5 ans	26/10/11	104
M = 217 P = 46	D9 – 3 ans	10/02/12	108
M = 155 P = 19	D10 – 3 ans	26/04/12	76

Tableau 15: Dates des interventions sur les bacs. Mesures (M) et prélèvements (P) à partir du 26 mars 2009 et nombre de jours entre chaque date. M* = mesures faites seulement pour les bacs 13 à 16 sur les anguilles mesurant plus de 25 cm.

(recommandé par Holmgren et Mosegaard, 1996). On peut ainsi rapporter le sexe des individus déterminé après 30 cm, à leur état au stade civelle.

Matériel et Méthodes (pour les informations générales, se référer au matériel et méthodes partie II)

Suivi de la croissance et de la survie

Dans cette expérience, des civelles capturées au printemps 2009 ont été élevées dans quatre conditions initiales de densités distinctes **62, 156, 250 et 650 ind/m²**, chacune en quadriplat.

Les individus pit-tagués et/ou marqués avec des VIE tag ont fait l'objet d'un suivi individuel sur 2 à 3 ans. Des mesures biométriques ont été effectuées tout au long de l'expérience (Tableau 15) ; l'écart entre les dates varie en général entre 3 et 6 mois. Dans le but de limiter le cannibalisme, un tri par taille a été réalisé à partir de la date 8 (le 26/07/2011) tout en respectant les conditions d'élevage à la date 7 (taille des bacs et densité) qui ont évolué par rapport aux conditions initiales en raison des mortalités, mais qui ont permis le maintien (amoindri) des différences initiales. Pour chaque condition, les anguilles mesurant plus de 25 cm ont été placées dans un même bac et celles n'atteignant pas cette taille ont été disposées dans un autre. A partir de cette date, les individus sont donc élevés dans 8 bacs (4 conditions x 2 tailles d'anguille). Les nouvelles densités à la date 8 sont : 25, 45, 135, 258 ind/m².

En tout, 10 points de mesures (taille, poids) et 5 prélèvements ont été réalisés pour déterminer le sexe. Avant chaque mesure, tous les individus étaient mis à jeun pendant 24 heures. A chaque point de mesure, le facteur de condition (CF) était calculé. Dans le but d'identifier une possible différence entre mâles et femelles, le même coefficient d'allométrie ($b = 3$) a été utilisé : $CF = (10^7 * P)/L^b$

Avec P : poids en grammes et L : longueur en millimètres.

L'identification du sexe a été effectuée de façon macroscopique pour la plupart des individus. Toutefois, toutes les gonades femelles (supposées) ont également fait l'objet d'une étude microscopique (pour déterminer le stade de développement), de même que les gonades pour lesquelles l'identification du sexe était incertaine. Comme vu dans le chapitre précédent, des individus intersexués ont été détectés à de nombreuses reprises et il existe des preuves concordantes permettant de penser que tous ces individus deviendront mâles

par la suite. L'analyse des données est réalisée en deux parties. La première à l'échelle macroscopique, dans laquelle tous les individus sont soit mâle soit femelle (321 individus). La seconde, dans laquelle seuls les individus sexés *via* l'histologie sont pris en compte (131 individus). Dans ce cas, les anguilles sont placées dans 3 catégories (mâle, intersexué et femelle).

Les civelles suivies individuellement depuis le début de l'expérience (VIE tag) sont toutes sexées microscopiquement.

Analyse de données

L'analyse de la différence de poids, de taille et de CF entre sexe macroscopique aux différentes dates a été réalisée avec un Test T lorsque $n > 30$ et un test de Wilcoxon lorsque $n < 30$. Une ANOVA à deux facteurs a été effectuée pour tester l'effet du sexe et du temps sur le poids, la longueur et le CF. L'ANOVA sur le CF a été suivie d'un test de contraste de Tuckey. Pour tester le lien entre le comportement de migration des civelles et le nombre d'individus par bac sur le sexe, le test exact de Fisher a été réalisé.

Analyse de la croissance

Chez l'anguille européenne comme chez la plupart des poissons, le taux de croissance diminue avec l'âge (Holmgren *et al.* 1997 ; Daverat *et al.* 2012) et peut ainsi être modélisée par des régressions non linéaires (*e.g.* modèle de von Bertalanffy, Mann et Balckburn, 1991 ; De Leo et Gatto, 1996). Il n'en va pas de même chez les anguilles endémiques d'Océanie où des modèles linéaires suffisent à estimer correctement la croissance des individus (Jellyman, 1997).

Une des premières méthodes mise au point pour modéliser la croissance est celle décrite par Von Bertalanffy (1938) :

$$L(t) = L_{\max} - (L_{\max} - L_{\min}) \exp^{-b(t-t_0)}$$

L est la longueur au temps t, L_{\max} est la longueur maximale du corps, L_{\min} est la longueur minimale à t_0 et b est une constante.

Ce modèle a ensuite été modifié par Beverton et Hold (1957). C'est cette formule qui sera employée par la suite :

$$L(t) = L_{\infty}(1 - \exp^{-K(t-t_0)})$$

L est la longueur au temps t, L_{∞} est la longueur moyenne du corps asymptotique, K est le coefficient de croissance de Brody et t_0 représente l'âge lorsque la taille moyenne est de 0 (c'est un artefact du modèle qui n'a aucun sens biologique). K n'est pas exactement un taux de croissance au sens strict du terme car son unité est exprimée en temps :

$$K = [\text{Log} ((L_{\infty} - \exp^{L(t)}) / L_{\infty})] / (t - t_0)$$

K est donc une mesure du taux exponentiel d'approche vers la taille asymptotique (Schnute et Fournier, 1980). Comme le souligne Francis (1988), L_{∞} n'a de sens que si la mortalité dans la population de poissons est assez faible pour permettre aux poissons d'atteindre l'âge auquel la longueur moyenne cesse d'augmenter. Ici les données permettent d'estimer correctement la L_{∞} des mâles, mais moins efficacement celle des femelles.

Contrairement aux modèles précédemment utilisés pour estimer la croissance en fonction des comportements (modèles linéaires généralisés, cf chapitre 3), ces modèles sont non-linéaires et requièrent des méthodes statistiques appropriées. Ces dernières années des packages ont été mis au point sous R pour permettre d'estimer la courbe de croissance d'une population (e.g. Package nlstools, FSA, NCStats et fishmethods). Le processus de modélisation et d'estimation des paramètres se fait en deux étapes :

- 1) Estimation des valeurs de départ (starting values) à partir des vraies données (package FSA)
- 2) Ecriture du modèle et estimation des 3 différents paramètres L_{∞} , K et t_0 à l'aide de la fonction nls (package nlstools)

Il existe différentes paramétrisations du modèle qui peuvent être mises au point pour améliorer la rapidité de convergence, bien que les prédictions du modèle restent les mêmes. Ces différentes paramétrisations peuvent également permettre d'obtenir des paramètres qui seront moins auto-corrélés et donc plus stables. Citons par exemple les paramétrisations de Schnute (1) et Francis (2):

$$(1) L(t) = L_1 + (L_2 - L_1) \left(\frac{1 - \exp^{-K(t-t_1)}}{1 - \exp^{-K(t_2-t_1)}} \right)$$

$$(2) L(t) = L_1 + (L_3 - L_1) \frac{(1 - r^{2(t-t_1/t_3-t_1)})}{(1 - r^2)} \text{ avec } r = (L_3 - L_2 / L_1 - L_1)$$

L_1 , L_2 et L_3 sont les longueurs moyennes au temps t_1 , t_2 et t_3 . Les valeurs obtenues pour ces différents paramètres se trouvent dans l'Annexe 1.

Ici, le modèle utilisé sera celui de Von Bertalanffy modifié par Beverton et Hold. Huit modèles seront comparés dans le but de déterminer un possible effet des conditions initiales de densité et du sexe sur la croissance. Pour chaque modèle la variable X représentera soit :

- Le type de bac (Grand ou Petit)
- Le nombre d'individus (50 ou 125)
- Les Conditions de densité (62 ou 156 ou 250 ou 650 ind/m²)
- Le Sexe macroscopique (F ou M)
- Le Sexe microscopique (F ou I ou M)

Modèle «nul» comportant les mêmes estimations de paramètres :

$$(3) L(t) = L_{\infty}(1 - \exp^{-K(t-t_0)})$$

Modèles à 1 paramètre en commun pour la variable X d'intérêt :

$$(4) L(t) = L_{\infty}[X](1 - \exp^{-K(t-t_0)})$$

$$(5) L(t) = L_{\infty}(1 - \exp^{-K(t-t_0[X])})$$

$$(6) L(t) = L_{\infty}(1 - \exp^{-K[X](t-t_0)})$$

Modèles à 2 paramètres en commun pour la variable X d'intérêt:

$$(7) L(t) = L_{\infty}[X](1 - \exp^{-K[X](t-t_0)})$$

$$(8) L(t) = L_{\infty}[X](1 - \exp^{-K(t-t_0[X])})$$

$$(9) L(t) = L_{\infty}(1 - \exp^{-K[X](t-t_0[X])})$$

Le modèle «complet» avec des estimations de paramètres différents pour la variable X d'intérêt :

$$(10) L(t) = L_{\infty}[X](1 - \exp^{-K[X](t-t_0[X])})$$

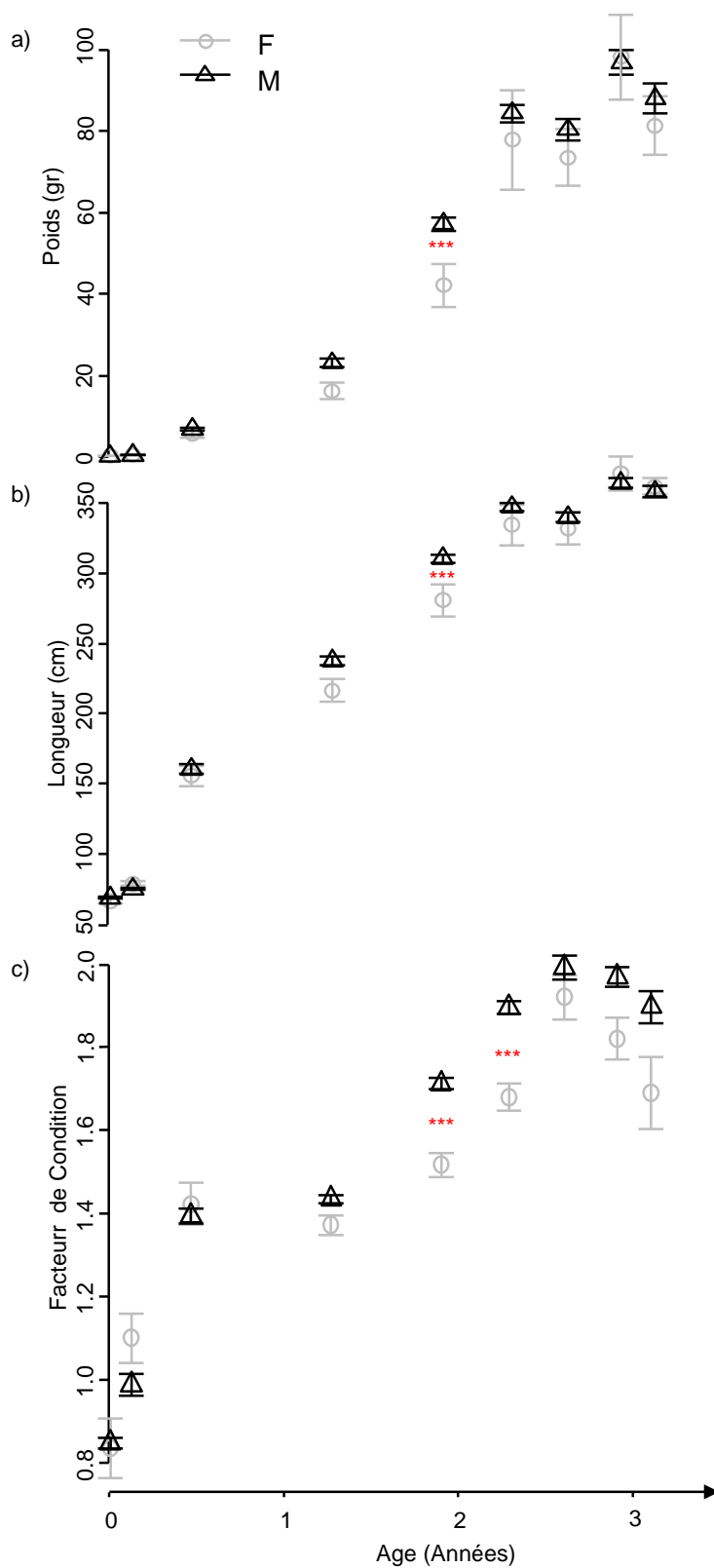


Fig. 62. Evolution du poids a), de la longueur b) et du facteur de condition c) des individus au cours du temps (Années) en fonction de leur sexe (moyenne \pm erreur standard). Le nombre d'individus varie au cours du temps (Femelles n = 4,5,11,35,42,35,18,15,6 ; Mâles n= 55,65,113,271,304,215,65,48,13). Les dates 5 et 6 ont été rassemblées pour une meilleure représentation des données.

Nb : Seuls les modèles avec la même variable d'intérêt (ex : sexe) sont comparés entre eux afin de déterminer celui qui est le plus parcimonieux (avec le plus faible AIC).

Résultats

Le test exact de Fisher n'a pas permis de mettre en évidence de lien entre le comportement de migration initial des civelles (M+/M-) et le sexe des anguilles ($p = 0.21$).

Une différence significative de poids et de taille entre mâles et femelles a été détectée seulement à la date 6 (Test T, $p\text{-value} < 0.05$) même si cette tendance est également observée à partir de la date 4 (à partir de 1 an et 4 mois). On observe également une différence significative entre le facteur de condition des mâles et celui des femelles aux dates 6 et 7 (Test T, $p\text{-value} < 0.01$) (Fig. 62).

Sur l'ensemble de l'expérience on constate un effet du sexe et du temps sur le poids et la taille des individus (Tableau 16). En revanche, l'effet de l'interaction entre ces deux facteurs (sexe et date) n'est pas significatif (Tableau 16). Ceci signifie que les mâles ont un poids et une longueur supérieure aux femelles sur l'ensemble des dates. L'interaction entre sexe et date est en revanche significative pour le facteur de condition CF (Tableau 16), probablement en relation avec le fait que le CF est légèrement supérieur aux dates 2 et 3 chez les femelles et devient inférieur à celui des mâles par la suite (Fig 62). Le test de contraste de Tuckey ne permet pas de détecter de différence significative entre sexes sur les 3 premières dates (CF des F>M, $p = 0.68$) probablement à cause du trop faible nombre de femelles suivies individuellement depuis le début de l'expérience (nombre de femelles date 1 = 4, date 2 = 5, date 3 = 11 ; l'effectif passe à 35 à la date 4, en lien avec la pose des pit-tags qui augmente le nombre d'individus suivis individuellement). Le test de contraste de Tuckey devient significatif par la suite entre LES dates 4 et 10 (CF des M>F, $p < 0.001$).

Si l'on excepte les bacs 3 et 10, où de très fortes mortalités sont reportées ($\approx 80\%$) à la date 6, les pourcentages de survies sont relativement similaires entre conditions à cette même date (Fig. 63).

		SC	DL	Valeur de F	p-value
Poids	Date	1345737	9	233,7	<0.001***
	Sexe	6387	1	10,0	<0.001***
	Date:Sexe	3529	9	0,6	0.79
	Résidus	831848	1330		
Longueur	Date	10097815	9	570,0	<0.001***
	Sexe	28034	1	14,2	<0.001***
	Date:Sexe	18625	9	1,1	0.4
	Résidus	2558760	1330		
CF	Date	117,8	9	310,2	<0.001***
	Sexe	2,1	1	50,5	<0.001***
	Date:Sexe	1,1	9	2,9	<0.002***
	Résidus	54,8	1330		

Tableau 16 Résultats de l'ANOVA à deux facteurs. SC : Sommes des Carrés, DL : Degré de Liberté, CF : Facteur de Condition.

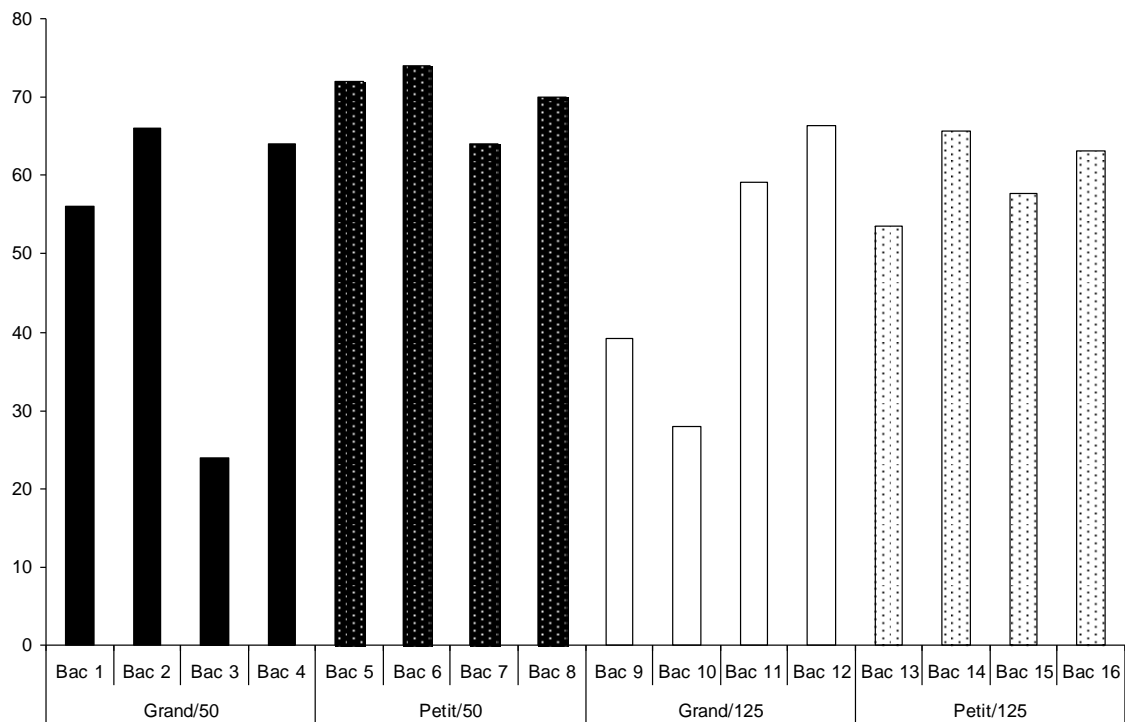


Fig. 63. Pourcentage de survie par bac à la date 6, soit 2 ans après le début de l'expérience.

Ceci implique que les différences de densité entre conditions ont été relativement bien conservées dans le temps. A la date 10 (après plus de 3 ans d'élevage), une importante partie des individus est encore indifférenciée, ce qui dénote des différences de croissance assez conséquentes entre individus (Fig. 64).

En réattribuant les bacs d'origine à chaque individu à la date 10, il apparaît que les bacs ayant contenu 125 individus ont produit significativement plus de femelles (Test de Fisher p-value < 0.01) que les bacs avec 50 individus. Le bac 10 est celui qui produit le plus de femelles (40%).

Croissance et Densité :

En ce qui concerne la croissance par bac (grand bac/petit bac), le modèle avec un paramètre K qui diffère (modèle 6) entre les groupes (grand bac/petit bac) est le meilleur modèle sur la base du critère d'Aikaike (faible AIC). Ce qui signifie que ce modèle est celui qui explique le plus de variance pour la prise de longueur avec un minimum de paramètres. En revanche, le modèle nul (modèle 3) est le meilleur modèle pour le nombre d'individus (50 vs 125) dans la mesure où, ajouter des termes n'améliore pas significativement le modèle nul. On peut donc considérer que le t_0 , le K et la longueur à l'infini (L_∞) sont les mêmes pour ces deux conditions (grand bac/petit bac). En réalisant des modèles différents pour les quatre conditions : 62 /156 /250/ 650 ind/m², il s'est avéré que le modèle le meilleur modèle était celui avec une L_∞ différente pour chaque condition (modèle 4), ce qui ne signifie **pas** que la L_∞ diffère entre conditions, mais qu'une L_∞ différente en fonction des conditions explique le mieux l'évolution de croissance en longueur. Les résultats de la comparaison entre modèles sont donnés en Annexe 1. Les modèles avec des paramètres différents pour chaque groupe (modèle 10) sont représentés Fig. 65.

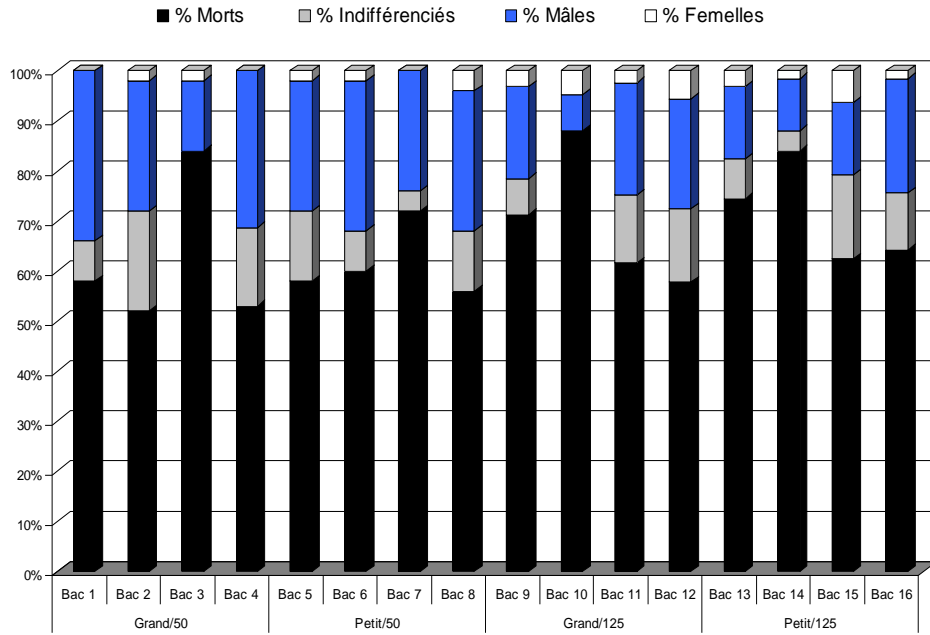


Fig. 64. Sex-ratio (incluant les individus sexés entre 2 et 3 ans), pourcentage de total de morts et pourcentage d'individus non sexés (appelés indifférenciés) à la date 10 en ayant réattribué les individus à leurs conditions (bacs) d'origine.

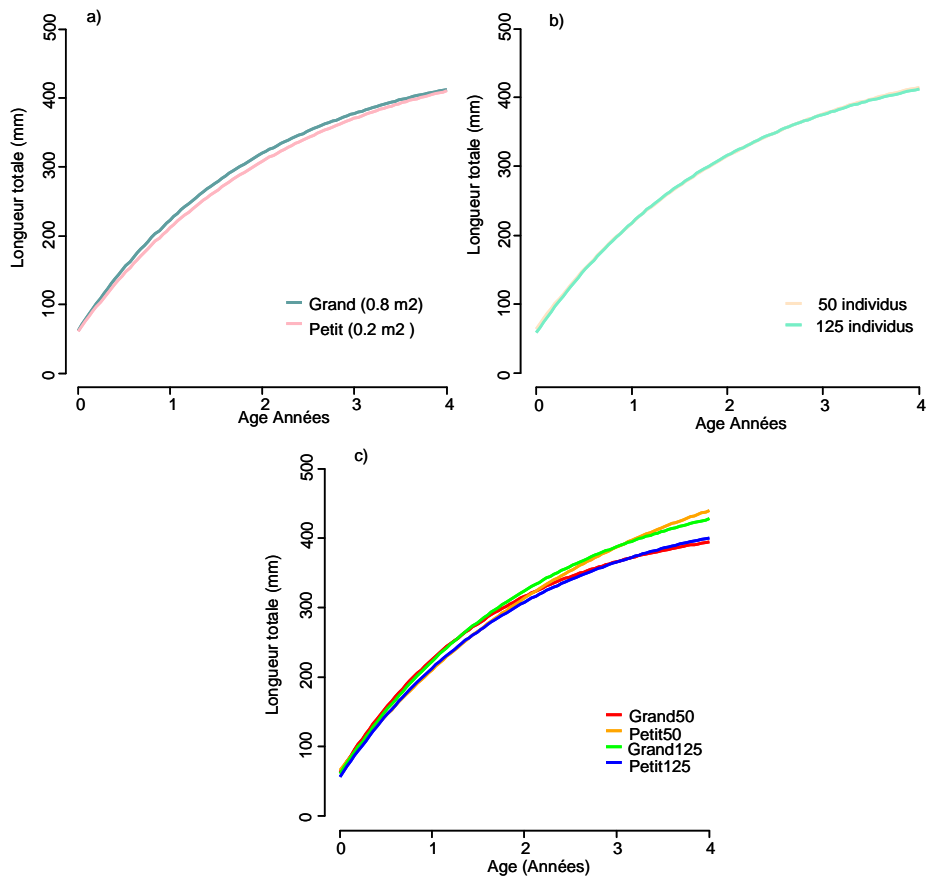


Fig. 65. Estimation de la croissance moyenne des individus à partir du modèle complet de von Bertalanffy en fonction des différentes conditions a) Grand bac et Petits bacs, b) 50 et 125 individus et c) les quatre conditions de densités initiales.

Croissance et Sexe (échelle macroscopique n = 321)

Le modèle complet (avec un paramètre différent pour chaque sexe) est significativement plus informatif que le modèle 5 (avec t_0 qui diffère entre sexe) et le modèle 8 (avec t_0 et L_∞ qui diffèrent) (Annexe 1, Tableau 1bis). Ainsi le modèle 6 (avec un K différent pour chaque sexe) est celui qui explique le mieux la prise de poids et la prise de longueur (Tableau 17, Fig. 66 a) ; c)). Le modèle 7 (avec un L_∞ et un K différent en fonction du sexe) est également plus informatif que le modèle nul (Tableau 17). Les estimations des paramètres pour les modèles 6 et 7 sont données dans l'Annexe 1 (Tableau 2bis et 3bis). Dans la mesure où les intervalles de confiance à 95 % sont importants (Annexe 1, Tableau 2bis et 3bis, Fig. 66) on ne peut conclure sur une différence significative entre sexes pour le K et le L_∞ . Néanmoins, les mâles ont un K supérieur à celui des femelles et d'après les modèles (7) sur la croissance, les courbes se croisent entre 3-4 ans et 5-6 ans respectivement, pour la longueur et le poids.

Modèles	DL	AIC Longueur	AIC Poids
10	7	13892,85	12401,46
9	6	13893,9	12399,69
8	6	13895,24	12400,2
7	6	13892,45	12399,78
6	5	13891,91	12398,48
5	5	13896,98	12398,82
4	5	13893,71	12400,77
3	4	13909,81	12411,45

Tableau 17. Valeurs de l'AIC pour les différents modèles de croissance en longueur et en poids

Croissance et Sexe (échelle microscopique n = 131)

La même analyse a été effectuée sur les individus ayant été sexés à l'échelle microscopique. Trois groupes ont ainsi été formés se composant de 54 Intersexués, 41 Mâles et 36 Femelles. La recherche du meilleur modèle permettant d'expliquer la croissance en longueur des individus a mis en évidence que le modèle 4 (L_∞ différente entre chaque groupe) était celui présentant le plus faible AIC (Annexe 1), viennent ensuite le modèle 6 (avec un K différent entre chaque groupe), puis le modèle nul. La comparaison entre ces modèles a mis en évidence que le modèle nul ne différait pas significativement du modèle 4 et du modèle 6 (Annexe 1). Les paramètres utilisés pour prédire la croissance en longueur chez ces individus peuvent donc être les mêmes. Les courbes obtenues avec le modèle 10 (modèle complet) sont présentées Fig. 67b).

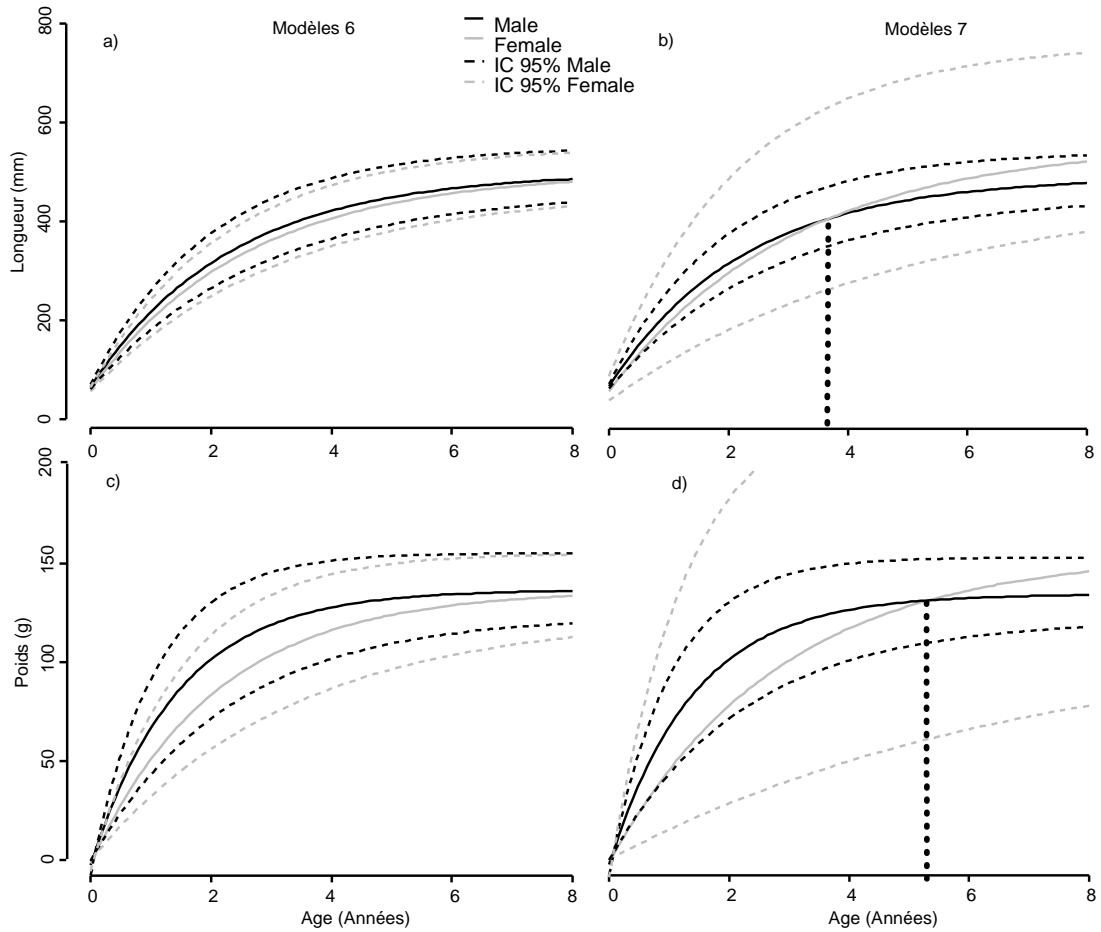


Fig. 66. Estimation de la croissance moyenne en longueur a) et en poids c) des individus à partir du modèle de von Bertalanffy, avec un paramètre K différent pour chaque sexe (modèle 6). Estimation de la croissance moyenne en longueur b) et en poids d) des individus à partir du modèle de von Bertalanffy, avec un paramètre K et une L_{∞} différents pour chaque sexe (modèle 7). La courbe de croissance des mâles est représentée en noir et celle des femelles en gris. L'intervalle de confiance à 95% (IC 95%) est représenté en pointillés.

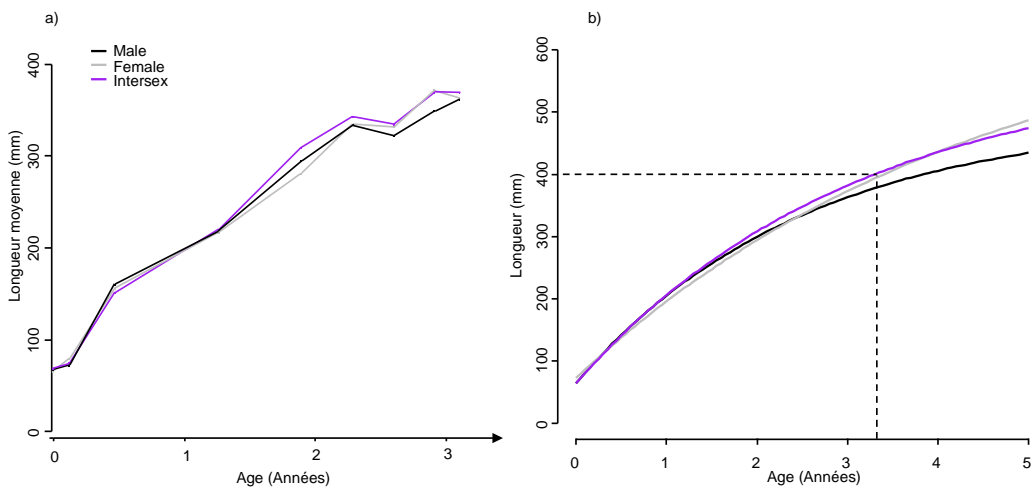


Fig. 67. a) Evolution de la longueur moyenne des individus au cours du temps et b) Estimation de la croissance moyenne en longueur des individus à partir du modèle complet de von Bertalanffy en fonction de leur sexe : mâle, femelle et intersexués

Discussion

En premier lieu, cette étude permet de confirmer que le déterminisme du sexe est sous l'influence de l'environnement et que les conditions d'élevage en aquaculture contribuent fortement à l'obtention d'un sex-ratio biaisé, dans la mesure où une moyenne de 87 % de mâles sont produits dans nos conditions d'élevage. Cela suggère que les conditions de densités initiales étaient potentiellement encore trop élevées pour obtenir une plus grande proportion de femelles. Le fait de n'avoir obtenu que des mâles dans la première expérience (Partie 1) où les conditions de densités étaient similaires (64 ind/m^2) à la plus faible densité de cette expérience (62 ind/m^2), confirme cette interprétation. Néanmoins, on ne peut écarter l'hypothèse d'une mortalité différentielle en fonction du sexe, car dans ces deux expériences les individus n'ayant pas atteint 30 cm n'ont pu être sexés. Dans une récente méta-analyse (Bevacqua *et al.* 2011) ont montré que la mortalité des femelles était supérieure à celle des mâles, et ce à tous les poids (entre 2 et 500 gr). Bellini (1907) montre également que les maladies (telles que la « peste rouge »)⁹ semblent affectées préférentiellement les femelles.

Les différences de croissance entre conditions d'élevages (bacs de différentes densités) paraissent minimes et seule une longueur moyenne du corps asymptotique qui diffère entre conditions permet de mieux expliquer la croissance en longueur. Il a été montré que la croissance des individus dans de « faibles » densités (4 kg/m^3) était similaire à celle obtenue dans de fortes densités 30 kg/m^3 (Degani *et al.* 1985). Dans notre étude, les différences de croissance pourraient être diminuées par l'ajout des bacs en tant que conditions aléatoires, dans la mesure où les réplicas ne sont pas considérés comme tels dans notre analyse statistique (ils sont considérés comme un seul et même bac par condition). La prochaine étape consistera donc à améliorer les prédictions du modèle en ajoutant un effet bac aléatoire. De même, les mesures faites sur les mêmes individus à des temps différents impliquent une auto-corrélation pour certaines données (risque d'erreur de type I) qui pourrait être corrigée en incluant un effet aléatoire au niveau de l'individu.

Les prédictions faites par les modèles de croissance permettent néanmoins d'obtenir un bon aperçu de ce qui se passe en condition réelle. Le fait d'ajouter un paramètre de croissance (K) différent entre sexes permet de mieux expliquer la croissance en taille et en poids des individus uniquement lorsque le K est similaire pour toute la population. Bien que le temps d'approche (K) vers la taille asymptotique (L_{∞}) ne diffère pas significativement entre mâles et

⁹ A noter que nous n'avons pas décelé de maladie au cours de l'élevage. Les mortalités semblent essentiellement dues au cannibalisme, qui a eu lieu même après le tri des individus par taille.

femelles, ce temps d'approche est minimisé chez les mâles comparativement aux femelles. De plus, le modèle 7, avec une taille asymptotique (L_{∞}) différente entre chaque sexe associé à un K différent entre sexe, permet de mieux expliquer la croissance que le modèle nul et le modèle complet. Ces deux modèles (6 et 7) permettent de corroborer les modèles théoriques développés par Helfman (1987), qui prédisent que les mâles ont une croissance plus rapide que les femelles sur les premières années car ils utilisent une stratégie « time-minimizing ». Cette stratégie est basée sur le constat que les individus partent plus tôt que les femelles pour aller se reproduire en mer. A contrario, les femelles utilisent une stratégie « size-maximizing ». Dans leur cas, la croissance est plus lente pendant les premières années de vie en eau douce, mais l'obtention d'une taille maximum est favorisée. Les récentes méta-analyses développées chez l'anguille américaine *A. rostrata* (Jessop, 2010) et chez l'anguille européenne *A. anguilla* (Daverat *et al.* 2012) vont à l'encontre de nos résultats et estiment une croissance moyenne chez les femelles supérieure à celle des mâles (respectivement 44,6 mm/an pour les femelles contre 26 mm/an chez les mâles de *A. rostrata* et 53 mm/an pour les femelles contre 48 mm/an chez les mâles de *A. anguilla*). Outre le fait que leurs résultats reposent principalement sur une estimation de l'âge basée sur l'incrémentation annuelle des otolithes d'anguilles argentées (peu précis et différence de longueur asymptotique entre mâles et femelles non prise en compte), leurs estimations ne reportent que la croissance en longueur des individus. Dans notre étude (réalisée sur une échelle de temps plus courte et plus fine), les différences de croissance en longueur entre mâles et femelles paraissent minimes. En revanche, les résultats basés sur la croissance en poids des individus, sont eux, beaucoup plus discriminants (bien que restant non significatifs). Ne disposant pas de données sur le futur sexe des individus pour les individus de moins de 20 cm, De Leo et Gatto (1996) ont estimé les paramètres de croissance chez *A. anguilla* à partir de modèles semblables. Ces auteurs ont déterminé que le paramètre K était toujours supérieur chez les mâles à partir de données récoltées sur 3 « populations » d'anguille (K mâles = 0,4, 0,31 et 0,32 et le K des femelles: 0,28 , 0,3 , 0,2, respectivement dans les 3 populations). Lee (1979) montre que le K des mâles provenant du bassin d'Arcachon est deux fois supérieur à celui des femelles (K mâles = 0,28 et K femelles = 0,14).

Ici, bien que nos données ne permettent pas de détecter le moment où les courbes de croissance se croisent entre mâles et femelles (absence de données après 3 ans et les individus sont tués quand la taille minimum de 30 cm est atteinte), les prédictions basées sur le modèle 7 permettent d'obtenir une taille maximale atteinte par les mâles et les femelles et de déduire le moment où les courbes se croisent (soit entre 3 et 4 ans pour la longueur et entre 5 et 6 ans

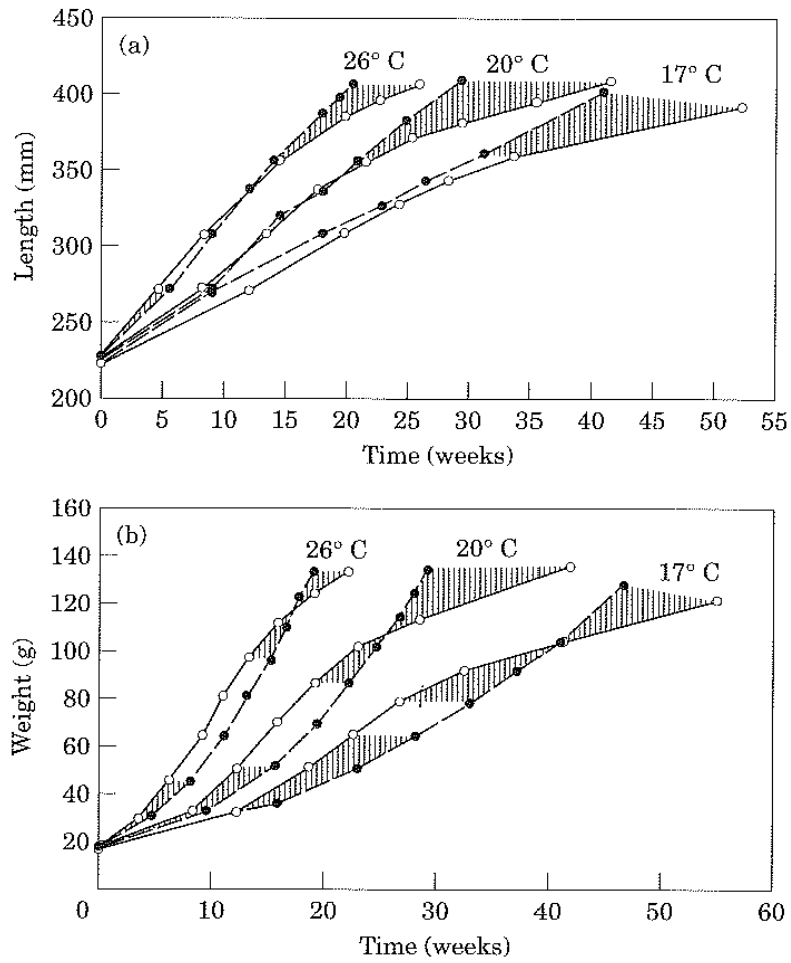


Fig. 68. Evolution de la longueur moyenne (a) et du poids moyen (b) en fonction du temps et à différentes températures. Les points noirs représentent les femelles et les points blancs, les mâles. Les aires hachurées représentent les zones où la croissance absolue diffère significativement entre mâles et femelles. D'après Holmgren et Mosegaard (1996).

pour le poids). Ces différences de « timing » traduisent bien le fait que l'augmentation du poids en fonction de la taille est généralement supérieure chez les mâles comparativement aux femelles (CF significativement plus faible chez les femelles aux dates 6 et 7).

Si l'on s'en réfère aux comparaisons de poids et de taille moyenne entre sexes aux différentes dates, il semble probable que les différences de croissance entre mâles et femelles apparaissent entre 6 mois et 1 an et deviennent de plus en plus marquées au cours du temps (significatif à ≈ 2 ans). Par la suite, les différences de taille entre mâles et femelles s'atténuent car la plupart des mâles cessent vraisemblablement de croître à partir de 2 ans, ce qui n'est pas le cas des femelles. Selon Vøllestad et Jonsson (1986), les mâles deviennent argentés vers 40 cm et les femelles vers 62 cm. Pour Holmgren et Wickström, (1993) les mâles cessent de grandir aux alentours de 35-45 cm. Ceci correspond relativement bien aux longueurs asymptotiques estimées par le modèle de croissance 7 (L_{∞} mâles = 49 cm et L_{∞} femelles = 56 cm). Néanmoins, la L_{∞} est certainement sous-estimée pour les femelles, car les plus gros individus ne dépassent pas 53 cm dans notre analyse. En employant les mêmes modèles d'estimation de la croissance, Lee (1979) présente des résultats assez similaires pour les anguilles du bassin d'Arcachon (L_{∞} mâles = 45 cm et L_{∞} femelles = 69 cm). De Leo et Gatto (1996) ont aussi estimé les L_{∞} des mâles et des femelles, et trouvent des estimations de longueur asymptotique très variables pour les femelles (L_{∞} mâles = 42.8-44.9 cm et L_{∞} femelles = 59.6-79.4 en fonction des « populations »). Il faut noter que ces auteurs ne disposaient pas d'anguilles pour des tailles < 20 cm, mais que la taille des femelles pouvait atteindre 90 cm.

Holmgren et Mosegaard (1996) qui ont suivi la croissance au niveau individuel à partir d'individus de 10 g (18-22 cm), montrent que la prise de poids se réalise en deux phases. La première, où les mâles ont une croissance significativement supérieure à celle des femelles à partir de 30-40 gr. La seconde, où les femelles entrent dans une phase de croissance exponentielle tardivement et où les courbes de croissance se croisent à partir 100-130 gr en fonction des températures (Fig. 68, ce qui est confirmé par Kushnirov et Degani (1995). Ces résultats correspondent parfaitement aux résultats obtenus avec le modèle 7 sur la prise de poids des individus. Les différences de croissance en longueur entre sexes sont plus ténues que celles de la croissance en poids dans nos observations ; c'est également ce que montrent Holmgren et Mosegaard (1996). Dans leurs expériences, la température d'élevage semble avoir un rôle prépondérant (Fig. 68), et l'augmentation de cette température diminue les différences de croissance entre sexes.

En déterminant le sexe des individus de façons microscopique et en intégrant les individus intersexués dans l'analyse de la croissance, il apparaît que le modèle avec une L_{∞} différente pour chaque sexe est le meilleur modèle. Néanmoins ce modèle n'améliore pas significativement le modèle avec des paramètres communs (modèle nul). Cela provient probablement du plus faible nombre d'individus dans cette étude ($n=112$). Cependant, les mêmes tendances apparaissent dans le modèle « complet » avec un K légèrement inférieur chez les femelles comparativement aux mâles. De plus, il apparaît une longueur moyenne asymptotique légèrement supérieure chez les indifférenciés comparativement aux mâles. Dans la mesure où il existe une très forte probabilité pour que ces individus se développent en mâles (CF chapitre 11), tous ces individus ont été considérés comme mâle lors de la première analyse (sexe macroscopique). Ceci pourrait avoir atténué les différences de croissance entre mâles et femelles dans les modèles précédents. On aurait pu omettre les individus intersexués de la précédente étude (sexe macroscopique), mais d'autres individus définis macroscopiquement comme des « mâles » auraient également pu être des intersexués. Il faut cependant noter que la grande partie des individus intersexués détectés dans cette analyse est liée au fait que beaucoup de gonades provenaient d'une identification macroscopique « incertaine » (leur proportion est donc sans doute biaisée). L'analyse de la croissance issue du sexage à l'échelle microscopique permet de rendre compte d'une croissance plus faible (non significative) jusqu'à 1 an et 4 mois chez les individus intersexués comparativement aux autres individus (Fig. 67a). Par la suite, la croissance en longueur de ces individus intersexués s'accélère et devient plus importante que celle des mâles et des femelles (Fig 67a,b). Ce développement légèrement plus lent des individus intersexués durant les premiers mois de vie en eau douce suggère une dépense énergétique plus importante pendant cette période peut-être en lien avec le développement simultané de cellules femelles et mâles. En revanche, chez le bar *Dicentrarchus labrax*, aucune différence de croissance n'a été détectée entre individus intersexués et mâles purs (Saillant *et al.* 2003). Il faut cependant souligner, que le processus de différenciation est beaucoup plus long chez l'anguille (\approx entre 15 et 30 cm) que chez le bar (entre 8 et 12 cm). Dans notre étude, le développement des tissus testiculaires devient progressivement prédominant par la suite et la croissance s'accélère, ce qui pourrait être dû à des phénomènes de croissance compensatoire, bien connu chez les poissons (Ali *et al.* 2003).

Discussion

4 Discussion générale

Cette discussion a pour but principal de développer de nouvelles perspectives à partir des résultats présentés dans cette thèse (Partie 1 et Partie 2) et de proposer de nouvelles pistes de recherches.

1. Mortalité

Dans un premier temps, il convient de souligner les très fortes mortalités rencontrées au cours de ces deux expériences (82 % de mortalité après 2 ans et demi pour l'expérience de la partie 1 et 66% de mortalité après 3 ans d'élevage pour la partie 2). Dans l'expérience mise en place dans la première partie de cette thèse, 34 % des individus (43/128 Automne + Printemps) étaient morts à la fin de l'été 2010. Ces mortalités importantes ont suivi le sevrage et le changement de température (bien que progressif) de 11 à 20°C. En effet, seuls 4 individus étaient morts avant ce changement. De même, les plus fortes mortalités observées lors des expériences de la partie 2 sont intervenues pendant les premiers mois d'élevage à 17°C (30% après 6 mois). De façon générale, il a été montré que la mortalité des anguilles augmente avec la température (Bevacqua *et al.* 2011). De plus, chez les civelles d'élevage, la phase de sevrage semble être à l'origine des fortes mortalités reportées pendant les premiers mois de croissance (Degani *et al.* 1984).

Dans les conditions d'expérimentation, des épisodes d'épizooties expliquent également ces fortes mortalités. Pour la plupart des individus, des syndromes externes étaient associés aux mortalités telles qu'un pourrissement de la queue et la présence d'épanchements sanguins sur les nageoires. En outre, l'autopsie a également révélé une hyperémie dans le foie et la rate de certains individus. Ces syndromes sont caractéristiques de ceux causés par la bactérie *Aeromonas hydrophila*. Cette bactérie est à l'origine d'importantes mortalités chez les civelles (jusqu'à 80%) et sa pathogénicité augmente avec la température (i.e. 17-22°C, Esteve et Garay, 1991, Esteve *et al.* 1993). En revanche cette bactérie affecte beaucoup moins les anguilles argentées (Esteve *et al.* 1993).

Des virus, notamment EVEX et l'*Herpesvirus anguillae* (HVA) pourraient également être à l'origine de ces fortes mortalités (Jakob *et al.* 2009). HVA est considéré comme la menace virale majeure chez les anguilles (Lehmann *et al.* 2005) à cause de sa très forte pathogénicité, en particulier lors des périodes estivales (Scheinert & Baath 2004, 2006 ; Jakob *et al.* 2009).

Dans la mesure où des amorces spécifiques ont été mises au point pour détecter la présence de ce virus (Rijsewijk *et al.* 2005), un essai a été réalisé sur 5 anguilles pour déterminer si ces individus étaient infectés. Ce test ne fut pas concluant et aucune bande indiquant la présence du virus ne fut détectée sur le gel de migration après amplification PCR.

Des traitements adaptés à une infection bactérienne (Desogerme 3A, Laboratoire ACI) avaient été effectués lors des épisodes d'épizooties rencontrés sur l'expérience décrite dans la première partie de cette thèse, sans toutefois obtenir de résultats probants. D'autres causes de mortalités peuvent être invoquées, telle que l'infection par le parasite nématode *Anguillicola crassus* qui est une des causes probables du déclin de la population d'anguilles (Kennedy 2007). Néanmoins, aucun nématode ne fut trouvé lors des autopsies réalisées sur les anguilles d'élevage, contrairement aux anguilles sauvages (5 individus sur 34 étaient infectés chez les anguilles prélevées dans l'Oir). L'augmentation du métabolisme associée à l'élévation de la température, pourrait également être la cause des mortalités.

Au vu des risques d'être infecté (virus et bactéries) lorsque les températures sont élevées, les conditions d'élevages choisies (17-20°C) peuvent paraître risquées. Néanmoins, ces choix résultent d'un compromis entre mortalité et croissance. En effet, de faibles températures compromettent sérieusement la croissance des anguilles (pas ou peu de croissance en deçà de 9°C, Tesh 2003). De fait, le sexe des individus n'aurait pu être connu dans le délai imparti (2 ans et demi), car les anguilles n'auraient pu atteindre la taille critique de 30 cm.

2. L'allocation sexuelle, l'expression conditionnelle du sexe (CSE) et le « Size-Advantage » modèle chez l'Anguille

2.1. Cadre Théorique

Bien que l'anguille ne soit pas une espèce hermaphrodite séquentielle, il est possible que l'allocation sexuelle (dans le cadre de notre étude, le fait de devenir mâle ou femelle à partir d'une gonade indifférenciée) soit liée aux conditions environnementales. On parle alors, de façon plus spécifique, **d'expression conditionnelle du sexe (ECS)**, un principe dérivé de la théorie de l'allocation sexuelle (Franck et Swingland, 1988) ou encore de stratégie conditionnelle appliquée au déterminisme du sexe. Cette stratégie peut être vue sous deux angles, qui se supportent mutuellement dans le cas de l'anguille :

(1) Le modèle dit « size-advantage » développé par Michael Ghiselin (1969, 1974) prédit que le sexe qui a le plus grand bénéfice (en termes de succès reproducteur) doit être celui qui a la plus grande taille à maturité. Cette théorie s'applique très bien chez les poissons hermaphrodites séquentiels qui bénéficient d'un plus grand succès reproducteur en changeant de sexe à partir d'une certaine taille. Dans le cadre de l'ECS, le déterminisme environnemental du sexe serait également une stratégie adaptative qui aurait évolué pour assurer aux plus gros individus de devenir le sexe chez qui la récompense d'être grand est la meilleure (Conover, 1984). Dans notre cas, l'investissement dans le sexe femelle chez l'anguille serait donc celui qui rapporterait le plus de bénéfices, mais cet investissement supporte aussi de plus grands coûts associés à un plus long développement.

(2) Chez les espèces avec un déterminisme environnemental du sexe, il a été suggéré que le sexe qui se développe dans des conditions non favorables est le plus abondant, *i.e.* il y aurait un biais vers le sexe le « moins coûteux » (Charnov, 1982 ; Bull, 1983). Ces prédictions ont ensuite été validées sur différentes espèces (Franck et Swingland, 1988).

Chez l'anguille, les mâles et les femelles ont développé différentes stratégies d'histoire de vie liées à leurs tailles, avec comme ligne directrice : la fécondité (Helfman *et al.* 1987). L'anguille constitue donc un modèle exceptionnel pour comprendre l'apparition de l'ECS car (1) et (2) vont de concert. En effet, chez cette espèce, les individus les plus gros sont les femelles (très grand dimorphisme sexuel, mais lié essentiellement à la taille à maturité, voir Fig. 69) et les individus majoritaires dans des conditions estimées comme « non favorables » (*i.e.* fortes densités) sont les mâles (sexe supposé « moins coûteux », ce que nous verrons par la suite).

2.2. Le size-advantage modèle chez l'anguille

2.2.1. L'avantage d'être femelle :

Chez les espèces où l'anisogamie est la règle, le nombre de spermatozoïdes est largement supérieur au nombre d'œufs produits et le succès reproducteur des femelles est en premier lieu limité par leur capacité à produire des œufs (*i.e.* taille des femelles). Le succès reproducteur des mâles est quant à lui, limité par la capacité des mâles à accéder aux œufs (Bateman, 1948).

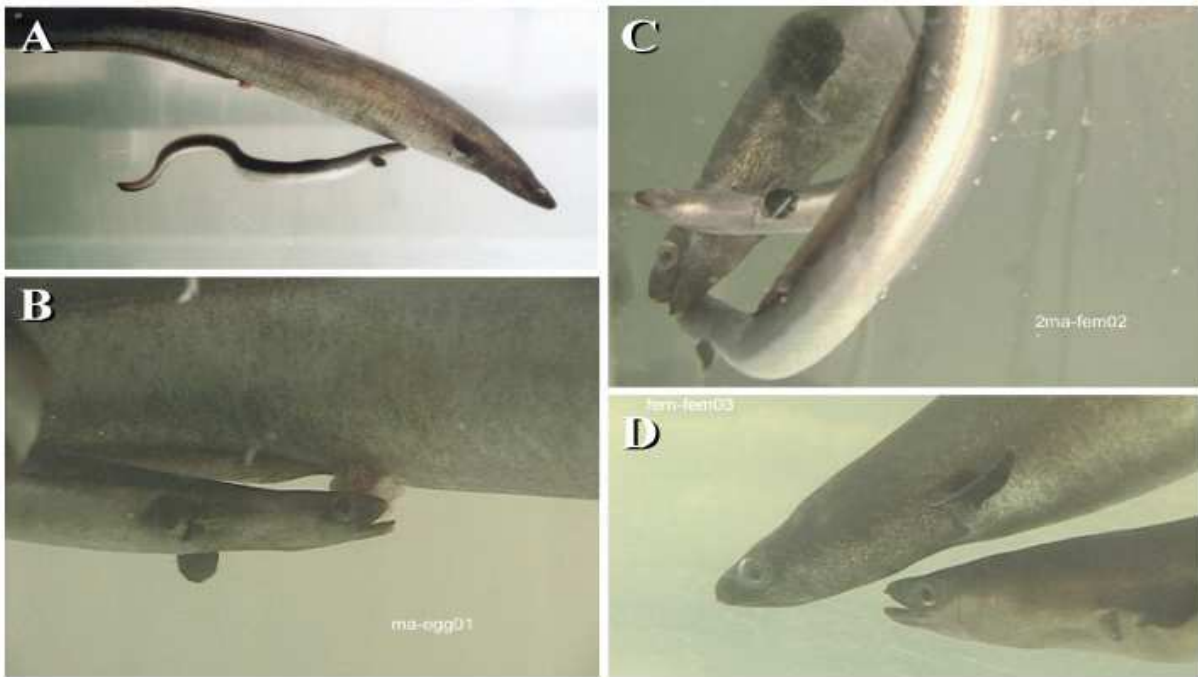


Fig. 69. A, B : Dimorphisme sexuel entre le mâle et la femelle au moment de la reproduction. C : plusieurs mâles entourent une femelle. D : interactions agressives entre femelles. D'après van Ginneken 2005

Partant de ce constat, on peut dissocier l'investissement parental (en termes d'énergie) chez les animaux en deux grands compartiments. L'investissement direct dans les gamètes et l'investissement indirect, dans les soins parentaux et la compétition. Au vu du mode de reproduction supposé de l'anguille (*i.e.* espèce sémelpare), il est peu envisageable qu'il y ait un investissement indirect dans la progéniture. En effet, il est probable que les réserves énergétiques de la plupart des individus soient complètement consommées au moment de la reproduction (Clevestam *et al.* 2011), de sorte qu'il ne reste plus d'énergie à allouer à la compétition intra-genres. Van Ginneken *et al.* (2005), semblent observer ce qui pourrait être des interactions agressives inter-mâles et inter-femelles au moment de la reproduction (Fig. 69), mais ses observations avaient lieu en laboratoire (maturation artificielle) et les anguilles n'avaient donc pas effectué de migration. Le grand dimorphisme sexuel qui existe chez cette espèce supporte l'hypothèse d'un faible (voire nul) investissement indirect, car chez les poissons, la compétition inter-mâle est minimisée lorsque ces derniers sont nettement plus petits que les femelles (Parker, 1992). Il est possible de considérer que chez l'anguille seul l'investissement direct caractérise la dépense énergétique associée au succès reproducteur. Dans ce cadre, le « size-advantage » modèle pour les mâles est contre-sélectionné (*i.e.* faible gain à être un gros mâle). Une réserve doit cependant être apportée, car la production d'œufs chez l'anguille est considérable (entre 0,7 et 14 millions, Boëtius et Boëtius, 1980 ; Tremblay, 2009). On ne sait pas dans quelle mesure la quantité de sperme produite dépasse la quantité d'œufs.

Chez la plupart des espèces, le poids des femelles est beaucoup mieux corrélé au poids de la gonade, que le poids des mâles (méta-analyse sur 656 espèces, Hayward et Gillooly, 2011). L'anguille ne fait pas exception à la règle : la taille de la gonade augmente de façon proportionnelle à la taille des femelles, ce qui est beaucoup moins vrai chez les mâles (Boëtius et Boëtius, 1980 ; Vøllestad et Jonsson, 1986 ; Vøllestad, 1992). Chez une espèce panmictique telle que l'anguille, si l'on considère que trouver un partenaire est difficile (du fait du « timing » et du peu d'énergie disponible pour la recherche), le succès reproducteur du mâle sera limité par la taille de la femelle qu'il rencontre (petite femelle = faible succès reproducteur), tandis que celui de la femelle ne sera pas limité par la taille du mâle qu'elle rencontre (en posant l'hypothèse que la quantité de sperme sera non limitante). De ce point de vue, il y a un bénéfice supérieur à être femelle au moment de la reproduction. Il est en effet prédit que lorsque la rencontre s'effectue de façon aléatoire, le succès reproducteur des mâles est limité par l'accès aux femelles (Mittwoch, 1996).

C'est particulièrement vrai chez les plantes où l'activité des pollinisateurs (part liée au hasard) limite le succès reproducteur des mâles, mais pas celui des femelles (Lloyd et Bawa, 1984). Si, au contraire, on suppose que tous les individus se reproduisent ensemble et au même moment (ce qui est observé en laboratoire Fig. 69, après maturation artificielle, van Ginneken *et al.* 2005), l'avantage d'être femelle n'existe que si le sex-ratio opérationnel est biaisé en faveur des mâles (ou que tous les mâles n'ont pas accès à une femelle). Compte tenu du cycle de vie raccourci des mâles comparativement aux femelles, l'hypothèse d'un sex-ratio mâle biaisé au moment de la reproduction est très probable (sauf si la mortalité lors de la migration génésique est beaucoup plus forte chez les mâles). Néanmoins, dans toutes les situations (sex-ratio biaisé vers les mâles ou vers les femelles), il est très probable que le recrutement des juvéniles soit conditionné par le nombre de femelles sur le lieu de reproduction (Aström et Dekker, 2007).

2.2.2. Conséquence d'être femelle : L'avantage d'être grand

L'avantage que peut procurer une grande taille, en plus de pouvoir plus investir dans la reproduction et de rencontrer moins de prédateurs potentiels, est d'arriver plus rapidement sur le lieu de reproduction. Chez la plupart des poissons, et notamment l'anguille, les performances de nage augmentent avec la taille des individus (Ware, 1982). La vitesse optimale de nage est en effet plus faible chez les petites anguilles *Anguilla anguilla* que chez les grandes (Palstra, 2006) et la consommation relative d'énergie est supérieure chez les petits individus (Brett et Groves, 1979). A partir d'une méta-analyse, Jessop (2010) montre que la taille des femelles augmente avec la distance au lieu de ponte, ce qui suppose qu'elles seraient capables d'estimer ce coût de la migration. Pour les mâles, leur petite taille les contraindrait à nager en groupe afin de minimiser les coûts liés aux frictions (Burgerhout *et al.* 2010). De façon générale, une grande taille est souvent associée à une meilleure résistance aux stress environnementaux et à une meilleure capacité à échapper à la prédation (Taborsky *et al.* 2003 ; Brown et Sibly, 2006).

2.2.3. Coûts associés au fait d'être femelle

Les possibles bénéfices que peuvent retirer les femelles lors de la phase marine résultent d'un compromis entre mortalité et croissance lors de la phase continentale. En effet, les coûts associés à un long développement sont généralement caractérisés par un risque accru de mortalité liée à la prédation ou à la rencontre de conditions non favorables (Roff, 1992). Abstraction faite du temps de résidence en eau douce, les femelles ont une mortalité supérieure aux mâles pour des poids équivalents (Bevacqua *et al.* 2011).

A partir de modèle conceptuel on pourrait s'attendre à ce que tous les individus deviennent femelles, dans la mesure où, le succès reproducteur associé à ce sexe est en théorie « supérieur » à celui des mâles (dans presque toutes les situations). Mais cette stratégie dépend des conditions du milieu qui vont permettre ou non, d'atteindre une taille suffisante pour que ce succès reproducteur soit maximisé. Cela suppose que les individus sont capables d'estimer la « valeur » des conditions locales.

La théorie développée à partir des éléments précédemment exposés est celle de l'expression conditionnelle du sexe où :

La valeur sélective d'un individu est maximisée s'il devient femelle, mais cette stratégie n'est possible que si la capacité d'accueil du milieu est optimale pour le bon développement (taille) et surtout la survie de ce sexe : stratégie « size-maximizing ». Dans le cas contraire, les individus se développent en mâles et quittent le milieu le plus tôt possible stratégie « time-minimizing ».

Pour vérifier cette théorie, il faut 1) que le coût de devenir femelle pendant la phase continentale soit effectivement supérieur à celui de devenir mâle et 2) que certaines conditions physiologiques et environnementales soient réunies pour permettre aux femelles d'assurer une croissance plus longue.

2.3. Expression Conditionnelle du sexe chez l'anguille

Peu d'éléments de la littérature, tels qu'ils ont été présentés, permettent d'appuyer ce raisonnement. Mais l'apport de nos données permet de développer une argumentation qui tient en deux principaux points :

- (1) Le coût physiologique de devenir femelle est supérieur à celui des mâles
 - a) Au stade anguille argentée
 - b) Au stade anguille jaune
- (2) Les facteurs déclenchant le « choix » de devenir femelle sont :
 - a) Facteur intrinsèque : Le statut énergétique des civelles-anguillettes
 - b) La capacité d'accueil du milieu.

2.3.1. Le coût physiologique de devenir femelle est supérieur à celui des mâles

Estimer le coût énergétique du développement de la gonade est une tâche ardue car il faut dissocier la part énergétique liée au développement des tissus somatiques de celle liée au développement des tissus reproductifs. Ce type d'expérience a par exemple été possible chez les huîtres, car les individus triploïdes ne se reproduisent pas et le développement des gonades est limité. En comparant des huîtres diploïdes et triploïdes (*Saccostrea glomerata*), Honkoop (2003) montre que 27% de l'oxygène consommé est nécessaire pour la mise en place et le maintien du tissu reproducteur. De plus, chez cette espèce les coûts associés au développement de la gonade sont 84% supérieurs aux coûts alloués à l'accroissement et au maintien du tissu somatique.

En ce qui concerne les différences mâles-femelles, une récente méta-analyse a permis d'estimer le coût énergétique de la production de gamètes chez 656 espèces dont 98 espèces de poissons (Hayward et Gillooly, 2011). Les auteurs montrent qu'une partie fixe du métabolisme est allouée à la production en biomasse de gamètes. Les mâles investissent environ 0.1% de l'énergie utilisée pour le métabolisme de base (\approx standard) dans la production en biomasse de gamètes, tandis que les femelles en utilisent 300%. Les auteurs déduisent de leur étude que le coût de la production d'œufs est approximativement d'un ordre de magnitude 3.5 fois supérieur au coût de la production de sperme (Hayward et Gillooly, 2011).

- a) Au stade anguille argentée

Tout d'abord il convient d'établir que le déclenchement de la maturation et de la migration est lié au statut énergétique des anguilles. Le concept de Shulman (1974) propose qu'un taux minimal de lipides doit être atteint par les poissons avant que le processus de maturation soit enclenché. L'anguille ne fait pas exception à la règle et il semble que le contenu lipidique

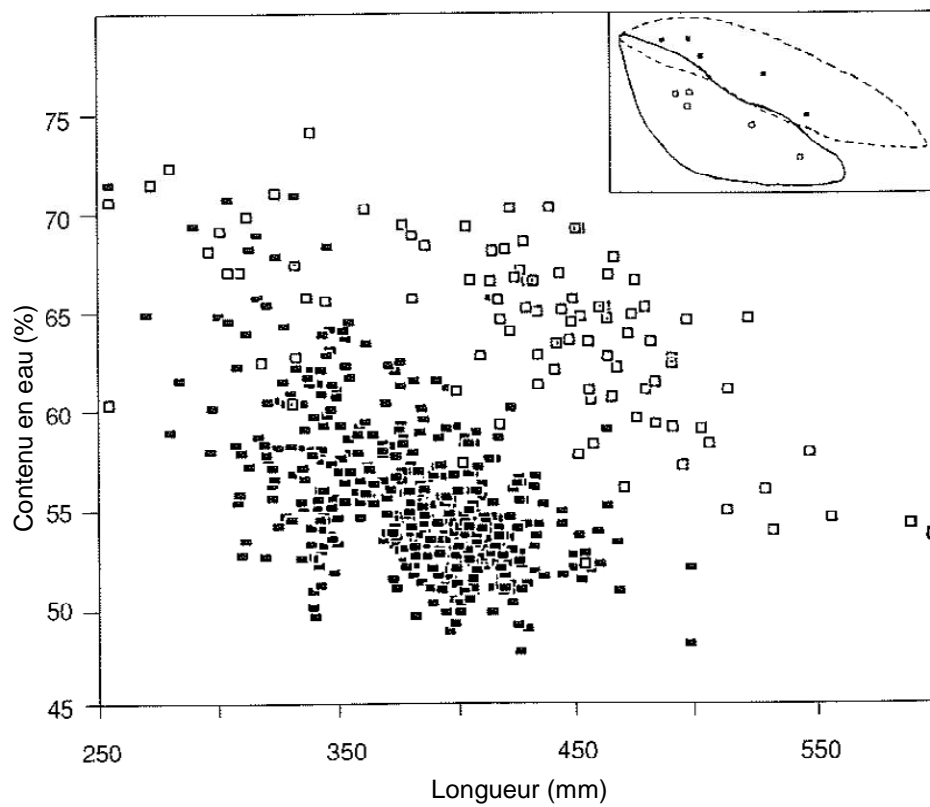


Fig. 70. Contenu en eau chez les femelles (carré vide) et les mâles (carré noir). Modifié d'après Holmgren et Wickström (1993).

détermine le moment de la prise d'argenture (Larsson *et al.* 1990 ; Svedäng et Wickström 1997, Clevestam *et al.* 2011), bien que d'autres auteurs ne soient pas aussi catégoriques (Durif *et al.* 2005). Cette prise d'argenture a lieu quelques semaines/mois avant la migration (Fontaine, 1994). Les lipides sont essentiels à la migration, puisqu'ils constituent l'apport énergétique principal ($\approx 80\%$) lors de cette phase (van Ginneken *et al.* 2005). Les coûts en lipides ont été estimés à 11-17 mg de lipides/kg/km, pour la migration (Palstra et Van den Thillart, 2010). Belpaire *et al.* (2009) ont estimé que 67 gr de lipides sont nécessaires à une anguille de 860 gr pour parcourir les 6000 km qui la séparent du lieu de ponte, ce qui est proche de l'estimation précédente (66-102 gr). Larsson *et al.* (1990) vont plus loin, et proposent que la métamorphose ne puisse avoir lieu qu'une fois le seuil critique de 28% de lipides, atteint. Ce seuil semble en effet correspondre aux seuils évalués par d'autres études (Clevestam *et al.* 2011). Ces auteurs posent l'hypothèse que certaines anguilles pourraient sur-évaluer ou sous-évaluer la quantité d'énergie nécessaire pour rejoindre le lieu de la reproduction (selon cette étude, 20% des anguilles auraient sous-estimé la quantité de réserve nécessaire). Chez les saumons également, la décision de déclencher la maturité semble liée à la quantité de lipides accumulés (Rowe *et al.* 1991). D'autres auteurs ont émis l'hypothèse que la quantité de protéines accumulées serait le facteur principal déclenchant la maturation et l'argenture (Heinsbroek *et al.* 2007).

Le facteur de condition est un très bon indicateur de la quantité de lipides présent chez l'anguille (Belpaire *et al.* 2009). A partir d'une étude portant sur 387 anguilles migrantes, Clevestam *et al.* (2011) ont montré que la variation du coefficient de condition entre anguilles migrantes était très faible ($K = 2 \pm 0.2$). Quelque soit le scénario (lipide, protéines, taille ...), il apparaît clairement que la condition de l'individu est un proxy bien corrélé à la décision de devenir mature et de migrer. Cette décision pourrait donc être retardée chez les femelles, dans la mesure où l'investissement d'énergie dans l'ovaire dépasse largement l'investissement dans le testicule. En effet, chez les individus argentés, la masse du testicule atteint rarement 15% du poids sec final alors que la masse de l'ovaire peut atteindre 60 % du poids sec final chez les femelles (Boëtius et Boëtius 1967, 1980 ; Larsson *et al.* 1990).

b) Au stade Anguille Jaune

Etant donné le fait que l'énergie investie dans le développement des gonades est plus importante chez les femelles que chez les mâles (au moins au stade argenté), on peut supposer

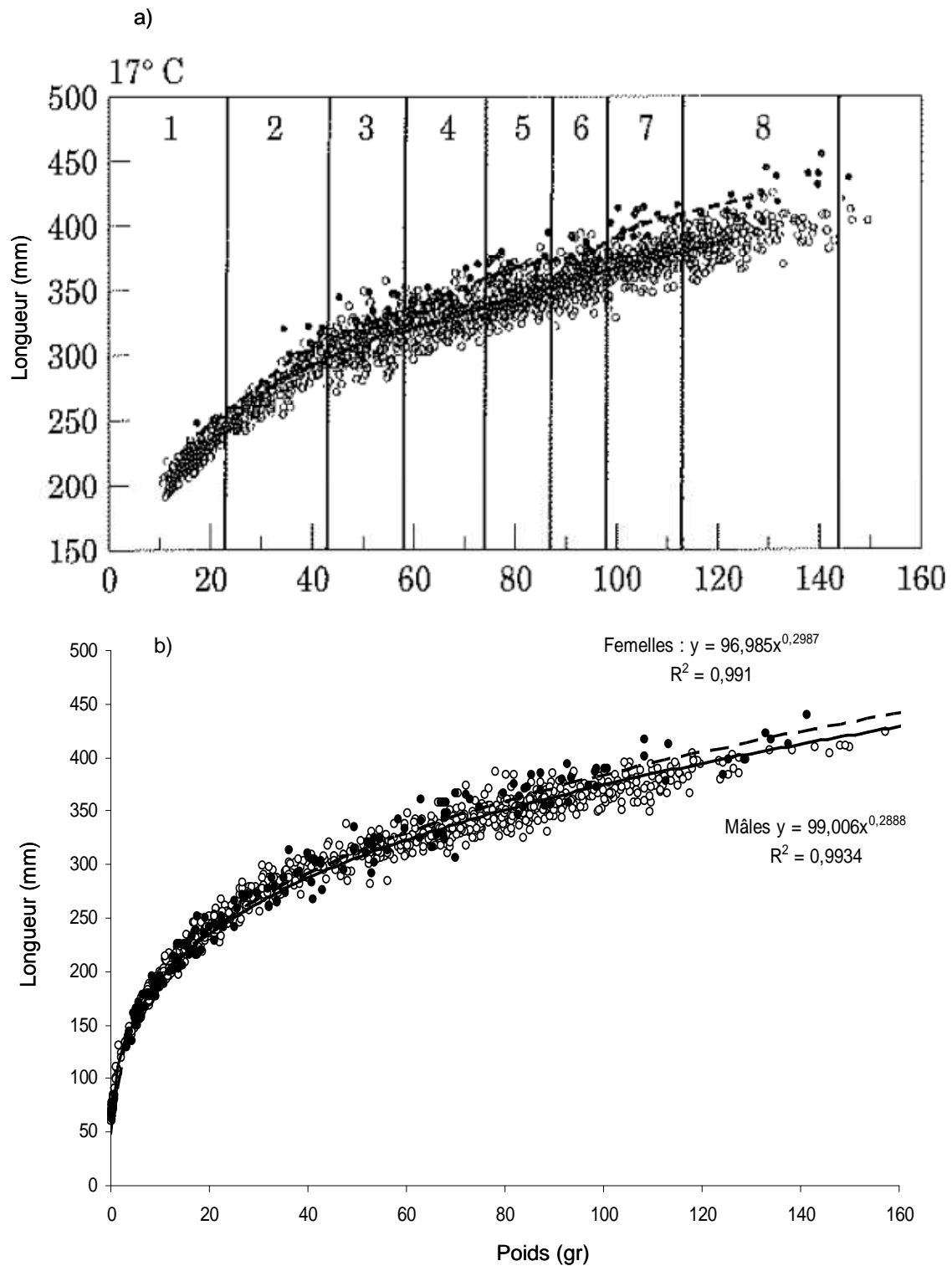


Fig. 71. Relation poids/longueur chez des individus marqués a) individuellement à partir de 10 gr (18-22cm) à 17°C, d'après Holmgren et Mosegaard, 1996 et b) individuellement depuis le stade civelle à 17°C et sexes via l'histologie (expérience Partie 2). Les points noirs représentent les femelles et les points blancs, les mâles.

que le timing d'allocation d'énergie dans les tissus, autres que la gonade, diffèrent entre mâles et femelles (*i.e.* les mâles deviennent matures plus tôt, car ils atteignent le seuil d'énergie nécessaire pour partir plus tôt : time-minimizing strategy). C'est ce que suggèrent nos résultats. On a pu observer que les différences de croissance en taille étaient très faibles entre mâles et femelles, mais semblent plus importantes pour la croissance en poids, si l'on considère que les individus ont le même indice allométrique ($b=3$) (cf chapitre 8). En effet, le facteur de condition des femelles est significativement plus faible que celui des mâles à partir de 1.5 an et cette différence s'accroît par la suite pour devenir significative à partir de deux ans d'élevage (cf chapitre 8, Fig. 71). Des résultats similaires ont été obtenus par Holmgren et Mosegaard, (1996) (Fig 71b) qui ont suivi la croissance individuelle d'anguilles à partir de 18-22 cm. Ces auteurs constatent que dès 28 cm, les femelles ont un poids inférieur à celui des mâles, pour une longueur équivalente (*i.e.* un coefficient de condition plus faible). Ces différences s'accroissent jusqu'à au moins 35 cm (Holmgren et Mosegaard, 1996).

De façon générale, seule la quantité de lipides augmente au cours du développement, passant de 37 à 60% du poids sec de l'anguille entre le stade anguillette (9 gr) et le stade argenté (420 gr) (Degani *et al.* 1986). Les quantités des autres composants de la matière sèche, que sont les protéines et les cendres, diminuent en proportion (Degani *et al.* 1986). En effet, à mesure que les individus croissent, la masse grasseuse remplace progressivement l'eau contenue dans les anguilles (Degani *et al.* 1986 ; Holmgren et Wickström, 1993). Ce remplacement est plus rapide chez les mâles que chez les femelles (Boëtius et Boëtius, 1985 ; Holmgren et Wickström, 1993) (Fig. 70). D'autres auteurs ont abouti aux mêmes conclusions (Appelbaum et Kugler, 1990 ; de Boer et Hagel, 1994 ; Kushnirov et Degani, 1995). Kushnirov et Degani (1995) ont montré que les anguilles jaunes (33-47 cm) femelles avaient un facteur de condition significativement plus faible que celui des mâles et ont ainsi pu discriminer les sexes avec une grande certitude (95%) sur cette simple mesure. Les auteurs proposent que la perte d'énergie accumulée soit liée au développement de l'ovaire et constatent que cette différence de poids entre mâles et femelles n'est ni liée à une consommation différentielle de nourriture ni à un ratio de conversion différentiel de nourriture. Bien que le poids de l'ovaire ne représente pas une grande proportion du poids total, il est néanmoins 7 fois plus important que le poids des testicules au stade anguille jaune (RGS des mâles = 0.05 et RGS des femelles = 0.34 pour les femelles, Durif, 2000).

Pour conclure cette partie, on peut considérer soit que le coût de devenir femelle est plus important que celui de devenir mâle (ce que suggèrent Kushnirov et Degani, 1995), ce qui se traduit par un investissement plus faible dans le gain de masse, soit que les femelles

Sections	Réervoir	Poids moyen en grammes atteint par les Civelles du Groupe I, à									Dimension moyenne en millimètres atteinte par les Civelles du Groupe I, à								
		6 mois	1 an	2 ans	3 ans	3 ans Sm.	4 ans	4 ans Sm.	5 ans Sm.	7 ans	6 mois	1 an	2 ans	3 ans	3 ans Sm.	4 ans	4 ans Sm.	5 ans Sm.	7 ans
		A	I	1,5	2,5	15.	74.	71.	-	-	-	-	84.	119	230	324	324	-	-
B	IV	1,6	3,8	16.5	96.5	94.	-	-	-	-	86	126	239	365	365	-	-	-	-
C	VII	1,6	4,3	17.2	97.5	95.	-	-	-	-	88	129	244	376.5	377	-	-	-	-
D	X	1,5	3.	15.5	79.	79.	-	-	-	-	84.5	119.5	234.5	330.5	330	-	-	-	-
E	XIII	1,8	4,5	21.6	118.	115.	-	-	-	-	89.5	133	246.5	406.5	407	-	-	-	-
Groupe II																			
A	II	1,9	9.	42	145	-	190	190	-	-	109.5	182.5	341	445	-	550	551	-	-
B	V	2,1	10.3	45	148.5	-	255	256	-	-	106.	190.	347.5	471	-	570	569.5	-	-
C	VIII	2,1	12.	49	152.	-	260	259	-	-	118.	200.	362.	487	-	573	574.5	-	-
D	XI	2.	9.8	43.7	147	-	195	195	-	-	111.	186.	344.5	450	-	560	561.	-	-
E	XIV	2,2	15.	58.1	163	-	345	340	-	-	120.	204.	373.5	532.5	-	665	663.5	-	-
Groupe III.																			
A	III	2,4	16	160	325	-	620	-	-	740	130.5	246	496.	582.5	-	650	-	-	790
B	VI	3.	19	167	348	-	710	-	1255	-	134.	275	507.5	595.	-	678	-	830	-
C	IX	3,3	24.5	177	355	-	728	-	1308	-	137.	291	516.	622.5	-	695	-	833	-
D	XII	2,6	17.	165	330.5	-	645	-	-	844	131.5	254.5	499.	585.5	-	665	-	-	845
E	XV	4.	43.	192	405	-	865	-	2115	-	141.5	301.3	529.5	627.5	-	715	-	906	-

Tableau 18 : Suivi de la croissance de civelles de 3 groupes de taille initiale, Groupe I : 56-61 mm Groupe II : 65-73 mm Groupe III : 78-84 mm, sur 7 ans. D'après Bellini, 1907.

Résumé						
	Nombre de Civelles déversées	Nombre d'Anguilles pêchées.	Perte sur le nombre de Civelles déversées	Poids en kgs des Anguilles pêchées.	Production en kgs. par hectare	Production en kgs. par hectare et par an.
Groupe I	632	525	14 %	48.160	184.200	49.800
" II	632	536	14,2%	130.860	505.800	108.000
" III	362	{ 38 15	84,8%	{ 58.900 12.040	462.800	68.600

Tableau 19 : Résumé de l'expérience menée par Bellini, 1907 sur la survie et la production obtenue par des civelles appartenant à 3 groupes de taille initiale, Groupe I : 56-61 mm Groupe II : 65-73 mm Groupe III : 78-84 mm.

investissent dans la longueur plutôt que dans le poids. Nos résultats associés à ceux de Holmgren et Mosegaard (1996), supportent la première hypothèse, car dans nos conditions d'élevage, la croissance en longueur est également supérieure chez les mâles pendant la phase anguille jaune.

2.3.2. Les facteurs déclenchant le « choix » de devenir femelle

a) Facteur intrinsèque : Le statut énergétique des civelles-anguillettes

Bellini (1907) fut, à notre connaissance, le premier à avoir réalisé des expériences portant sur la taille initiale des individus en formant 3 lots (en quintuplat) placés dans des conditions de densité similaires et très faibles (0,3 ind/m²) :

- 56-61 mm (Groupe I)
- 65-73 mm (Groupe II)
- 78-84 mm (Groupe III)

Il note cependant que toutes les civelles étaient alors transparentes (en insistant sur ce fait pour les individus classés dans le groupe III). Dès 3 ans d'élevage il constate la prise d'argenture chez les individus du premier groupe et un grossissement des yeux. Sur 360 anguilles disséquées du groupe 1, 99% étaient des mâles. Les anguilles du groupe II sont devenues argentées à partir de 4 ans et celles du groupe III, entre 6 et 7 ans. Selon l'auteur, toutes les anguilles des groupes II et III sont devenues des femelles (Le tableau 18 issu de son étude résume les résultats de croissance). On peut remarquer que la croissance des individus du groupe II (Femelles) est supérieure en poids et en taille à celle du groupe I (mâles), pour des mortalités finales similaires (≈ 14%, Tableau 19). Cela peut être dû aux conditions très favorables de densités dans le milieu (0.3 ind/m²) qui ont permis de compenser la potentielle perte de poids observée dans des conditions d'aquaculture (dans notre expérience 62 et 650 ind/m²). Dans des rivières très eutrophes, avec une faible compétition intraspécifique, la proportion de femelles dépasse très largement celle des mâles (entre 88 et 98% de femelles, Bark *et al.* 2007).

En 1966, Vladykov propose également que les civelles destinées à devenir femelle seraient plus grosses que celles destinées à devenir mâle, en se basant sur le simple constat que la taille à maturité des femelles est supérieure à celle des mâles. Une étude menée par la suite en collaboration avec Liew (1982), lui permit d'étayer sa thèse.

Dans cette étude où 9000 civelles (≈ 130 mg) d'*Anguilla rostrata* avaient été placées dans un lac artificiel (densité 2.25 ind/m²), une plus grande proportion de mâles avait été détectée (71%) comparativement à une autre expérience conduite dans le même lac (entièrement vidé) 3 ans plus tard. 7000 individus (≈ 220 mg) avaient été placés (densité 1.75 ind/m²) produisant seulement 27 % de mâles (Vladykov et Liew, 1982). Cela suggère que 1) le nombre d'individus pourrait avoir un impact sur le sex-ratio final (bien que les densités aient été relativement similaires) et 2) qu'un fort poids initial pourrait conduire au développement de femelles.

Notre étude suggère que le facteur de condition (CF) serait un des éléments clefs de la décision de devenir femelle (Chapitre 8, Fig. 62c), potentiellement en lien avec un développement futur plus coûteux et plus long. Cependant, le faible nombre de femelles suivies individuellement pendant les premiers mois de l'expérience n°2 (n = 4, puis 5, puis 11 entre 0 et 6 mois) ne permet pas de conclure. Dans la première partie de l'étude, on a pu remarquer qu'un faible CF initial était corrélé à une forte croissance en poids (Geffroy et Bardonnnet, 2012). La deuxième partie de l'étude suggère également qu'un faible CF initial est associé à une plus forte croissance. Ce phénomène, appelé croissance compensatoire, est également connu chez de nombreuses autres espèces (revue de Ali *et al.* 2003) telles que la morue, *Gadus morhua*, (Pedersen et Jobling, 1989) et le saumon Atlantique *Salmo salar* (Reimers *et al.* 1993). Ainsi, à partir de l'expérience 2, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'un faible CF initial conduit à une forte croissance compensatoire et au développement mâle. Cependant cette stratégie de croissance compensatoire engendre des coûts à long terme (Stamps, 2007) et pourrait contraindre les mâles à devenir mature le plus tôt possible. Au contraire, un fort CF initial pourrait permettre une croissance plus lente au début, mais de plus longue durée.

Le fort coefficient de condition initial peut également expliquer les différences d'habitat entre mâles (zone aval) et femelles (zone amont) dans le bassin versant. En effet, Edeline *et al.* (2006) montrent que les individus avec un fort coefficient de condition migrent préférentiellement vers l'eau douce plutôt que l'eau salée lorsque le choix leur est donné. A l'inverse, les civelles avec des coefficients de condition plus faibles ont une préférence pour l'eau salée (Edeline *et al.* op. citation).

Par ailleurs, la période d'arrivée est associée à une utilisation différentielle du bassin versant. Dans la mesure où les individus qui arrivent à l'automne ont un facteur de condition et des réserves énergétiques supérieures à ceux qui arrivent au printemps (Guérault *et al.* 1995 ; Briand *et al.* 2003a ; Geffroy et Bardonnnet, 2012), on peut supposer que ces individus

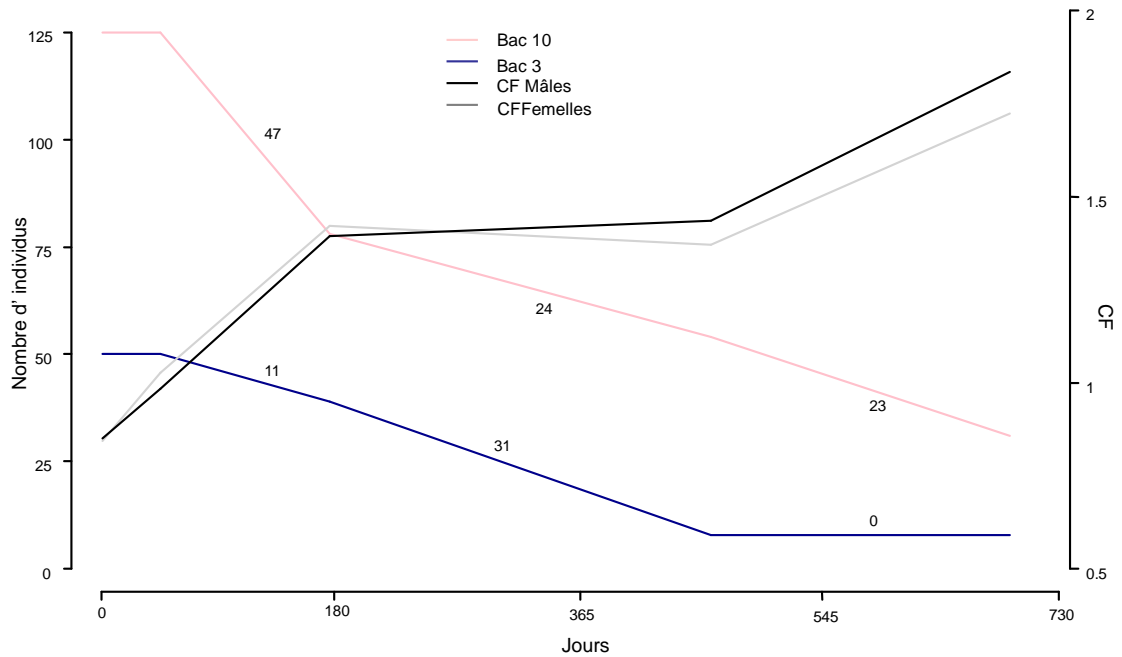


Fig. 72. Evolution de la survie dans le bac 10 (en rose) et le bac 3 (en bleu) pendant les deux premières années de croissance. Les bacs 10 et 3 sont tous deux de grands bacs avec respectivement 156 et 62 ind/m². Le bac 10 a produit 40% de femelles et le bac 3, 13% de femelles. Le facteur de condition (CF) de toutes les femelles suivies pendant l'étude est supérieur à celui des mâles (mais non significatif) pendant les 6 premiers mois de l'expérience 2.

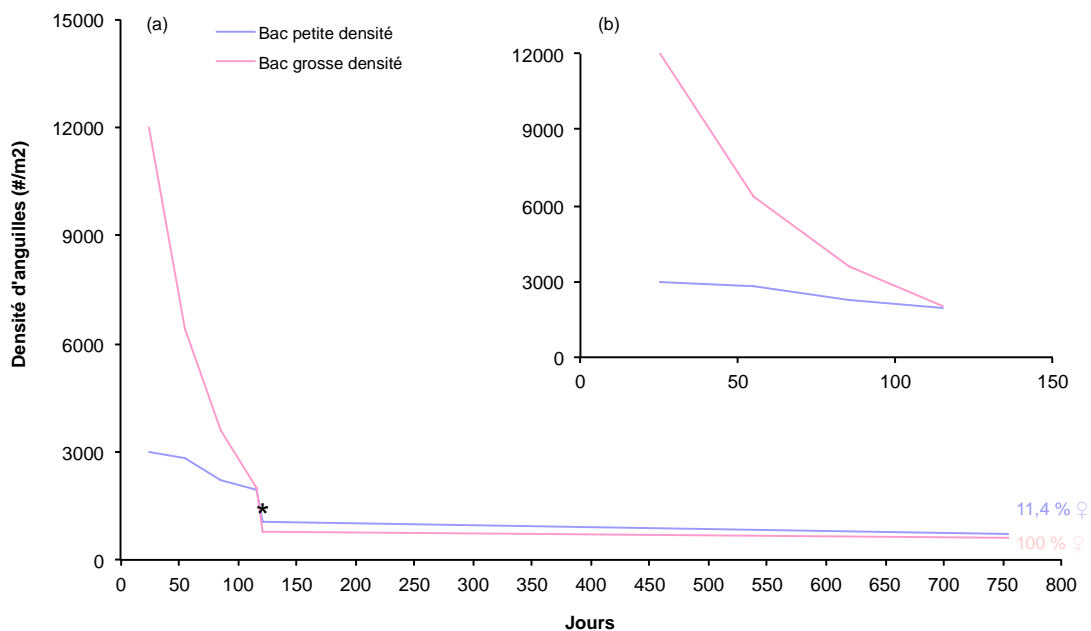


Fig. 73. (a) Evolution de la survie moyenne (n= 6 bacs) par condition de densité initiale (le nombre d'individus est représentatif des plus fortes = 12000 ind/m² et plus basses = 3000 ind/m² densités). Après 755 jours d'élevage à 26°C, 11,4 % des individus sexés étaient femelles dans la condition de faible densité initiale et 100% de femelles dans la condition initiale de forte densité. (b) Agrandissement de la première partie de l'élevage. * Une partie des individus est utilisé pour une analyse biochimique. D'après Huertas et Cerdà (2006).

possèdent un avantage pour la colonisation du bassin versant (Edeline *et al.* 2006 ; Sullivan *et al.* 2009) et l'utilisation de niches écologiques vacantes, ce qui semble être corroboré par l'étude de Briand *et al.* (2003).

Au vu de ces résultats, il semble évident que la densité, seule, ne peut expliquer la production différentielle de mâles et de femelles. Le contenu énergétique des individus lors des premiers mois de croissance en eau douce pourrait donc participer à la détermination du sexe des individus par deux voies non exclusives :

- Un facteur de condition élevé peut orienter le développement vers la différenciation du sexe femelle (plus coûteuse en énergie).
- Un facteur de condition élevé permet l'utilisation d'un habitat moins compétitif et donc plus favorable à des individus qui ne sont pas engagés dans un processus de croissance compensatoire.

b) La capacité d'accueil du milieu.

Il est également possible que les individus soient capables d'estimer la « qualité » du milieu. C'est ce que suggèrent nos résultats. Dans le chapitre 8 on a pu se rendre compte que les conditions réunissant le plus d'individus produisaient significativement plus de femelles ; ce qui peut paraître paradoxal. En effet, seuls les résultats de Huertas et Cerdà (2006) montrent que de hautes densités conduisent à une sex-ratio biaisée vers les femelles. Néanmoins, leurs données sont entachées par les fortes mortalités rencontrées dans leurs conditions de densités élevées.

Dans la seconde partie de cette thèse, deux bacs de même dimension (bac 3 et bac 10) ont présenté de très importantes mortalités après 2 ans d'élevage ($\approx 80\%$, Chapitre 8). Le bac 3 qui réunissait le plus faible nombre d'individus au départ (50) a produit significativement moins de femelles (13 %) que le bac 10 (40%), qui contenait initialement 125 civelles. Dans ces deux bacs, tous les individus ont été sexés. De façon intéressante on a pu constater que les plus importantes mortalités n'avaient pas eu lieu au même stade de l'ontogénèse des anguilles en fonction des bacs (Fig. 72). En effet, le pourcentage de mortalité est nettement plus important dans le bac 10 (38%) que dans le bac 3 (22%) pendant les 6 premiers mois (Fig. 72). Il convient de mentionner que la distribution de nourriture (chironomes) représentait 10% de la biomasse totale pendant les 6 premiers mois et que la nourriture ne pouvait être ajustée au jour le jour, au nombre d'individus restant. L'ajustement de la quantité de nourriture se faisait au moment des pesées. A biomasse égale, le bac 10 a pu recevoir jusqu'à

1.7 fois plus de nourriture que le bac 3, durant ces 6 premiers mois. La plus forte proportion de femelles trouvée dans la condition 125 individus pourrait donc être liée à de meilleures conditions de croissance dues aux plus fortes mortalités durant les 6 premiers mois dans ces bacs (mortalité moyenne bacs 125 individus = 35%), comparativement aux bacs de 50 individus (moyenne = 25%).

Après avoir reconstruit les courbes de survie pour les conditions faibles et fortes densités initiales de Huertas et Cerda (2006), on constate également une très forte mortalité dans les conditions de forte densité durant les 6 premiers mois (Fig. 73). Ce qui n'est pas le cas de la condition de faible densité. La forte densité initiale a produit 100% de femelles, contre 11.4% pour la faible condition de densité initiale.

Dans ces deux études, les conditions de croissance se sont brusquement améliorées pour les bacs contenant de fortes densités initiales. Cela suggère que la densité *per se* ne serait pas le facteur qui régule la proportion de mâles et de femelles, mais plutôt l'estimation faite par les individus de la qualité de l'environnement local. En effet, nos résultats suggèrent que l'amélioration soudaine des conditions pendant une période critique (ici \approx 6 mois), conduise au développement femelle. On remarque également que la période durant laquelle ces changements ont lieu, correspond à la période pendant laquelle les femelles semblent avoir un coefficient de condition supérieur aux mâles (Fig. 72).

Il semblerait en tout cas, que les anguilles adultes soient capables d'estimer la qualité du milieu et d'y répondre par l'ajustement de variables physiologiques. En effet, dans le cas où des femelles viennent à se trouver dans des zones de forte densité, ces dernières deviennent matures le plus tôt possible (*i.e.* elles adoptent la même stratégie que les mâles, De leo et Gatto, 1996). Selon ces auteurs, les conditions locales s'appauvrissent et rester une année supplémentaire augmente les risques de mortalité.

2.4. Conclusion sur l'expression conditionnelle du sexe

2.4.1. Chez l'anguille

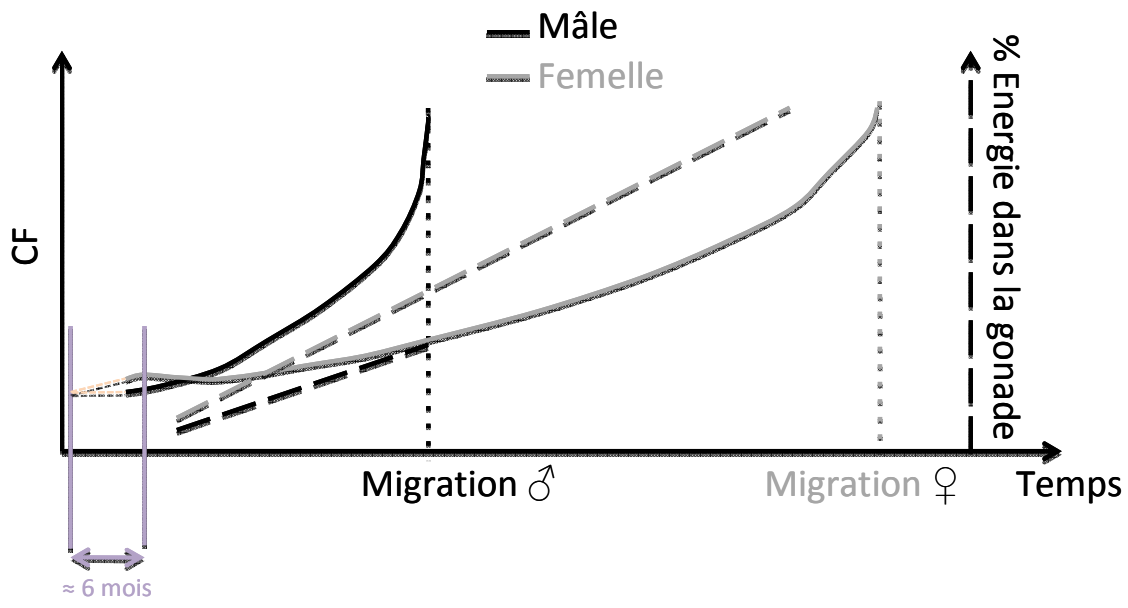
La théorie développée ici ne vaut que si le succès reproducteur des femelles est supérieur à celui des mâles et que si le déterminisme environnemental du sexe chez l'anguille est une stratégie évolutivement stable. Les conditions exposées par Charnov et Bull (1977), pour expliquer l'émergence d'un déterminisme du sexe sous l'influence de facteurs environnementaux, paraissent réunies chez cette espèce :

- L'habitat affecte la valeur sélective de chaque sexe de façon différente
- Les géniteurs n'ont pas ou peu de contrôle sur l'environnement dans lequel entrent leurs progénitures.
- La reproduction se réalise entre individus qui proviennent de différents environnements.

Au vu du cycle de vie de l'anguille, il semble peu probable que le déterminisme du sexe sous l'influence de l'environnement soit supplanté par un déterminisme strictement génotypique. En effet, si les mâles pouvaient se développer dans un environnement « bon » ou « mauvais » et atteindre le lieu de reproduction, ce ne serait vraisemblablement pas le cas des femelles, qui ne peuvent pas accumuler l'énergie nécessaire pour la migration et la reproduction dans un environnement « mauvais » (à moins de produire beaucoup moins d'œufs).

Dans ce cadre théorique, tous les individus essaieraient de devenir femelles et ne deviendraient mâles que lorsque les bonnes conditions ne sont pas réunies. Cela suppose que les individus soient capables d'estimer la qualité du milieu au temps t , mais également de prédire cette qualité du milieu au temps $t + 1$.

De façon générale, les fortes densités sont associées à d'importantes mortalités, spécifiquement chez les juvéniles de poissons (Myers et Cadigan, 1993). Chez les civelles, les taux de mortalité augmentent à mesure que les densités augmentent (Degani et Levanon, 1983 ; Huertas et Cerda, 2006, cette étude). De plus, chez de nombreux poissons et agnathes la croissance diminue lorsque la densité augmente (Allen, 1974 ; Trzebiatowski *et al.* 1981 ; Murdoch *et al.* 1992 ; Docker et Beamish, 1994). La densité pourrait donc être assimilée par les individus à de mauvaises conditions de croissance et/ou de fortes mortalités [risque de transmission de pathogènes, stress (Barton, 2002) et cannibalisme accru, (Degani et Levanon, 1983)]. Ainsi les individus chercheraient à quitter un milieu défini comme peu favorable à long terme, pour se sédentariser dans un milieu où la compétition serait minimisée. Cependant, seuls les individus en bonne condition (fort CF) auraient la capacité de quitter ce milieu non favorable à long terme. Si les individus ne peuvent quitter ces zones, alors ils deviennent mâles. Chez les adultes, il a été montré que les mâles se trouvaient préférentiellement dans des rivières proches de leurs capacités maximales d'accueil, ce qui n'est pas le cas des rivières dans lesquelles une majorité de femelles sont capturées (Bark *et al.* 2007). Un bon facteur de condition pourrait également permettre l'initiation de la différenciation ovarienne, sexe plus coûteux à long terme. Dans les conditions d'aquaculture,



Estimation des conditions locales :

- Propices à une bonne croissance à long terme (↘ densité, ↗ nourriture...) → Femelle
- Non-Propices à une bonne croissance à long terme (↗ densité, ↘ nourriture...) → Mâle

Fig. 74. Schéma de l'expression conditionnelle du sexe chez l'anguille. Les différences de CF (en trait plein) doivent être minimisées en conditions naturelles. Les individus avec un fort CF initial peuvent également chercher un endroit plus propice à la croissance. Les lignes en pointillés représentent le % d'énergie investie dans la gonade au cours du temps (ce qui n'est pas forcément reflété par le poids de la gonade).

les densités sont telles, qu'une bonne croissance **à long terme** ne peut être envisagée pour la majorité des individus. **A court terme**, en revanche, les conditions sont optimales pour la croissance compensatoire des petits individus, à condition qu'ils accèdent à la nourriture.

Nous avons montré que les petits individus étaient ceux qui se nourrissaient le plus (et chapardaient le plus de chironomes) et avaient la meilleure croissance durant les premiers mois (Geffroy et Bardonnnet, 2012). Il est intéressant de noter que les études qui mettent en évidence une croissance légèrement meilleure pour les mâles sont réalisées en condition d'élevage (Kuhlman, 1975 ; Kushnirov et Degani, 1995 ; Holmgren et Mosegaard, 1996 ; cette étude). Ainsi, le coût de devenir femelle pour les civelles-anguillettes en conditions de croissance rapide (élevage), serait plus important que celui de devenir mâle. Ceci se traduit par des croissances similaires entre sexes, voire supérieure pour les mâles. En revanche dans les conditions naturelles, la croissance est généralement plus lente qu'en condition d'élevage pour tous les individus, et ce sont les femelles qui alors présentent la meilleure efficacité de croissance (Bellini, 1907 ; Poole et Reynolds ; 1996, Bark *et al.* 2007 ; Jessop 2010 ; Daverat *et al.* 2012, mais voir chapitre 8 pour l'estimation de la croissance à partir d'otolithes). Cependant, cette croissance légèrement meilleure des femelles en conditions naturelles a récemment été remise en question par l'étude de Bevacqua *et al.* (2012) qui montrent que l'exploitation par pêche, en éliminant préférentiellement les individus à forte croissance, pourrait donner une image faussée des performances de croissance par sexe (à l'avantage des femelles).

L'estimation de la qualité du milieu par les individus pourrait donc être le mécanisme clef de la différenciation du sexe. **Si le milieu est considéré comme favorable ou s'améliore brusquement et que les réserves énergétiques sont suffisantes, alors la différenciation ovarienne peut s'engager (Fig. 74)**. Cependant l'estimation de ce que peut être un « bon environnement » est susceptible de varier en fonction des individus, de même que leur réponse à cet environnement. Ceci fait appel à la notion de « norme de réaction » qui est liée à la variabilité génétique des individus. Ces différences d'estimation et de réponse (en termes de sexe phénotypique) à l'environnement peuvent expliquer le fait que des densités similaires produisent des sex-ratios différents en fonction des études. De plus, ces différences d'estimation pourraient expliquer la présence d'individus intersexués. Ces derniers auraient tout d'abord engagé un développement femelle (avec un environnement apparemment propice), avant d'initier un développement testiculaire (faisant suite aux changements du milieu). Comme l'anguille est considérée comme une espèce panmictique, la variabilité

génétique en un lieu donné ne devrait pas, en théorie, différer d'un lieu à l'autre. Ainsi, l'anguille constitue un modèle exceptionnel pour tester l'expression conditionnelle du sexe, car dans des environnements similaires en tous points, les sex-ratios devraient être comparables.

2.4.2. Chez d'autres espèces ?

Un déterminisme environnemental du sexe a été détecté chez d'autres espèces migratrices amphihalines : les lamproies. Chez *Lampetra aepyptera* et *Ichthyomyzon gagei* les fortes densités d'individus sont également associées à de fortes proportions de mâles (Beameash, 1993 ; Docker et Beameash, 1994). Chez ces deux espèces, les femelles sont plus grosses que les mâles pour toutes les classes d'âge (après la différenciation sexuelle). La fécondité des femelles augmente avec leur taille, ce qui est moins vrai pour les mâles (Beamish et Thomas 1983 ; Docker et Beamish, 1991). En outre, les meilleures conditions de croissance sont rencontrées lorsque les densités sont faibles. De ce fait, ces espèces pourraient également constituer d'excellents modèles pour tester l'ECS.

2.4.3. Cas d'intersexualité tardive chez l'anguille : hermaphrodisme simultané ?

Dans l'étude portant sur la différenciation sexuelle de l'anguille, 2 individus avec des gamètes mâles et femelles à des stades très avancés de gamétogénèse, ont pu être trouvés (Geffroy *et al.* sous presse). D'autres individus intersexués tardifs avaient été identifiés chez le genre *Anguilla*. Cela pose la question de l'évolution de l'hermaphrodisme chez les Anguilliformes. En effet, La plupart des Murénidés sont protogynes ou hermaphrodites simultanés. (Fishelson, 1992). On peut donc considérer ces cas d'intersexualité tardive sous deux angles :

- Soit, ils sont révélateurs d'un ancêtre commun hermaphrodite simultané (cela suppose que ce caractère soit transmissible)

- Soit, ce caractère est en train d'apparaître, en lien avec le mode de reproduction très spécifique de cette/ces espèce(s) (*Anguilla anguilla*, *Anguilla japonica*, *Anguilla dieffenbachii*).

Il a été montré qu'au sein d'une même espèce, le *Lythrypnus dalli*, des populations composées de femelles pures, de mâles purs et d'hermaphrodites simultanés pouvaient exister (St Mary, 2000). Les modèles théoriques d'allocation sexuelle prédisent que les populations de sexe pur sont les plus communes à forte densité (car les probabilités de rencontre sont grandes) et que les populations d'hermaphrodites simultanés sont les plus communes lorsque les densités sont faibles (St Mary, 1997). Ces prédictions ont ensuite été validées chez plusieurs espèces du genre *Lythrypnus* (St Mary, 2000). Si l'on considère que trouver un partenaire dans la mer des Sargasses est difficile, ce type de stratégie devrait émerger, surtout dans la mesure où la population d'anguille atteint des seuils critiques pour la survie de l'espèce (Dekker, 2003a,b). L'hermaphroditisme simultané pourrait également conduire à l'autofécondation. Bien que très rare, cette stratégie assure la transmission des gènes dans le cas où trouver un partenaire s'avère très difficile. Cette stratégie reproductive n'a cependant été décrite que chez un petit poisson ovipare (*Rivulus marmoratus*) d'Amérique (Taylor *et al.* 1995 ; Davis *et al.* 1995). L'autofécondation est également supposée chez de nombreux chlorophthalmidés car les individus sont hermaphrodites simultanés et vivent relativement éloignés les uns des autres, dans une obscurité totale (Mead *et al.* 1964 ; Sulak, 1977).

3. Perspectives

3.1. Rôle des Phéromones ?

Bien qu'aucune expérience n'ait été effectuée sur l'influence possible des phéromones sur la différenciation sexuelle de l'anguille, certains auteurs ont souligné le rôle que pourrait avoir la communication chimique entre individus. Dans la mesure où les capacités olfactives semblent plus importantes que les capacités visuelles chez l'anguille (Huertas *et al.* 2008), il est très probable que la communication entre individus s'effectue majoritairement par cette voie. En effet, il a été montré que le mucus d'anguille a un fort pouvoir attractif intraspécifique (Saglio, 1982 ; Sola et Tongiorgi 1998 ; Huertas *et al.* 2007). Concernant le rôle possible des phéromones sur la différenciation du sexe, aucune étude n'existe jusqu'à présent. Néanmoins, il a été suggéré que la présence de grosses femelles pourrait inhiber la différenciation sexuelle des futurs mâles (McCleave et Jellyman, 2004). De plus, Huertas *et al.* (2006) ont montré que la maturation des mâles immatures pouvait être stimulée par les mâles et femelles matures. Ainsi, les phéromones émises par les individus matures dans la rivière pourraient avoir un

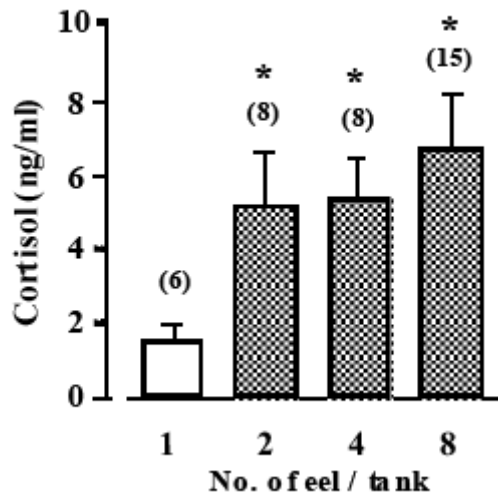


Fig. 75. Augmentation du cortisol chez les individus de 20 cm en fonction de la densité d'après Chiba *et al.* 2002. Le nombre entre parenthèse indique les individus utilisés pour la mesure du cortisol plasmatique.

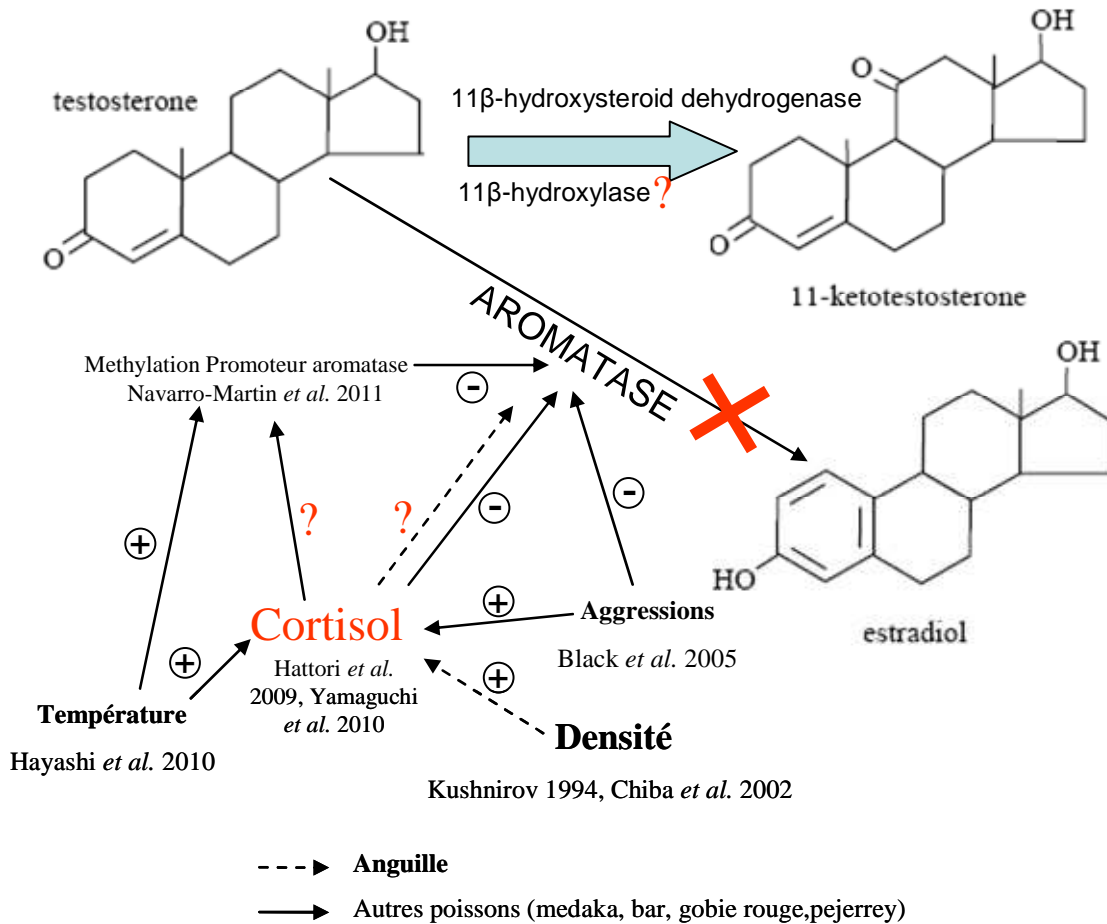


Fig. 76. Schéma la possible action du cortisol sur l'aromatase. Il n'existe pas de données sur l'inhibition de l'expression de l'aromatase par le cortisol chez l'anguille.

rôle dans la différenciation sexuelle, compte tenu du fait que la gonade indifférenciée des poissons est, en générale, extrêmement labile. Il est également possible que la quantité de phéromones émises dans l'eau constitue une source d'information sur la densité de congénères.

3.2. Rôle du Cortisol dans la détermination du sexe de l'anguille ?

Les fortes densités sont généralement associées à une importante production de mâles. Ce constat m'a poussé à essayer de comprendre quel pouvait être le rôle du stress dans le déterminisme du sexe de l'anguille. Bien que nous n'ayons réalisé aucune expérience sur le sujet, la publication récente de nombreux articles dans ce domaine (sur différentes espèces) ouvre une éventuelle voie de recherche sur le déterminisme du sexe chez l'anguille.

Il est bien connu que les conditions de fortes densités, généralement rencontrées en élevage, constituent des situations de stress. Il faut cependant différencier le stress chronique du stress aigu. Le stress aigu est généralement rencontré lors d'un changement brutal d'environnement ou, par exemple, lors d'un confinement (revue de Gamperl *et al.* 1994). Le stress chronique, caractérise davantage les fortes densités. De nombreux exemples de stress chroniques densité-dépendants sont reportés dans la bibliographie (Iwama *et al.* 1992 ; Barcellos *et al.* 1999 ; Olivotto *et al.* 2002).

Cependant, il semble que chez de nombreuses espèces de poissons, et notamment l'anguille (Seymour, 1984) le nombre d'agressions par individu (et donc le stress) tend à diminuer avec la densité. D'autres études montrent au contraire que le stress chronique est associé à une augmentation de la densité chez l'anguille (Fig. 75, Chiba *et al.* 2002).

Kushnirov (1994) a étudié l'effet de l'élevage en groupe (8 individus) *versus* solitaire, sur la production de cortisol par des individus de plus de 30 cm. L'auteur montre que l'isolation conduit à des niveaux de cortisol plasmatique très faible (en deçà de la limite de détection de 22 nmol/l de sang) comparativement à l'élevage en groupe (de 22 à 344 nmol/l). De récentes études menées sur des poissons présentant un déterminisme du sexe température-dépendant ont mis en évidence que le cortisol était capable d'inhiber l'expression de l'aromatase, ce qui en retour se traduisait par une majorité de mâles produits (Hattori *et al.* 2009 ; Yamagushi *et al.* 2010, Fig. 76). L'inhibition de l'aromatase a également été corrélée au nombre d'attaques reçues (indicateur de stress) chez une espèce hermaphrodite séquentielle protogyne, le gobie rouge à bande bleue (Black *et al.* 2005). De façon plus surprenante, il a été montré chez une espèce présentant un déterminisme génétique du sexe, le medaka, que la température pouvait induire la masculinisation des individus à travers l'augmentation du

cortisol (Hayashi *et al.* 2010). Chez la truite (*Salmo gairdneri*) l'ajout de cortisol dans l'eau au moment de la différenciation sexuelle est également capable d'induire le développement du testicule et de biaiser le sex-ratio en faveur des mâles (92% mâles produits contre 51% dans la « condition témoin », van den Hurk et van Oordt, 1985). Il a également été montré que le cortisol pouvait induire la masculinisation du comportement et de la morphologie des femelles gambusies *Gambusia affinis* (Knapp *et al.* 2011).

Chez l'anguille, les fortes densités pourraient conduire à une augmentation du cortisol plasmatique et du cortisol libéré dans l'eau et ainsi agir sur l'expression de l'aromatase. Même dans le cas où les agressions diminuent avec la densité d'individus, cela ne signifie pas que la quantité totale de cortisol émise dans l'eau diminue. À partir de prélèvements sanguins sur des anguilles élevées en bac commun, Kushnirov (1994) montre que la concentration moyenne en cortisol plasmatique des mâles est supérieure (81 nmol/l) à celle des femelles (41 nmol/l). Compte tenu du faible nombre d'individus utilisés lors de son étude (12 mâles et 6 femelles), l'auteur n'a pu conclure sur une différence statistique de la concentration en cortisol entre sexes. La seule étude permettant de lier le cortisol et la production de stéroïdes sexuels chez l'anguille montre que la concentration en testostérone plasmatique, après une injection de cortisol, est 4 fois supérieure à celle des témoins (Khan, 1983). De plus, la concentration en 11-ketotestosterone plasmatique libre est 13 fois supérieure à celle des témoins dans les mêmes conditions (Khan, 1983).

Dans la première partie de cette thèse, le sexe de la majorité des individus n'a pu être déterminé. Néanmoins, l'étude de la croissance des mâles et des femelles lors de la seconde partie de la thèse peut permettre d'attribuer un **sexe hypothétique** à chaque individu de l'expérience 1. Ceci dans le but d'étudier le possible effet des interactions interindividuelles sur le sexe des individus. Bien que très spéculative, et donc placée en annexe (Annexe 2), ce travail permet de formuler des hypothèses de travail pouvant stimuler de futures études.

4. Conservation et mesures de gestion

La dynamique de la population est en partie contrainte par le sex-ratio opérationnel, car il influence la variance du succès reproducteur (Nunney, 1993). Lorsque le nombre d'individus d'une population chute dramatiquement, la capacité de résilience de l'espèce augmente si les femelles prédominent et diminue lorsque les mâles prédominent (Caughley, 1994). Or, il apparaît que la plupart des modèles développés pour estimer la dynamique de la population

d'anguilles ne prennent pas en compte le potentiel biais du sex-ratio continental et océanique (Dekker, 2003a ; Aström et Dekker, 2007). Le management du sex-ratio de la population d'anguilles pourrait apporter de nombreux avantages à court terme.

Généralement, le sex-ratio d'espèces en voie de disparition est très déséquilibré. Un tel déséquilibre peut accroître l'effet négatif de l'effet Allee et des événements stochastiques, conduisant à l'extinction de l'espèce (Wedekind, 2012). Chez les espèces, comme l'anguille, où la croissance de la population est limitée par le nombre d'oocytes produits, un sex-ratio biaisé vers les mâles réduit la croissance de la population. Par exemple, chez le perroquet kakapo (*Strigops habroptilus*) de Nouvelle-Zélande, la population en danger critique d'extinction présente un sex-ratio très biaisée vers les mâles. Chez cette espèce où la croissance démographique est limitée par le nombre d'œufs produits, la manipulation du sex-ratio vers une production de femelles est très vite devenue une priorité pour les gestionnaires (Robertson *et al.* 2006).

Chez l'anguille, si l'on considère que le temps pour arriver à maturation est 2 fois plus important pour les femelles que pour les mâles, on peut supposer un déséquilibre du sex-ratio vers les mâles sur le lieu de la reproduction (sauf dans le cas d'une mortalité supérieure des mâles lors de la migration). A partir d'un scénario qui prend en compte la proportion de mâles et de femelles produite et leurs temps respectifs de génération, il faudrait que le sex-ratio continental soit de l'ordre de 70% de femelles pour obtenir un sex-ratio de 54% de femelles dans la mer des Sargasses (avec un temps de génération de 5 ans pour les mâles et 10 ans pour les femelles, Vélez-Espino et Koops 2009).

Il est possible d'imaginer que le sex-ratio dans la population soit régulé par une sélection fréquence-dépendante négative et que le recrutement des civelles suive une courbe ondulatoire. Dekker (2003a) constate que la production d'anguilles jaunes et d'anguilles argentées a commencé à chuter dans les années 60, alors que le recrutement de civelles n'a commencé à diminuer qu'à partir des années 80. Si, la population est bien régulée par une sélection fréquence-dépendante négative, cela implique que le nombre de civelles produisant les individus adultes des années 60, devait être bas dans les années 40. C'est effectivement ce que l'on observe à partir des indices de recrutements de Dekker (2003a, Fig 6a). Han *et al.* (2009) observent également un recrutement des civelles (*Anguilla japonica*) suivant une courbe ondulatoire au cours du temps. Ces auteurs constatent que même si ce schéma est conservé ces dernières années, le nombre total de civelles entrant dans le système diminue. Le sex-ratio dans certains lacs semble également évoluer de façon naturelle avec un biais très prononcé vers tel ou tel sexe tous les 20 ans (Rosell *et al.* 2005). Ainsi, il est possible que ces

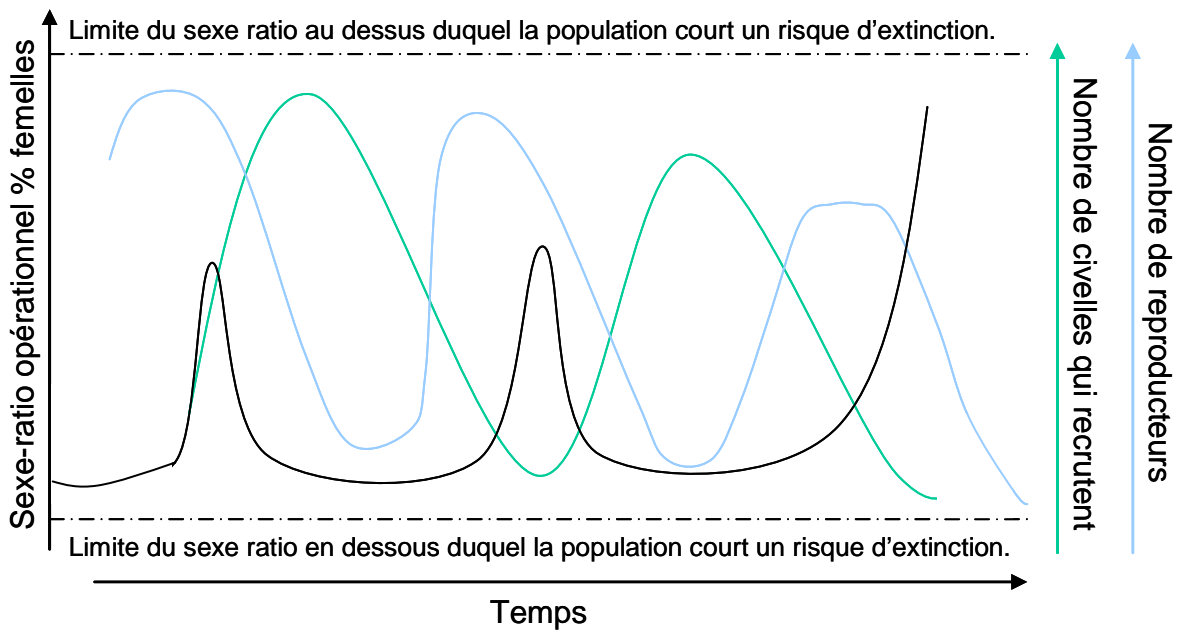


Fig. 77. Proposition d'un schéma expliquant la dynamique de la population en fonction du sexe-ratio et de la diminution du stock d'adultes.

fluctuations soient naturellement liées au sex-ratio opérationnel dans la mer des Sargasses. Dans ce cas, lorsque les densités d'individus sont importantes sur le continent (faible niveau de ressources par individu) une grande majorité de mâles est produite. Ces derniers sont donc en nombre plus important sur le lieu de reproduction (5 ans plus tard) et le faible nombre de femelles limite sérieusement la production de juvéniles. Ces derniers sont donc moins nombreux sur le continent (ressources non limitantes) et une grande proportion de femelles est produite. Les femelles deviennent alors plus nombreuses que les mâles sur le lieu de reproduction et le nombre de juvéniles produits est, de fait, plus important. Puis la boucle recommence (Fig. 77). Bien que très théorique, ce modèle soulève la question de l'impact d'un sex-ratio déséquilibré sur le lieu de reproduction. Compte tenu du temps de génération des mâles, il est fort probable que ce sex-ratio soit, la plupart du temps, biaisé vers les mâles. Ainsi, le sex-ratio ne peut raisonnablement pas être ignoré lors de la paramétrisation des modèles démographiques.

Paradoxalement, le déterminisme du sexe sous l'influence de l'environnement pourrait donc être le meilleur atout de l'anguille pour lui permettre de revenir à son état pristine, dans une échelle de temps très courte (si les bonnes mesures de gestion sont prises). A l'heure actuelle, la diminution du stock s'accompagne d'une plus forte production globale de femelles. Le sexe rare est donc le sexe mâle. Si l'on permet à un plus grand nombre de civelles d'atteindre les estuaires, le nombre de mâles sera en théorie plus important que le nombre de femelles sur le lieu de reproduction, sur une courte échelle de temps. En revanche si la pression de pêche s'accroît et que le sex-ratio dans la mer des Sargasses est trop déséquilibré en faveur des femelles (tous les œufs ne peuvent être fécondés), le déterminisme environnemental du sexe deviendra une contrainte plus qu'un avantage, car seules des femelles seront produites dans tous les environnements. Les réintroductions de mâles d'élevage pourraient permettre d'obtenir un sex-ratio plus équilibré sur le lieu de reproduction. Cependant, les individus d'élevage présentent des caractéristiques spécifiques, qui pourraient les empêcher d'atteindre la mer des Sargasses. Des tests de réintroduction d'anguilles d'élevage (environ 25 cm) ont été effectués au Danemark dans l'espoir de contrebalancer la diminution observée des effectifs (Pedersen 2000). Ces auteurs ont montré que la survie d'individus provenant de l'aquaculture était nettement plus faible que celle des individus transplantés d'un lac à un autre (respectivement entre 42-57% et 55-75%). En outre, la biomasse finale des individus transplantés était 3 fois supérieure à celle des individus provenant de l'aquaculture. Il semble donc que l'adaptation à de nouvelles conditions soit plus difficile pour les anguilles d'élevage. Ce résultat est à moduler si l'on considère que la

décision de devenir mâle ou femelle se déclenche pendant les 6 premiers mois de vie en eau douce, cette réintroduction ne concernait que des mâles. L'élevage induirait également une diminution de la proportion de lipides chez les anguilles argentées, comparativement aux anguilles sauvages (Limburg *et al.* 2003). Ces auteurs suggèrent qu'une grande partie des individus ne pourrait pas atteindre la mer des Sargasses. Outre l'impact de la pêche sur la quantité d'individus, il apparaît que cette pratique conduit à une sélection des individus à faible croissance (Bevacqua *et al.* 2012). Il est possible que les plus téméraires avec la plus forte croissance soient ceux pêchés en premier, comme c'est le cas pour la truite (Biro et Post, 2008). De plus, la diminution actuelle de la population d'anguilles s'accompagne d'une diminution de la quantité de lipides chez les individus. En effet, entre 1977 et 2004, le pourcentage de lipides contenus dans le muscle d'anguilles jaunes prélevées aux Pays-Bas a diminué de moitié (Belpaire *et al.* 2009). Seuls les plus gros mâles et femelles pourraient atteindre leur lieu de reproduction (Belpaire *et al.* 2009). Les prédictions démographiques actuelles sont alarmantes. Pour certains auteurs, même si l'interdiction totale de la pêche était mise en place, il faudrait plus de 80 ans pour que le stock revienne à son niveau des années 1980 (Aström et Dekker, 2007). De multiples autres facteurs semblent accentuer cette chute drastique, tels que la pollution, les barrages et le parasite *Anguillicola crassus*. A partir d'un modèle démographique fréquence-dépendant négatif, le sex-ratio devrait très vite évoluer vers une population exclusivement femelle (qui plus est, de mauvaise qualité). Le risque d'extinction deviendrait donc considérable.

Les résultats obtenus dans cette thèse permettent de donner de possibles recommandations sur la production de mâles et de femelles. Si l'objectif est d'obtenir des femelles, il est alors préconisé d'introduire des civelles avec un fort indice de condition (arrivées à l'automne plutôt qu'au printemps) directement après la pêche dans une zone eutrophe avec une faible densité de civelles (très grand bassin ou lac). Si l'objectif est d'obtenir des mâles, les conditions d'élevage en semi-extensif par empoissonnement à forte densité peuvent être préconisées. L'élevage en milieu intensif peut aussi être admis dans la mesure où il pourrait limiter les attaques par *Anguillicola crassus*, tout en sachant que les risques de mortalité pour ces individus seront accrus dans le milieu naturel.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse vont également permettre de limiter les incertitudes sur les estimations de croissance (grâce à un suivi unique à long terme) et ainsi d'améliorer les mesures de gestion. En effet, des erreurs d'estimation de taux de croissance peuvent avoir des conséquences importantes, notamment en termes d'estimation

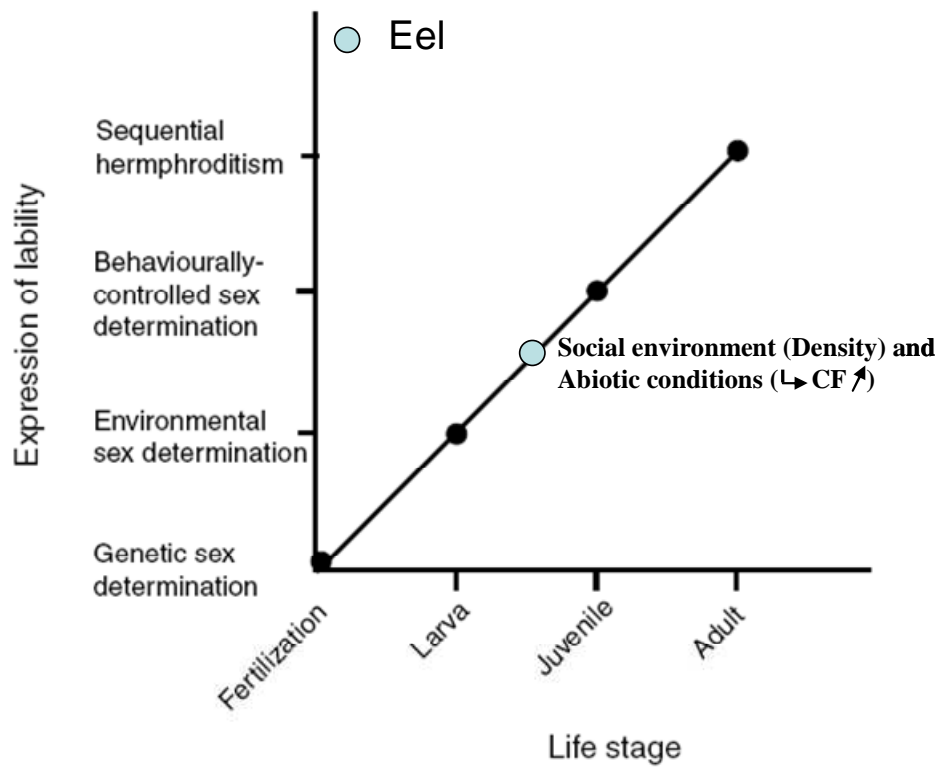


Fig. 78. Continuum des différentes expressions de labilité sexuelles. Modifié d'après Oldfield (2005).

des taux de captures et des rendements. Par exemple, une augmentation artificielle de l'estimation de croissance de 20% chez *A. Dieffenbachii* peut entraîner une surestimation du nombre d'individus à pêcher de 69% (Graynoth and Taylor, 2004).

5 Conclusion générale

La sensibilité aux facteurs environnementaux lors de la différenciation sexuelle est très répandue chez les espèces de vertébrés poïkilothermes (en particuliers les reptiles, les amphibiens et les poissons). Compte tenu des différents phylums concernés, il semble que cette caractéristique soit assez ancestrale et que sa persistance chez des espèces plus « évoluées » soit due à un manque ou à un faible taux de mutation comparativement à d'autres espèces ayant évolué vers un déterminisme du sexe strictement génotypique. On peut considérer qu'il existe chez ces espèces un continuum, représentant les différentes situations de labilité sexuelle en fonction du développement ontogénique, dans lequel l'anguille aurait une place à part (Fig. 78).

Il est probable que l'hétéromorphisme des chromosomes sexuels soit un caractère récemment apparu (Pieau *et al.* 1989), car la plupart des espèces sensibles aux facteurs environnementaux ne présentent pas ce dimorphisme (en particulier la plupart des poissons). En revanche, des analyses de croisements ont permis de mettre en évidence l'existence de chromosomes sexuels homomorphiques chez de nombreux poissons (Devlin et Nagahama, 2002). Chez l'anguille, tant que la reproduction ne sera pas complètement maîtrisée, ce type d'expérience de croisement ne sera pas réalisable. Seul un séquençage complet du génome, associé à des expériences d'inhibition et/ou de surexpression de certains gènes clés (détermination du sexe poly-factorielle), pourrait permettre de faire la lumière sur la part des facteurs génétiques et environnementaux dans le déterminisme du sexe de cette espèce (Minegishi *et al.* 2012). Dès lors il sera possible de placer l'anguille dans le continuum allant du déterminisme génétique pur au déterminisme environnemental pur.

Nos expériences ont permis des avancées sur l'écologie de l'espèce et permettront peut-être de participer à sa protection. Le terme de « bien et service de l'écosystème » a été introduit récemment pour rendre compte de la valeur économique de l'écosystème et des capitaux qu'il permet d'économiser (Ruffo et Kareiva, 2009). L'exemple le plus connu est celui des abeilles qui, de par leur rôle dans la pollinisation, permettraient d'économiser plus de 153 milliards de

dollars (Gallai *et al.* 2009). Ce domaine émergent de recherche qui prend en compte la place et le rôle de l'anguille dans l'écosystème, permettra peut être de donner un nouveau souffle à la protection de cette espèce.

Références Bibliographiques

A

- Aarestrup, K., Okland, F., Hansen, M. M., Righton, D., Gargan, P., Castonguay, M., Bernatchez, L., Howey, P., Sparholt, H., Pedersen, M. I., McKinley, R. S., 2009. Oceanic Spawning Migration of the European Eel *Anguilla anguilla*. *Science* 325, 1660-1660.
- Acou, A., Lefebvre, F., Contournet, P., Poizat, G., Panfili, J., Crivelli, A. J., 2003. Silvering of female eels *Anguilla anguilla* in two sub-populations of the Rhone Delta. *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, 55-68.
- Acou, A., Gabriel, G., Laffaille, P., Feunteun, E., 2009. Differential production and condition indices of premigrant eels (*Anguilla anguilla*) in two small Atlantic coastal catchments of France. In: Casselman JH, Cairns DK (eds), Eels at the Edge: Science, Status, and Conservation Concerns, vol. 58, *American Fisheries Society Symposium*, Bethesda, Maryland, 157-174.
- Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: A response to growth depression. *Fish and Fisheries* 4, 147-190.
- Allen, K.O., 1974. Effects of stocking density and water exchange rate on growth and survival of channel catfish *Ictalurus punctatus* (rafinesque) in circular tanks. *Aquaculture* 4, 29-39.
- Allen, P.J., Barth, C.C., Peake, S.J., Abrahams, M.V., Anderson, W.G., 2009. Cohesive social behaviour shortens the stress response, the effects of conspecifics on the stress response in lake sturgeon *Acipenser fulvescens*. *Journal of Fish Biology* 74, 90-104.
- Als, T. D., Hansen, M. M., Maes, G. E., Castonguay, M., Riemann, L., Aarestrup, K. I. M., Munk, P., Sparholt, H., Hanel, R., Bernatchez, L., 2011. All roads lead to home: panmixia of European eel in the Sargasso Sea. *Molecular Ecology* 20, 1333-1346.
- Alsop, D.H., Wood, C.M., 1997. The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 200, 2337-2346.
- Alvarez, D., Nicieza, A.G., 2005. Is metabolic rate a reliable predictor of growth and survival of brown trout (*Salmo trutta*) in the wild? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 643-649.
- Amerand, A., Vettier, A., Moisan, C., Belhomme, M., Sebert, P., 2010. Sex-related differences in aerobic capacities and reactive oxygen species metabolism in the silver eel. *Fish Physiology and Biochemistry* 36, 741-747.
- Angelopoulou, R., Lavranos, G., Manolakou, P., 2012. Sex determination strategies in 2012: Towards a common regulatory model? *Reproductive Biology and Endocrinology* 10.
- Aoyama, J., 2009. Life history and evolution of migration in catadromous eels (genus *Anguilla*). *Aquatic Bio-science Monographs* 2, 1-42.
- Aoyama, J., Nishida, M., Tsukamoto, K., 2001. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, genus *Anguilla*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20, 450-459.
- Appelbaum, S., Kugler, M., 1990. Sex-dependent morphological-characteristics in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) cultured under different light conditions. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie* 75, 897-897.
- Arai, T., Chino, N., 2012. Diverse migration strategy between freshwater and seawater habitats in the freshwater eel genus *Anguilla*. *Journal of Fish Biology* 81, 442-455.
- Arciero, P.J., Goran, M.I., Poehlman, E.T., 1993. Resting metabolic-rate is lower in women than in men. *Journal of Applied Physiology* 75, 2514-2520.
- Aristotle *Historia Animalium*. Peck AL, translator (1965). Cambridge: Harvard University Press.

- Arnott, S.A., Chiba, S., Conover, D.O., 2006. Evolution of intrinsic growth rate: Metabolic costs drive trade-offs between growth and swimming performance in *Menidia menidia*. *Evolution* 60, 1269-1278.
- Astrom, M., Dekker, W., 2007. When will the eel recover? A full life-cycle model. *Ices Journal of Marine Science* 64, 1491-1498.



- Bagenal, T.B., 1969. The Relationship Between Food Supply and Fecundity in Brown Trout *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Biology* 1, 167-182.
- Baras, E., Lucas, M.C., 2010. Individual growth trajectories of sibling Brycon moorei raised in isolation since egg stage, and their relationship with aggressive behaviour. *Journal of Fish Biology* 77, 985-997.
- Barash, D.P., 1982. Sociobiology and behaviour. New York: Elsevier North Holland.
- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., De Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research* 30, 887-892.
- Bardonnet, A., Bolliet, V., Belon, V., 2005a. Recruitment abundance estimation: Role of glass eel (*Anguilla anguilla* L.) response to light. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 321, 181-190.
- Bardonnet, A., Dasse, S., Parade, M., Heland, M., 2003. Study of glass-eels movements in a flume in relation to nyctemeral changes. *Bulletin Français de la pêche et de la Pisciculture* 368, 9-20.
- Bardonnet, A., Labonne, J., Laffite, J., Garnier, J., 2009. Relationships between individual behaviour and morphometry under different experimental conditions of temperature and feeding in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 2, 390-391.
- Bardonnet, A., Riera, P., 2005b. Feeding of glass eels (*Anguilla anguilla*) in the course of their estuarine migration: New insights from stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 63, 201-209.
- Bardonnet, A., Rigaud, C., Labonne, J., 2005c. Experimental study on glass eel behaviour, Influence of fish density and shelter availability. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 378-379, 47-65.
- Bark, A., Williams, B., Knights, B., 2007. Current status and temporal trends in stocks of European eel in England and Wales. *Ices Journal of Marine Science* 64, 1368-1378.
- Barnard, C.J., Sibly, R.M., 1981. Producers and scroungers - a general-model and its application to captive flocks of house sparrows. *Animal Behaviour* 29, 543-550.
- Barney, M.L., Patil, J.G., Gunasekera, R.M., Carter, C.G., 2008. Distinct cytochrome p450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): Sexual dimorphism and onset of ontogenic expression. *General and Comparative Endocrinology* 156, 499-508.
- Baroiller, J. F., D'Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., Hoerstgen-Schwark, G., 2009. Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular, Integrative Physiology* 153, 30-38.
- Baroiller, J. F., D'Cotta, H., Saillant, E., 2009. Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation. *Sexual Development* 3, 118-135.
- Barske, L. A., Capel, B., 2008. Blurring the edges in vertebrate sex determination. *Current Opinion in Genetics, Development* 18, 499-505.
- Bateman, A.J., 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2, 349-368.

- Beamish, F.W.H., 1993. Environmental sex determination in southern brook lamprey, *Ichthyomyzon gagei*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 1299-1307.
- Beamish, F.W.H., Thomas, E.J., 1983. Potential and actual fecundity of the "paired" lampreys, *Ichthyomyzon gagei* and *I. castaneus*. *Copeia* 1983, 367-374.
- Beckman, B. R., Larsen, D. A., Moriyama, S., Lee-Pawlak, B., Dickhoff, W. W., 1998. Insulin-like growth factor-I and environmental modulation of growth during smoltification of spring chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *General and Comparative Endocrinology* 109, 325-335.
- Beentjes, M. P., Jellyman, D. J., 2003. Enhanced growth of longfin eels, *Anguilla dieffenbachii*, transplanted into Lake Hawea, a high country lake in South Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37, 1-11.
- Belaud, A., 1975. Contribution à l'étude de quelques réactions physiologiques de l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) soumise a diverse conditions hyperbares. Thèse de 3^{ème} Cycle, Université de Bretagne Occidentale. 102 p.
- Bell, A.M., 2005. Behavioural differences between individuals and two populations of stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Journal of Evolutionary Biology* 18, 464-473.
- Bell, A.M., Hankison, S.J., Laskowski, K.L., 2009. The repeatability of behaviour: a meta-analysis. *Animal Behaviour* 77, 771-783.
- Bell, A.M., Stamps, J.A., 2004. Development of behavioural differences between individuals and populations of sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour* 68, 1339-1348.
- Bellini, A., 1907. Expériences sur l'élevage de l'Anguille en stabulation à Comacchio. *Bulletin de la Société Centrale d'Aquiculture et de Pêche* XIX, 81-93, 141-146, 186-196, 215-224 ; 7 planches.
- Belpaire, C.G.J., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., Hagel, P., De Boer, J., 2009. Decreasing eel stocks: Survival of the fattest? *Ecology of Freshwater Fish* 18, 197-214.
- Bennett, A.F., 1987. Interindividual variability: an underutilized resource. In: Feder M.E, Bennett A.F, Burggren W.W, Huey R.B, editors. *New directions in ecological physiology*. Cambridge University Press; Cambridge, UK. pp. 147-169.
- Bergmuller, R., Schurch, R., Hamilton, I.M., 2010. Evolutionary causes and consequences of consistent individual variation in cooperative behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365, 2751-2764.
- Bergmuller, R., Taborsky, M., 2010. Animal personality due to social niche specialisation. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 504-511.
- Bertin, L., 1956. *Eels : a biological study*. Cleaver-Hume Press, London, 192 pp.
- Beullens, K., Eding, E. H., Gilson, P., Ollevier, F., Komen, J., Richter, C. J. J., 1997a. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel *Anguilla anguilla* L maintained in captivity. *Aquaculture* 153, 135-150.
- Beullens, K., Eding, E. H., Ollevier, F., Komen, J., Richter, C. J. J., 1997b. Sex differentiation, changes in length, weight and eye size before and after metamorphosis of European eel *Anguilla anguilla* L maintained in captivity. *Aquaculture* 153, 151-162.
- Bevacqua, D., Capoccioni, F., Melia, P., Vincenzi, S., Pujolar, J.M., De Leo, G.A., Ciccotti, E., 2012. Fishery-induced selection for slow somatic growth in European eel. *PLoS ONE* 7.
- Bevacqua, D., Melià, P., Crivelli, A.J., Gatto, M., De Leo, G.A., 2007. Multi-objective assessment of conservation measures for the European eel (*Anguilla anguilla*): an application to the Carmargue lagoons. *ICES Journal of Marine Science* 64, 1483-1490.
- Bevacqua, D., Melia, P., De Leo, G.A., Gatto, M., 2011. Intra-specific scaling of natural mortality in fish: The paradigmatic case of the European eel. *Oecologia* 165, 333-339.

- Beverton, R.J.H., Holt., S.J., 1957. On the dynamics of exploited fish populations, Fisheries Investigations (Series 2), volume 19. United Kingdom Ministry of Agriculture and Fisheries, 533 pp.
- Bieniarz, K.P., Epler, P., Malczewski, B., Passakas, T., 1981. Development of European eel (*Anguilla anguilla*) gonads in artificial conditions. *Aquaculture* 22, 53-66.
- Biro, P.A., Beckmann, C., Stamps, J.A., 2010. Small within-day increases in temperature affects boldness and alters personality in coral reef fish. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 277, 71-77.
- Biro, P.A., Post, J.R., 2008. Rapid depletion of genotypes with fast growth and bold personality traits from harvested fish populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2919-2922.
- Biro, P.A., Stamps, J.A., 2008. Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends in Ecology, Evolution* 23, 361-368.
- Bizeray, D., Leterrier, C., Constantin, P., Picard, M., Faure, J.M., 2000. Early locomotor behaviour in genetic stocks of chickens with different growth rates. *Applied Animal Behaviour Science* 68, 231-242.
- Black, M.P., Balthazart, J., Baillien, M., Grober, M.S., 2005. Socially induced and rapid increases in aggression are inversely related to brain aromatase activity in a sex-changing fish, *lythrypnus dalli*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272, 2435-2440.
- Bland, F., McIntosh, R., Bain, N., Snow, M., 2012. Development and validation of a range of endogenous controls to support the implementation of practical Taqman real-time PCR-based surveillance for fish diseases within aquaculture. *Journal of Fish Disease* 35, 447-454.
- Boëtius, I., Boëtius, J., 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1, 1-28.
- Boëtius, I., Boëtius, J., 1985. Lipid and protein content in *Anguilla anguilla* during growth and starvation. *Dana* 4, 1-17.
- Boëtius, I., Boëtius, J., 1967. Studies in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). Experimental induction of the male sexual cycle, its relation to temperature and other factors. *Meddelelser fra Kommissionen for Havundersøgelser* 4, 339-405.
- Bohus, B., Benus, R.F., Fokkema, D.S., Koolhaas, J.M., Nyakas, C., van Oortmerssen, G.A., Prins, A.J.A., de Ruiter, A.J.H., Scheurink, A.J.W., Steffens, A.B., 1987. Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Progress in Brain Research* 72, 57-70.
- Boily, P., Magnan, P., 2002. Relationship between individual variation in morphological characters and swimming costs in brook charr (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal of Experimental Biology* 205, 1031-1036.
- Bolliet, V., Labonne, J., 2008. Individual patterns of rhythmic swimming activity in *Anguilla anguilla* glass eels synchronised to water current reversal. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 362(2), 125-130.
- Bolliet, V., Lambert, P., Rives, J., Bardonnnet, A., 2007. Rhythmic swimming activity in *Anguilla anguilla* glass eels: Synchronisation to water current reversal under laboratory conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 344(1), 54-66.
- Bonhommeau, S., Le Pape, O., Gascuel, D., Blanke, B., Tréguier, A. M., Grima, N., Vermard, Y., Castonguay, M., Rivot, E., 2009. Estimates of the mortality and the duration of the trans-Atlantic migration of European eel *Anguilla anguilla*leptocephali using a particle tracking model. *Journal of Fish Biology* 74, 1891-1914.
- Bortone, S.A., Davis, W.P., 1994. Fish intersexuality as indicator of environmental-stress.

Bioscience 44, 165-172.

- Brafield A.E., 1985. Laboratory studies on energy budgets. In P. Tytler, P. Calow (Eds). Fish energetics: new perspectives. Croom Helm, London, pp 257–281.
- Brafield, A.E., Llewellyn, M.J., 1982. Animal energetics. Blackie, London.
- Brett, J.R., Groves, T.D.D., 1979. Physiological energetics. In: Fish Physiology. Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. Eds., Bioenergetics and Growth vol. 8 Academic Press, NY, pp. 279–352.
- Briand, C., Bardonnnet, A., Rigaud, C., 2008. Connaissances et recommandations scientifiques du Groupe anguille du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Poissons Amphihalins (GIS GRISAM) pour la mise en œuvre française du règlement européen visant à restaurer le stock d'anguille pp 49-53.
- Briand, C., Fatin, D., Ciccoti, E., Lambert, P., 2005a. A stage-structured model to predict the effect of temperature and salinity on glass eel (*Anguilla anguilla*) pigmentation development. *Journal of Fish Biology* 67, 993-1009.
- Briand, C., Fatin, D., Fontenelle, G., Feunteun, E., 2005b. Effect of re-opening of a migratory pathway for eel (*Anguilla anguilla*, L.) at a watershed scale. *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, 67-86.
- Briand, C., Mounaix, B., Fatin, D., Feunteun, E., 2003. The contribution of springtime and autumn glass eels (*Anguilla anguilla*) to stock, Results based on otolith morphometry. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 367, 27-41.
- Bromage, N., Jones, J., 1991. The effects of seasonal alterations in ration on fecundity and maturation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. In: Kime, J.P., Sumpter, J.P., Rolfe, D.E., Scott, M.S., Sumpter, A.P. Eds., Reproductive Physiology of Fish 1991. *Fish Symposium Sheffield* 91, p. 162.
- Brown, C., Braithwaite, V.A., 2004. Size matters, a test of boldness in eight populations of the poeciliid *Brachyraphis episcopi*. *Animal Behaviour* 68, 1325-1329.
- Brown, C., Burgess, F., Braithwaite, V.A., 2007. Heritable and experiential effects on boldness in a tropical poeciliid. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62, 237-243.
- Brown, C., Jones, F., Braithwaite, V., 2005. In situ examination of boldness-shyness traits in the tropical poeciliid, *Brachyraphis episcopi*. *Animal Behaviour* 70, 1003-1009.
- Brown, E.A.R., Scott, D.B.C., 1988. A second hermaphrodite specimen of *Coregonus lavaretus* (L.) (*Salmonidae*, *Coregoninae*) from Loch Lomond, Scotland. *Journal of Fish Biology* 33, 957-958.
- Brown, J.H., Sibly, R.M., 2006. Life-history evolution under a production constraint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17595-17599.
- Bruslé, J., 1990. Effects of heavy metals on eels, *Anguilla* sp. *Aquatic Living Resources* 3, 131-141.
- Bull, J.J., 1983. Evolution of Sex Determining Mechanisms Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, 316 pp.
- Bureau du Colombier, S., Bolliet, V., Bardonnnet, A., 2009. Swimming activity and behaviour of European *Anguilla anguilla* glass eels in response to photoperiod and flow reversal and the role of energy status. *Journal of Fish Biology* 74, 2002-2013.
- Bureau du Colombier, S., Bolliet, V., Lambert, P., Bardonnnet, A., 2007. Energy and migratory behavior in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Physiology and Behavior* 92, 684-690.
- Bureau du Colombier, S., Lambert, P., Bardonnnet, A., 2008. Is feeding behaviour related to glass eel propensity to migrate? *Estuarine Coastal and Shelf Science* 80, 323-329.
- Burgerhout, E., Brittijn, S. A., Palstra, A. P., Van den Thillart, G. E. E. J. M., 2010. Swimming trials with male silver eels indicating a higher efficiency by swimming in

groups. In *Proceeding of the Fitfish – Workshop on the Swimming Physiology of Fish*. Barcelona, 2–3 July 2010.

Burgerhout, E., Manabe, R., Brittiijn, S. A., Aoyama, J., Tsukamoto, K., van den Thillart, G., 2011. Dramatic effect of pop-up satellite tags on eel swimming. *Naturwissenschaften* 98, 631-634.

Burnet, A. M. R., 1969. The growth of New Zealand freshwater eels in three Canterbury streams. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 3, 376-384.



Cairns, D. K., Secor, D. A., Morrison, W. E., Hallett, J. A., 2009. Salinity-linked growth in anguillid eels and the paradox of temperate-zone catadromy. *Journal of Fish Biology* 74, 2094-2114.

Carere, C., Drent, P.J., Privitera, L., Koolhaas, J.M., Groothuis, T.G.G., 2005. Personalities in great tits, *parus major*: Stability and consistency. *Animal Behaviour* 70, 795-805.

Carss, D.N., Elston, D.A., Nelson, K.C., Kruuk, H., 1999. Spatial and temporal trends in unexploited yellow eel stocks in two shallow lakes and associated streams. *Journal of Fish Biology* 55, 636–654.

Castonguay, M., Hodson, P. V., Couillard, C. M., Eckersley, M. J., Dutil, J. D., Verreault, G., 1994. Why is recruitment of the American eel, *Anguilla rostrata*, declining in the st-lawrence-river and gulf. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 479-488.

Castonguay, M., McCleave, J. D., 1987. Vertical distributions, diel and ontogenetic vertical migrations and net avoidance of leptocephali of *Anguilla* and other common species in the Sargasso Sea. *Journal of Plankton Research* 9, 195-214.

Cau, A., Salvadori, S., Deiana, A. M., Bella, J. L., Mezzanotte, R., 1988. The characterization of *Muraena helena* L mitotic chromosomes - karyotype, c-banding, nucleolar organizer regions, and insitu digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetics and Cell Genetics* 47, 223-226.

Caughley, G., 1994. Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology* 63, 215-244.

Chamove, A.S., Eysenck, H.J., Harlow, H.F., 1972. Personality in monkeys: Factor analyses of rhesus social behaviour. *Quarterly Journal of Experimental Psychology* 24, 496-504.

Charlon, N., Blanc, J.M., 1983. Etude des civelles d'*Anguilla anguilla* L. dans la région du bassin de l'Adour. 2. Régime alimentaire et variations de quelques caractéristiques biochimiques en cours de migration. *Archiv fur Hydrobiologie* 98(2), 240-249.

Charnier, M., 1966. Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae, Lacertilia) embryo. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales* 160, 620–622.

Charnov, E. L., Bull, J., 1977. When is sex environmentally determined. *Nature* 266, 828-830.

Charnov, E. L., Los-den Hartogh, R. L., Jones, W. T., van den Assem, J., 1981. Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature* 289,27-33.

Charnov, E.L., 1982. *The Theory of Sex Allocation*. Princeton University Press, N.J.

Charnov, E.L., Losdenhartogh, R.L., Jones, W.T., Vandenassem, J., 1981. Sex ratio evolution in a variable environment. *Nature* 289, 27-33.

Chiarelli B., Ferrantelli O., Cucchi C., 1969. The karyotype of some teleostean fish obtained by tissue culture *in vitro*. *Experientia* 25, 426-427.

- Chiba, H., Iwata, M., Yakoh, K., Satoh, R., Yamada, H., 2002. Possible influence of social stress on sex differentiation in Japanese eel. *Fisheries Science* 68, 413-414.
- Chu, Y.-W., Han, Y.-S., Wang, C.-H., You, C.-F., Tzeng, W.-N., 2006. The sex-ratio reversal of the Japanese eel *Anguilla japonica* in the Kaoping River of Taiwan: The effect of cultured eels and its implication. *Aquaculture* 261, 1230-1238.
- Ciofi, C., Swingland, I. R., 1997. Environmental sex determination in reptiles. *Applied Animal Behaviour Science* 51, 251-265.
- Clarke, A., Johnston, N.M., 1999. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* 68, 893-905.
- Clevesam, P.D., Ogonowski, M., Sjöberg, N.B., Wickström, H., 2011. Too short to spawn? Implications of small body size and swimming distance on successful migration and maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of Fish Biology* 78, 1073-1089.
- Cochin, J., 1986. Le sens de l'erreur. Réflexions sur l'ethnologie de l'anguille dans le marais de Redon. In : 111^{ème} Congrès national des Sociétés savantes, Poitiers. Paris: Edition du CTHS. Sciences, fascicule II, p. 143-146.
- Coleman, K., Wilson, D.S., 1998. Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish: individual differences are context-specific. *Animal Behaviour* 56, 927-936.
- Colgan, P.W., 1983. Comparative social recognition. Wiley & Sons, New York 1st edition
- Colombo, G., Grandi, G., Rossi, R., 1984. Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology* 24, 215-228.
- Colombo, G., Grandi, G., 1996. Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *Journal of Fish Biology* 48, 493-512.
- Conover, D. O., 1984. Adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a fish. *American Naturalist* 123, 297-313.
- Conover, D. O., Kynard, B. E., 1981. Environmental sex determination - interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213, 577-579.
- Côté, C.L., Castonguay, M., Verreault, G., Bernatchez L., 2009. Differential effects of origin and salinity rearing conditions on growth of glass eels of the American eel *Anguilla rostrata*, implications for stocking programmes. *Journal of Fish Biology* 74, 1934-1948.
- Cote, J., Boudsocq, S., Clobert, J., 2008. Density, social information, and space use in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *Behavioural Ecology* 19, 163-168.
- Cottrill, P. B., Davies, W. L., Semo, M., Bowmaker, J. K., Hunt, D. M., Jeffery, G., 2009. Developmental dynamics of cone photoreceptors in the eel. *BMC Developmental Biology* 9, 71.
- Creutzberg, F., 1959. Discrimination between ebb and flood tide in migrating elvers (*Anguilla vulgaris* Turt.) by means of olfaction perception. *Nature* 184, 1961-1962.
- Creutzberg, F., 1961. On the orientation of migrating elvers (*Anguilla vulgaris* Turt.), in a tidal area. *Netherlands Journal of Sea Research* 1, 257-338.
- Croft, D.P., James, R., Ward, A.J.W., Botham, M.S., Mawdsley, D., Krause, J., 2005. Assortative interactions and social networks in fish. *Oecologia* 143, 211-219.

- D'Ancona, U., 1958. Comparative biology of eels in the Adriatic and the Baltic. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische Limnologie* 13, 731-735.
- D'Ancona, U., 1960. The life cycle of the Atlantic eel. *Symposia of the Zoological Society of London* 1, 61-75.
- Dannewitz, J., Maes, G.E., Johansson, L. Wickström, H., Volckaert, F.A.M., Järvi, T., 2005. Panmixia in the European eel: a matter of time. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272, 1129-1137.
- Darwin, C., 1871. *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. London: John Murray.
- Daverat, F., Beaulaton, L., Poole, R., Lambert, P., Wickström, H., Andersson, J., Aprahamian, M., Hizem, B., Elie, P., Yalçın-Özdilek, S., Gumus, A., 2012. One century of eel growth: changes and implications. *Ecology of Freshwater Fish*, no-no.
- Daverat, F., Limburg, K.E., Thibault, I., Shiao, J.C., Dodson, J.D., Caron, F., Tzeng, W.-N., Iizuka, Y., Wickström, H., 2006. Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. *Marine Ecology Progress Series* 308, 231-241.
- Daverat, F., Tomas, J., 2006. Tactics and demographic attributes in the European eel *Anguilla anguilla* in the Gironde watershed, SW France. *Marine Ecology Progress Series* 307, 247-257.
- Davey, A. J. H., Jellyman, D. J., 2005. Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15, 37-52.
- Davis, M.W., Olla, B.L., 1992. The role of visual cues in the facilitation of growth in a schooling fish. *Environmental Biology of Fishes* 34, 421-424.
- Davis, W.P., Taylor, D.S., Turner, B.J., 1995. Does the autecology of the mangrove rivulus fish (rivulus-marmoratus) reflect a paradigm for mangrove ecosystem sensitivity. *Bulletin of Marine Science* 57, 208-214.
- De Casamajor, M.N., Bru, N., Prouzet, P., 1999. Influence de la luminosité nocturne et de la turbidité sur le comportement vertical de migration de la civelle d'anguille (*Anguilla anguilla* L.) dans l'estuaire de l'Adour. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 355, 327-347.
- De Casamajor, M.N., Bru, N., Prouzet, P., 2001. Fluctuations of glass-eels (*Anguilla anguilla* L.) catches and variability of their catchability in the adour estuary. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 357-358, 387-404.
- De Casamajor, M.N., Prouzet, P., Lazure, P., 2000. Identification of glass eels groups (*Anguilla anguilla*) from variability of allometry relations according to hydrodynamics conditions in the Adour estuary. *Aquatic Living Resources* 13, 411-420.
- De Leo, G. A., Gatto, M., 1995. A size and age-structured model of the European eel *Anguilla anguilla* L. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1351-1367.
- De Leo, G.A., Gatto, M., 1996. Trends in vital rates of the european eel: Evidence for density dependence? *Ecological Applications* 6, 1281-1294.
- Deboer, J., Hagel, P., 1994. Spatial differences and temporal trends of chlorobiphenyls in yellow eel (anguilla-anguilla) from inland waters of the netherlands. *Science of the Total Environment* 141, 155-174.
- Degani, G., Gallagher, M.L., Meltzer, A., 1989. The influence of body size and temperature on oxygen consumption of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Journal of Fish Biology* 34, 19-24.
- Degani, G., Kushnirov, D., 1992. Effects of 17 β -Estradiol and grouping on sex determination of European eels. *Progressive Fish Culturist* 54, 88-91.

- Degani, G., Lee-Gallagher, M., 1985. The relationship between growth, food conversion and oxygen consumption in developed and underdeveloped American eels, *Anguilla rostrata* Lesueur. *Journal of Fish Biology* 27, 635-641.
- Degani, G., Levanon, D., 1983. The influence of low density on food adaptation cannibalism and growth of eels (*Anguilla anguilla* (L.)). *Bamidgeh* 35 2, 53-60.
- Degani, G., Levanon, D., Trieger, G., 1984. Preliminary study on the influence of different feeds on mortality and growth of eels (*Anguilla anguilla* L.) in the initial period. *Bamidgeh* 36, 47-52.
- Degani, G., Tzchori, I., Yom-Din, S., Goldberg, D., Jackson, K., 2003. Growth differences and growth hormone expression in male and female European eels *Anguilla anguilla* (L.). *General and Comparative Endocrinology* 134, 88-93.
- Degani, G., Viola, S., Levanon, D., 1986. Effects of dietary carbohydrate source on growth and body-composition of the european eel (*anguilla-anguilla* l). *Aquaculture* 52, 97-104.
- Deiana, A. M., Salvadori, S., Cau, A., 1990. The characterization of somatic chromosomes of *Gymnothorax unicolor* Delaroché, 1809 by c-banding and nor staining osteichthyes, Anguilliformes. *Genetica* 81, 17-20.
- Dekker, W., 2003a. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* 10, 365-376.
- Dekker, W., 2003b. On the distribution of the European eel *Anguilla anguilla* and its fisheries. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60, 787-799.
- Dekker, W., 2004. What caused the decline of the Lake IJsselmeer eel stock after 1960? *Ices Journal of Marine Science* 61, 394-404.
- Dekker, W., Casselman, J.M., Cairns, D.K., Tsukamoto, K., Jellyman, D.J., Lickers, H., 2003. Worldwide decline of eel resources necessitates immediate action. *Fisheries* 28 (12), 28-30.
- Desaunay, Y., Guerault, D., 1997. Seasonal and long-term changes in biometrics of eel larvae: a possible relationship between recruitment variation and North Atlantic ecosystem productivity. *Journal of Fish Biology* 51 (A), 317-339.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191-364.
- Dingemanse, N.J., Kazem, A.J.N., Reale, D., Wright, J., 2010. Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 81-89.
- Dingemanse, N.J., Van der Plas, F., Wright, J., Reale, D., Schrama, M., Roff, D.A., Van der Zee, E., Barber, I., 2009. Individual experience and evolutionary history of predation affect expression of heritable variation in fish personality and morphology. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 276, 1285-1293.
- Docker, M.F., Beamish, F.W.H., 1991. Growth, fecundity, and egg size of least brook lamprey, *Lampetra aepyptera*. *Environmental Biology of Fishes* 31, 219-227.
- Docker, M.F., Beamish, F.W.H., 1994. Age, growth, and sex ratio among populations of least brook lamprey, *Lampetra aepyptera*, larvae: an argument for environmental sex determination. *Environmental Biology of Fishes* 41, 191-205.
- Dou, S.Z., Miller, M.J., Tsukamoto, K., 2003. Growth, pigmentation and activity of juvenile Japanese eels in relation to temperature and fish size. *Journal of Fish Biology* 63 (Suppl. A), 152-165.
- Dou, S.Z., Tsukamoto, K., 2003. Observations on the nocturnal activity and feeding behavior of *Anguilla japonica* glass eels under laboratory conditions. *Environmental Biology of Fishes* 67, 389-395.
- Drent, P.J., van Oers, K., van Noordwijk, A.J., 2003. Realized heritability of personalities in the great tit (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-*

Biological Sciences 270, 45-51.

- Du Colombier, S.B., Bolliet, V., Lambert, P., Bardonnnet, A., 2011. Metabolic loss of mass in glass eels at different salinities according to their propensity to migrate. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 93, 1-6.
- Dufour, S., Fontaine, Y. A., 1985. La migration de reproduction de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.): un rôle probable de la pression hydrostatique dans la stimulation de fonction gonadotrope. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 110, 291-299.
- Dugatkin, L.A., 1997. The evolution of cooperation. *Bioscience* 47, 355-362.
- Dugatkin, L.A., Alfieri, M., 1991. Guppies and the tit-for-tat strategy - preference based on past interaction. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 28, 243-246.
- Dugatkin, L.A., Alfieri, M., 1991. Tit-for-tat in guppies (*poecilia-reticulata*) - the relative nature of cooperation and defection during predator inspection. *Evolutionary Ecology* 5, 300-309.
- Dugatkin, L.A., Wilson, D.S., 1992. The prerequisites for strategic behavior in bluegill sunfish, *lepomis-macrochirus*. *Animal Behaviour* 44, 223-230.
- Durif, C., Dufour, S., Elie, P., 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla*: A new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology* 66, 1025-1043.
- Durif, C., Elie, P., Dufour, S., Marchelidon, J., Vidal, B., 2000. Analyse des paramètres morphologiques et physiologiques lors de préparation à la migration de dévalaison chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) du lac de Grand-Lieu (Loire- Atlantique). *Cybiurn* 24, 63-74.



- Edeline, E., 2007. Adaptative phenotypic plasticity of eel diadromy. *Marine Ecology Progress Series* 341, 229-232.
- Edeline, E., Bardonnnet, A., Bolliet, V., Dufour, S., Elie, P., 2005b. Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: Effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behavior. *Hormones and Behavior* 48, 53-63.
- Edeline, E., Dufour, S., Briand, C., Fatin, D., Elie, P., 2004. Thyroid status is related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. *Marine Ecology Progress Series* 282, 161-270.
- Edeline, E., Dufour, S., Elie, P., 2005a. Role of glass eel salinity preference in the control of habitat selection and growth plasticity in *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology Progress Series* 304, 191-199.
- Edeline, E., Dufour, S., Elie, P., 2009. Proximate and Ultimate Control of Eel Continental Dispersal. *Spawning Migration of the European Eel*, In: Thillart, G., Dufour, S., Rankin, J.C. (Eds.), Springer Netherlands, pp. 433-461.
- Edeline, E., Lambert, P., Rigaud, C., Elie, P., 2006. Effects of body condition and water temperature on *Anguilla anguilla* glass eel migratory behaviour. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 331(2), 217-225.
- Egusa, S., 1979. Notes on the culture of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Japanese eel-farming ponds. *Rapports et Proces-verbaux des Réunions. Conseil International pour l'Éxploration de la Mer* 174, 51-58.
- Elie, P., 1979. Contribution à l'étude des montées de civelles d'*Anguilla anguilla* L., dans l'estuaire de la Loire: Pêche, écophysiologie et élevage. Thèse de 3^{ème} Cycle, Université Rennes I, 383p.

- Elie, P., Lecomte-Finiger, R., Cantrelle, I., Charlon, N., 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* (poisson téléostéen anguilliforme). *Vie & Milieu* 32, 149-157.
- Elie, P., Rochard, E., 1994. Migration des civelles d'anguilles (*Anguilla anguilla* L.) dans les estuaires, modalités du phénomène et caractéristiques des individus. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 335, 81-98.
- Esterhuysen, M.M., Helbing, C.C., van Wyk, J.H., 2008. Temporal expression of two cytochrome p450 aromatase isoforms during development in *Oreochromis mossambicus*, in association with histological development. *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics* 3, 297-306.
- Esteve, C., Biosca, E.G., Amaro, C., 1993. Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared in fresh water. *Diseases of Aquatic Organisms* 16, 15-20.
- Esteve, C., Garay, E., 1991. Heterotrophic bacterial flora associated with European eel *Anguilla anguilla* reared in freshwater. *Nippon Suisan Gakkai* 57, 1369-1375.

F

- Fenske, M., Segner, H., 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 67, 105-126.
- Feunteun, E., Acou, A., Laffaille, P., Legault, A., 2000. European eel *Anguilla anguilla*: prediction of spawner escapement from continental population parameters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1627-1635.
- Feunteun, E., Lafaille, P., Robinet, T., Briand, C., Baisez, A., Olivier, J.M., Acou, A., 2003. A review of upstream migration and movements in inland waters by anguillid eels: towards a general theory. In: Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, K. (Eds.), *Eel Biology*. Springer Verlag, Tokyo, pp.191-213.
- Fishelson, L., 1992. Comparative Gonad Morphology and Sexuality of the Muraenidae (Pisces, Teleostei). *Copeia* 1992: 197-209.
- Fisher, J.B., 1954. Evolution and bird sociality. In: Huxley J, Hardy AC, Ford EB, editors. *Evolution as a process*. London: Allen & Unwin. p. 71-83.
- Fisher, R. A., 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford University Press.
- Fogarty, S., Cote, J., Sih, A., 2011. Social Personality Polymorphism and the Spread of Invasive Species: A Model. *American Naturalist* 177, 273-287.
- Fontaine, M., 1936. Sur la maturation complète des organes génitaux de l'anguille male et l'émission spontanée. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris* 202, 132-1314.
- Fontaine, M., Bertand, E., Lopez, E. and Callamand, O., 1964. Sur la maturation des organes génitaux de l'anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des oeufs en aquarium. *Compte Rendu Académie des Sciences* 259, 2907-2910.
- Fontaine, M., Raffy, A., 1932. Recherches physiologiques et biologiques sur les civelles. *Bulletin de l'Institut Océanographique* 603, 1-18.
- Fontaine, Y., A., 1994. L'argenture de l'anguille : Métamorphose, anticipation, adaptation. *Bulletin Français De La Pêche Et De La Pisciculture*, 171-185.
- Forster, M.E., 1981. Oxygen-consumption and apnea in the shortfin eel, *Anguilla australis* Schmidtii. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 15, 85-90.
- Forward Jr, R.B., Tankersley, R.A., 2001. Selective tidal-stream transport of marine animals. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 39, 305-353.

- Foster, E.G., Ritz, D.A., Osborn, J.E., Swadling, K.M., 2001. Schooling affects the feeding success of Australian salmon (*Arripis trutta*) when preying on mysid swarms (*Paramesopodopsis rufa*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 261, 93-106.
- Francis, R., 1988. Are growth parameters estimated from tagging and age-length data comparable? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 936-942.
- Francis, R.C., 1984. The effects of bidirectional selection for social dominance on agonistic behaviour and sex ratios in the Paradise fish (*Macropodus opercularis*). *Behaviour* 90, 25-45.
- Francis, R.C., 1990. Temperament in a fish: a longitudinal study of the development of individual differences in aggression and social rank in the Midas cichlid. *Ethology* 86, 311-325.
- Francis, R.C., 1992. Sexual lability in teleosts: developmental factors. *The Quarterly Review of Biology* 67, 1-18.
- Francis, R.C., Barlow, G.W., 1993. Social control of primary sex differentiation in the Midas cichlid. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 90, 10673-10675.
- Frank, S.A., Swingland, I.R., 1988. Sex-ratio under conditional sex expression. *Journal of Theoretical Biology* 135, 415-418.
- Freud, S., 1877. Beobachtungen über Gestaltung und feineren Bau der als Hoden beschriebenen Lappenorgane des Aals. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie Wissenschaftend Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Classe* 75, 419-431.
- Freyhof, J., Kottelat, M., 2010. *Anguilla anguilla*. In, IUCN 2011. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2011.2. www.iucnredlist.org.
- Friedland, K. D., Miller, M. J., Knights, B., 2007. Oceanic changes in the Sargasso Sea and declines in recruitment of the European eel. *Ices Journal of Marine Science* 64, 519-530.



- Gabe, M., 1968. Techniques histologiques. Masson et Cie, Paris.
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissiere, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68, 810-821.
- Gallindo, Keith, Persat, Feunteun 2009. La liste rouge des poissons d'eau douce de métropole, UICN, MNHN, ONEMA, Société Française d'ichtyologie. Dossier de presse décembre 2009.
- Gamperl, A.K., Vijayan, M.M., Boutilier, R.G., 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes - techniques and applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 215-255.
- Garn, S., Clark, L., 1953. The sex difference in the basal metabolic rate. *Child Development* 24, 215-224.
- Gascuel, D., 1986. Flow carried and active swimming migration of the glass eel (*Anguilla anguilla*) in the tidal area of a small estuary on the French Atlantic coast. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 40, 321-326.
- Geffroy, B., Bardonnnet, A., 2012. Differential effects of behaviour, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance. *Ecology of Freshwater Fish* 21, 469-482.

- Geffroy, B., Fostier, A., Guiguen, Y., Bardonnet, A., 2012. Unusual cases of adult intersexuality in the European eel *Anguilla anguilla*. *Sexual Development. Sous presse*
- Geffroy, B., Ladhar, C., Cambier, S., Treguer-Delapierre, M., Brèthes, D., Bourdineaud, J.P., 2012. Impact of dietary gold nanoparticles on zebrafish: the role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 6, 144-160.
- Gerlai, R., Csanyi, V., 1990. Genotype-environment interaction and the correlation structure of behavioral elements in paradise fish *Macropodus opercularis*. *Physiology, Behavior* 47, 343-356.
- Ghiselin, M.T., 1969. The Evolution of Hermaphroditism Among Animals. *The Quarterly Review of Biology* 44, 189-208.
- Ghiselin, M.T., 1974. *The Economy of Nature and the Evolution of Sex*. Berkeley: University of California Press, 346 pp.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L., 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293, 2248-2251.
- Gilmour, K.M., DiBattista, J.D., Thomas, J.B., 2005. Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. *Integrative and Comparative Biology* 45, 263-273.
- Giraldeau, L.A., Livoreil, B., 1998. Game theory and social foraging. In L. A. Dugatkin and H. K. Reeve (Eds), *Game Theory and Animal Behavior*. New York: Oxford University Press. pp 16–37.
- Glova, G.J., Jellyman, D.J., 2000. Size-related differences in diel activity of two species of juvenile eel (*Anguilla*) in a laboratory stream. *Ecology of Freshwater Fish* 9, 210-218.
- Godin, J.G.J., Dugatkin, L.A., 1996. Female mating preference for bold males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10262-10267.
- Gosling, S.D., John, O.P., 1999. Personality dimensions in nonhuman animals: A cross-species review. *Current Directions in Psychological Science* 8, 69-75.
- Grandi, G., Chicca, M., Tagliati, E., Arveda, M., Rossi, R., 2010. Immunolocalization of steroidogenic enzymes in gonads of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Applied Ichthyology* 26, 40-48.
- Grandi, G., Poerio, F., Colombo, G., Chicca, M., 2000. Effects of diet supplementation with carp ovary on gonad differentiation and growth of the European eel; *Journal of Fish Biology* 57, 1505-1525.
- Grant, J.W.A., Guha, R.T., 1993. Spatial clumping of food increases its monopolization and defense by convict cichlids, *Cichlasoma nigrofasciatum*. *Behavioural Ecology* 4, 293-296.
- Grassi, G.B., 1897. The reproduction and metamorphosis of the common eel (*Anguilla vulgaris*). *Proceedings of the Royal Society of London B* 60, 262–271
- Graynoth, E., Taylor, M., 2004. Growth of juvenile eels (*anguilla* spp.) in lowland streams in new zealand. *Fisheries Research* 66, 95-106.
- Griffiths, R.W., Newlands, N.K., Noakes, D.L.G., Beamish, F.W.H., 2004. Northern pike (*esox lucius*) growth and mortality in a northern ontario river compared with that in lakes: Influence of flow. *Ecology of Freshwater Fish* 13, 136-144.
- Griffiths, S.W., Magurran, A.E., 1999. Schooling decisions in guppies (*Poecilia reticulata*) are based on familiarity rather than kin recognition by phenotype matching. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45, 437-443.
- Gross, M. R., Coleman, R. M., McDowall, R. M., 1988. Aquatic Productivity and the Evolution of Diadromous Fish Migration. *Science* 239, 1291-1293.
- Guérault, D., Désaunay, Y., Lecomte Finiger, R., Grellier, P., Beillois, P., 1995. Biometry and otolithometry of *Anguilla anguilla* (L.) glass eels: towards a model for seasonal variation. In VIII th SEI Congress, OVIEDO.
- Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin, S.A.M., Fostier,

- A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development* 54, 154-162.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., Chang, C.F., 2010. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 352-366.
- Guillouët, J., Acou, A., Mounaix, B., Legault, A., Feunteun, E., 2000. Etude de la restauration de la population d'anguille sur le Frémur : synthèse du suivi de 1995 à 1999, rapport Fish-Pass, 104 p.



- Hamilton, I.M., Dill, L.M., 2002. Monopolization of food by zebrafish (*Danio rerio*) increases in risky habitats. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 80, 2164-2169.
- Hamilton, W.D., 1967. Extraordinary sex ratios. *Science* 156, 477– 488.
- Han, Y. S., Tzeng, W. N., 2006. Use of the sex ratio as a means of resource assessment for the Japanese eel *Anguilla japonica*: A case study in the Kaoping River, Taiwan. *Zoological Studies* 45, 255-263.
- Han, Y.S., Liao, I.C., Huang, Y.-S., He, J.-T., Chang, C.-W., Tzeng, W.-N., 2003. Synchronous changes of morphology and gonadal development of silvering Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 219, 783-796.
- Han, Y.S., Tzeng, W.N., Liao, I.C., 2009. Time series analysis of taiwanese catch data of japanese glass eels *Anguilla japonica*: Possible effects of the reproductive cycle and el nino events. *Zoological Studies* 48, 632-639.
- Haro, A., 2003. *Downstream migration of silver-phase anguillid eels*.
- Hattori, R.S., Fernandino, J.I., Kishii, A., Kimura, H., Kinno, T., Oura, M., Somoza, G.M., Yokota, M., Strussmann, C.A., Watanabe, S., 2009. Cortisol-induced masculinization: Does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS ONE* 4.
- Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraiishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y., Kitano, T., 2010. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Molecular Reproduction and Development* 77, 679-686.
- Hayward, A., Gillooly, J.F., 2011. The cost of sex: Quantifying energetic investment in gamete production by males and females. *PLoS ONE* 6.
- Heinsbroek, L.T.N., Van Hooff, P.L.A., Swinkels, W., Tanck, M.W.T., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2007. Effects of feed composition on life history developments in feed intake, metabolism, growth and body composition of european eel, *Anguilla anguilla*. *Aquaculture* 267, 175-187.
- Helfman, G.S., 1986. Diel distribution and activity of American eels (*Anguilla rostrata*) in a cave-spring. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43, 1595-1605.
- Helfman, G.S., 2007. Fish conservation: a guide to understanding and restoring global aquatic biodiversity and fishery resources. Island Press, Washington, DC
- Helfman, G.S., Facey, D.E., Hales, L.S., Bozeman Jr, E.L., 1987. Reproductive ecology of the American eel. *American Fisheries Society Symposium* 1, 42-56.
- Hickman, R.A., 1981. Densities and swimbladder development of juvenile American eels, *Anguilla rostrata* (Lesueur) as related to energetics of migration. *Journal of Fish Biology* 18, 507-517.

- Hinde, J., Demétrio, C.G.B., 1998. Overdispersion: Models and estimation. *Computational Statistics & Data Analysis* 27, 151-170.
- Hirsch, B.T., 2007. Costs and benefits of within-group spatial position: A feeding competition model. *The Quarterly Review of Biology* 82, 9-27.
- Hojesjo, J., Johnsson, J.I., Bohlin, T., 2002. Can laboratory studies on dominance predict fitness of young brown trout in the wild? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52, 102-108.
- Höjesjö, J., Johnsson, J.I., Petersson, E., Järvi, T., 1998. The importance of being familiar: Individual recognition and social behavior in sea trout (*Salmo trutta*). *Behavioral Ecology* 9, 445-451.
- Holder, J.L., Barlow, G.W., Francis, R.C., 1991. Differences in Aggressiveness in the Midas Cichlid Fish (*Cichlasoma citrinellum*) in Relation to Sex, Reproductive State and the Individual. *Ethology* 88, 297-306.
- Holmgren, K., 1996. Effect of water temperature and growth variation on the sex ratio of experimentally reared eels. *Ecology of Freshwater Fish* 5, 203-212.
- Holmgren, K., Mosegaard, H., 1996. Implications of individual growth status on the future sex of the European eel. *Journal of Fish Biology* 49, 910-925.
- Holmgren, K., Wickstrom, H., 1993. Sex dimorphism in cultured eels (*Anguilla anguilla* L.). *Nordic Journal of Freshwater Research* 68, 80-90.
- Holmgren, K., Wickstrom, H., Clevestam, P., 1997. Sex-related growth of European eel, *Anguilla anguilla*, with focus on median silver eel age. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2775-2781.
- Honkoop, P.J.C., 2003. Physiological costs of reproduction in the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* - how expensive is reproduction? *Oecologia* 135, 176-183.
- Huertas, M., Canario, A.V.M., Hubbard, P.C., 2008. Chemical communication in the Genus *Anguilla*, a minireview. *Behaviour* 145, 1389-1407.
- Huertas, M., Cerda, J., 2006. Stocking density at early developmental stages affects growth and sex ratio in the European eel *Anguilla anguilla*. *Biological Bulletin* 211, 286-296.
- Huertas, M., Hubbard, P.C., Canario, A.V.M., Cerda, J., 2007. Olfactory sensitivity to conspecific bile fluid and skin mucus in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* 70, 1907-1920.
- Hunt, D. M., Dulai, K. S., Partridge, J. C., Cottrill, P., Bowmaker, J. K., 2001. The molecular basis for spectral tuning of rod visual pigments in deep-sea fish. *Journal of Experimental Biology* 204, 3333-3344.
- Huntingford, F.A., 1976a. Relationship between anti-predator behavior and aggression among conspecifics in 3-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour* 24, 245-260.
- Huntingford, F.A., 1976b. Comparison of reaction of sticklebacks in different reproductive conditions towards conspecifics and predators. *Animal Behaviour* 24, 694-697.
- Huntingford, F.A., 1976c. Relationship between interspecific and intraspecific aggression. *Animal Behaviour* 24, 485-497.



- Ibbotson, A., Smith, J., Scarlett, P., Aprahamian, M.W., 2002. Colonisation of freshwater habitats by the European eel *Anguilla anguilla*. *Freshwater Biology* 47(9), 1696-1706.
- ICES, 2007. Report of the joint EIFAC/ICES Working Group Eel (WGEEL), 03-07 September 2007, Bordeaux, France. ICES Document CM 2007/ACFM, 23.

- ICES, 2008. Report of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels (WGEEL), 3–9 September 2008, Leuven, Belgium, ICES CM 2008/ACOM:15, 212 p.
- ICES, 2011. Report on the eel stock and fishery in France 2010/11. pp 339-396.
- Iglesias, T., Lobon-Cervia, J., Costa Dias S., Antunes, C., 2010. Variation of life traits of glass eels of *Anguilla anguilla* (L.) during the colonization of Rios Nalon and Minho estuaries (northwestern Iberian Peninsula). *Hydrobiologia* 651, 213-223.
- Ijiri, S., Kazeto, Y., Lokman, P.M., Adachi, S., Yamauchi, K., 2003. Characterization of a cDNA encoding p-450 aromatase (cyp19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development. *General and Comparative Endocrinology* 130, 193-203.
- Imbert, H., Arrowsmith, R., Dufour, S., Elie, P., 2008. Relationships between locomotor behaviour, morphometric characters and thyroid hormone levels give evidence of stage-dependent mechanisms in European eel upstream migration. *Hormones and Behavior* 53, 69-81.
- Imbert, H., Beaulaton, L., Rigaud, C., Elie, P., 2007. Evaluation of visible implant elastomer as a method for tagging small european eels. *Journal of Fish Biology* 71, 1546-1554.
- Iwama, G. K., McGeer, J.C., Bernier, N., 1992. The effects of stock and rearing history on the stress response in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *ICES Marine Science Symposium* 194, 67-83.



- Jafri, S.I.H., Ensor, D.M., 1979. Occurrence of an intersex condition in the roach *Rutilus rutilus* (L.). *Journal of Fish Biology* 14, 547-549.
- Jakob, E., Neuhaus, H., Steinhagen, D., Luckhardt, B., Hanel, R., 2009. Monitoring of Herpesvirus anguillae (HVA) infections in European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in northern Germany. *Journal of Fish Diseases* 32, 557-561.
- Jegstrup, I.M., Rosenkilde, P., 2003. Regulation of post-larval development in the European eel, thyroid hormone level, progress of pigmentation and changes in behaviour. *Journal of Fish Biology* 63, 168-175.
- Jellyman, D.J., 1977. Invasion of a New Zealand freshwater stream by glass-eels of two *Anguilla* spp. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 11, 193-209.
- Jellyman, D. J., 1997. Variability in growth rates of freshwater eels *Anguilla* spp. in New Zealand. *Ecology of Freshwater Fish* 6, 108-115.
- Jellyman, D.J., 2001. The influence of growth rate on the size of migrating female eels in lake Ellesmere, New-Zealand. *Journal of Fish Biology* 58, 725-736.
- Jeng, S.R., Pasquier, J., Yueh, W.S., Chen, G.R., Lee, Y.H., Dufour, S., Chang, C.F., 2012. Differential regulation of the expression of cytochrome p450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain-pituitary-ovarian axis of the japanese eel (*Anguilla japonica*) reveals steroid dependent and independent mechanisms. *General and Comparative Endocrinology* 175, 163-172.
- Jessop, B.M., 2010. Geographic effects on american eel (*anguilla rostrata*) life history characteristics and strategies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67, 326-346.
- Jessop, B.M., Shiao, J.-C., Iizuka, Y., Tzeng, W.-N., 2002. Migratory behaviour and habitat use by American eels *Anguilla rostrata* as revealed by otolith microchemistry. *Marine Ecology-Progress Series* 233, 217-229.
- Jobling, M., 1981. Temperature tolerance and the final preferendum - rapid methods for the

- assessment of optimum growth temperatures. *Journal of Fish Biology* 19, 439-455.
- Jobling, M., 2010. Are compensatory growth and catch-up growth two sides of the same coin? *Aquaculture International* 18, 501-510.
- John, O. P., Srivastava, S., 1999. The Big Five trait taxonomy: History, measurement, and theoretical perspectives. In L. A. Pervin & O. P. John (Eds.), New York: Guilford Press, *Handbook of personality: Theory and research* 2nd ed., pp. 102–138.
- Johnson, J.C., Sih, A., 2007. Fear, food, sex and parental care: A syndrome of boldness in the fishing spider, *Dolomedes triton*. *Animal Behaviour* 74, 1131-1138.
- Johnsson, J.I., 1997. Individual recognition affects aggression and dominance relations in rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*. *Ethology* 103, 267-282.
- Johnsson, J.I., Björnsson, B.T., 1994. Growth hormone increases growth rate, appetite and dominance in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Animal Behaviour* 48, 177-186.
- Johnsson, J.I., Bohlin, T., 2006. The cost of catching up: increased winter mortality following structural growth compensation in the wild. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273, 1281-1286.
- Jonassen, T.M., Imsland, A.K., Stefansson, S.O., 1999. The interaction of temperature and fish size on growth of juvenile halibut. *Journal of Fish Biology* 54, 556-572.
- Jones, V.R.P.S., J, W., 1966. On the sex and distribution of the freshwater eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Zoology* 150, 371-385.
- Jonsson, B., Jonsson, N., 1993. Partial migration-niche shift versus sexual-maturation in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3, 348-365.
- Jonsson, N., Jonsson, B., 1997. Energy allocation in polymorphic brown trout. *Functional Ecology* 11, 310-317.



- Kagawa, H., Gen, K., Okuzawa, K., Tanaka, H., 2003. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and p450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red sea bream, *Pagrus major*. *Biology of Reproduction* 68, 1562-1568.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Unuma, T., Nomura, K., 2005. The first success of glass eel production in the world: basic biology on fish reproduction advances new applied technology in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 31, 193-199.
- Kalujnaia, S., McWilliam, I. S., Zaguinaiko, V. A., Feilen, A. L., Nicholson, J., Hazon, N., Cutler, C. P., Cramb, G., 2007. Transcriptomic approach to the study of osmoregulation in the European eel *Anguilla anguilla*. *Physiological Genomics* 31, 385-401.
- Kalujnaia, S., McWilliam, I., Feilen, A., Nicholson, J., Hazon, N., Cramb, G., 2007. Novel genes discovered by transcriptomic approach to the salinity study in European eel *Anguilla anguilla*. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular, Integrative Physiology* 146, S94-S94.
- Kamler E., 1970. The main parameters regulating the level of energy expenditure in aquatic animals. *Polish Archives of Hydrobiology*. 17, 201–216.
- Kamler E., 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 18, 143-200.
- Kearney, M., Jeffs, A., Lee, P., 2011. Development and early differentiation of male gonads in farmed New Zealand shortfin eel, *Anguilla australis*. *New Zealand Natural Sciences* 36, 33-44.
- Kennedy, C. R., 2007. The pathogenic helminth parasites of eels. *Journal of Fish Diseases* 30,

319-334.

- Kettle, A.J., Haines, K., 2006. How does the European eel (*Anguilla anguilla*) retain its population structure during its larval migration across the North Atlantic Ocean? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63, 90-106.
- Kettle, A.J., Heinrich, D., Barrett, J.H., Benecke, N., Locker, A., 2008. Past distributions of the European freshwater eel from archaeological and palaeontological evidence. *Quaternary Science Reviews* 27, 1309-1334.
- Khan, I.A. 1983. Contrôle hormonal du fonctionnement testiculaire chez un poisson téléostéen (*Anguilla anguilla* L.), structure histologique, morphologie et androgènes plasmatiques. Thèse de 3^{ème} Cycle, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6.
- Kim, W.S., Yoon, S.J., Kim, J.W., Lee, J.A., Lee, T.W., 2006. Metabolic response under different salinity and temperature conditions for glass eel *Anguilla japonica*. *Marine Biology* 149, 1209-1215.
- Kirsch, R., Nonnotte, G., 1977. Cutaneous respiration in three freshwater teleosts. *Respiration Physiology* 29, 339-354.
- Kleiber, M., 1961. The fire of life. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Knapp, R., Marsh-Matthews, E., Vo, L., Rosencrans, S., 2011. Stress hormone masculinizes female morphology and behaviour. *Biology Letters* 7, 150-152.
- Knights, B., 1987. Agonistic behavior and growth in the European eel, *Anguilla anguilla* L, in relation to warm water aquaculture. *Journal of Fish Biology* 31, 265-276.
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, H.J., 1999. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23, 925-935.
- Krause, J., Butlin, R.K., Peuhkuri, N., Pritchard, V.L., 2000. The social organization of fish shoals: A test of the predictive power of laboratory experiments for the field. *Biological Reviews* 75, 477-501.
- Krause, J., James, R., Croft, D.P., 2010. Personality in the context of social networks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365, 4099-4106.
- Krause, J., Loader, S.P., McDermott, J., Ruxton, G.D., 1998. Refuge use by fish as a function of body length-related metabolic expenditure and predation risks. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265, 2373-2379.
- Krause, J., Ruxton, G. D., 2002. Living in Groups. Oxford: Oxford University Press.
- Krueger, W.H., Oliveira, K., 1999. Evidence for environmental sex determination in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Environmental Biology of Fishes* 55, 381-389.
- Kuhlmann, H., 1975. Der Einfluss von Temperatur, Futter, Grosse und Herkunft auf die sexuelle Differenzierung von Glasaalen (*Anguilla anguilla*). *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 27, 139-155.
- Kushnirov, D., 1994. Individual growth in relation to agonistic behaviour, sexual development and metagametic sex determination in the European eel, *Anguilla anguilla* L., in aquaculture. Ph.D. thesis. Hebrew Univ., Jerusalem.
- Kushnirov, D., Degani, G., 1991. Growth performance of European eel (*Anguilla anguilla*) under controlled photocycle and shelter availability. *Aquacultural Engineering* 10, 219-226.
- Kushnirov, D., Degani, G., 1995. Sexual dimorphism in yellow European eels, *Anguilla anguilla* (L.). *Aquaculture Research* 26, 409-414.



- Laffaille, P., Acou, A., Guiouillet, J., Mounaix, B., Legault, A., 2006. Patterns of silver eel *Anguilla anguilla* L. sex ratio in a catchment. *Ecology of Freshwater Fish* 15, 583-588.
- Laffaille, P., Feunteun, E., Acou, A., Lefeuvre, J. C., 2000. Role of European eel *Anguilla anguilla* L. in the transfer of organic matter between marine and freshwater systems. In *International Association of Theoretical and Applied Limnology, Vol 27, Pt 1, Proceedings* Williams, W. D., ed., pp. 616-619.
- Lagomarsino, I. V., Conover, D. O., 1993. Variation in environmental and genotypic sex-determining mechanisms across a latitudinal gradient in the fish, *Menidia menidia*. *Evolution* 47, 487-494.
- Larsson, P., Hamrin, S., Okla, L., 1990. Fat content as a factor inducing migratory behaviour in the eel (*Anguilla anguilla* L.) to the Sargasso Sea. *Naturwissenschaften* 77, 488-490.
- Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P.Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C., 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 11, 219-232.
- Lecomte-Finiger, R., 1981. Etude expérimentale de la résistance thermique des civelles de Gironde et de Méditerranée. *Cahier du laboratoire d'hydrobiologie de Montereau* 12, 17-22.
- Lecomte-Finiger, R., 1992. Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Marine Biology* 114(2), 205-210.
- Lecomte-Finiger, R., Maunier, C., Khafif, M., 2004. Les larves leptocéphales, ces méconnues. *Cybiurn* 28(2), 83-95.
- Lee, T.V., 1979. Dynamiques des populations d'anguilles *Anguilla anguilla* (L.) des lagunes du bassin d'Arcachon. Thèse de 3^{ème} Cycle, Université de Montpellier. 218 p.
- Legault, A., 1996. Colonization dynamics of a catchment area by eel. Characterisation of migrating populations in a free access river. In: Leclerc et al., Proceedings of the second IAHR on habitats hydraulics. *Ecohydraulics* 200, pp. 89-98.
- Legault, A., Laffaille, P., Guillouët, J., Acou, A., 2004. Importance of specific fish passes for European eel (*Anguilla anguilla* L.) recruitment. In: De Jalon Lastra, D.G. & Martinez, P.V., eds. Proceedings of the fifth international symposium on ecohydraulics. *Aquatic habitat: analysis & restoration*. Madrid: IAHR, pp 937-941.
- Lehmann, J., Stürenberg, F.J., Mock D., Feldhaus, A., 2005. Untersuchungen auf virale Infektionen bei Aalen. *Fischer und Teichwirt* 6, 205-206.
- Lendvai, A.Z., Barta, Z., Liker, A., Bokony, V., 2004. The effect of energy reserves on social foraging: Hungry sparrows scrounge more. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 271, 2467-2472.
- Liao, I. C., Chang, S.L., 2001. Induced spawning and larval rearing of Japanese eel, *Anguilla japonica* in Taiwan. *Journal of Taiwan Fisheries Research* 9, 97-108.
- Limburg, K. E., Waldman, J. R., 2009. Dramatic Declines in North Atlantic Diadromous Fishes. *Bioscience* 59, 955-965.
- Limburg, K.E., Wickstrom, H., Svedang, H., Elfman, M., Kristiansson, P., 2002. Do stocked freshwater eels migrate? Evidence from the baltic suggests "yes", In: Dixon, D.A. (Ed.), Biology, management, and protection of catadromous eels, pp. 275-284.
- Liu, J.F., Guiguen, Y., Liu, S.J., 2009. Aromatase (p450arom) and 11 beta-hydroxylase (p450-11 Beta) genes are differentially expressed during the sex change process of the protogynous rice field eel, *Monopterus albus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 511-518.
- Lloyd, D.G., Bawa, K.S., 1984. Modification of the gender of seed plants in varying conditions. *Evolutionary Biology* 17, 255-338.

- Lobon-Cervia, J., Iglesias, T., 2008. Long-term numerical changes and regulation in a river stock of European eel *Anguilla anguilla*. *Freshwater Biology* 53, 1832-1844.
- Lobon-Cervia, J., Utrilla, C.G., Rincon, P.A., 1995. Variations in the population dynamics of the European eel *Anguilla anguilla* (L.) along the course of a Cantabrian river. *Ecology of Freshwater Fish* 4, 17-27.
- Lokman, P.M., Young, G., 1998. An intersexual migratory (silver) longfinned New Zealand eel and its gonadal response to treatment with salmon pituitary homogenate. *Journal of Fish Biology* 52, 547-555.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165, 367-389.
- Lucas M.C., Priede I.G., Armstrong J.D., Gindy A.N.Z., De Vera L., 1991. Direct measurements of metabolic activity and feeding behaviour of pike, *Esox lucius* L., in the wild, by the use of heart rate telemetry. *Journal of Fish Biology*. 39, 325-345.
- Luckenbach, J.A., Early, L.W., Rowe, A.H., Borski, R.J., Daniels, H.V., Godwin, J., 2005. Aromatase cytochrome p450: Cloning, intron variation, and ontogeny of gene expression in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology* 303A, 643-656.

M

- Maciak, S., Konarzewski, M., 2010. Repeatability of standard metabolic rate (SMR) in a small fish, the spined loach (*Cobitis taenia*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 157, 136-141.
- Maclean, A., Metcalfe, N.B., 2001. Social status, access to food, and compensatory growth in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 58, 1331-1346.
- Maes, G.E., Volckaert, F.A.M., 2002. Clinical genetic variation and isolation by distance in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Biological Journal of the Linnean Society* 77, 509-521.
- Maestro, M.A., Planas, J.V., Moriyama, S., Gutierrez, J., Planas, J., Swanson, P., 1997. Ovarian receptors for insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) and effects of IGF-I on steroid production by isolated follicular layers of the preovulatory coho salmon ovarian follicle. *General and Comparative Endocrinology* 106, 189-201.
- Magnhagen, C., 2006. Risk-taking behaviour in foraging young-of-the-year perch varies with population size structure. *Oecologia* 147, 734-743.
- Magnhagen, C., 2007. Social influence on the correlation between behaviours in young-of-the-year perch. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61, 525-531.
- Mank, J.E., Promislow, D.E.L., Avise, J.C., 2006. Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biological Journal of the Linnean Society* 87, 83-93.
- Mann, J., Stanton, M.A., Patterson, E.M., Bienenstock, E.J., Singh, L.O., 2012. Social networks reveal cultural behaviour in tool-using dolphins. *Nat Commun* 3, 980.
- Mann, R.H.K., Blackburn, J.H., 1991. The biology of the eel *Anguilla anguilla* (L.) in an english chalk stream and interactions with juvenile trout *Salmo trutta* l and salmon *Salmo salar* l. *Hydrobiologia* 218, 65-76.
- Matessi, G., Matos, R.J., Peake, T.M., McGregor, P.K., Dabelsteen, T., 2010. Effects of social environment and personality on communication in male siamese fighting fish in an artificial network. *Animal Behaviour* 79, 43-49.
- Mathot, K.J., Godde, S., Careau, V., Thomas, D.W., Giraldeau, L.A., 2009. Testing dynamic variance-sensitive foraging using individual differences in basal metabolic rates of zebra

- finches. *Oikos* 118, 545-552.
- Matsubara, H., Tanaka, H., Nomura, K., Kobayashi, T., Murashita, K., Kurokawa, T., Unuma, T., Kim, S.K., Lokman, M.P., Matsubara, T., Kagawa, H., Ohta, H., 2008. Occurrence of spontaneously spermiating eels in captivity. *Cybium* 32, 174-175.
- Maynard Smith, J., 1982. *Evolution and the theory of games*. Cambridge University Press, Cambridge, 226p.
- McCarthy, I.D., 2000. Temporal repeatability of relative standard metabolic rate in juvenile Atlantic salmon and its relation to life history variation. *Journal of Fish Biology* 57, 224-238.
- McCleave, J.D., 2001. Simulation of the impact of dams and fishing weirs on reproductive potential of silver-phase American eels in the Kennebec River basin, Maine. *North American Journal of Fisheries Management* 21, 592-605.
- McCleave, J.D., Edeline, E., 2009. Diadromy as a conditional strategy, patterns and drivers of eel movements in continental habitats. In *Challenges for diadromous fishes in a dynamic global environment* (Haro, A., Smith, K.L., Rulifson, R.A. et al. Eds). *American Fisheries Society Symposium* 69, 97-119.
- McCleave, J.D., Jellyman, D.J., 2004. Male dominance in the new zealand longfin eel population of a new zealand river: Probable causes and implications for management. *North American Journal of Fisheries Management* 24, 490-505.
- McCleave, J.D., Kleckner, C., 1982. Selective tidal stream transport in the estuarine migration of glass eels of the American eel (*Anguilla rostrata*). *Journal du Conseil International pour l'exploitation de la Mer* 40, 262-271.
- McCleave, J.D., Wippelhauser, G.S., 1987. Behavioral aspects of selective tidal stream transport in juvenile American eels. *American Fisheries Society Symposium* 1, 138-150.
- McCormick, S.D., Saunders, R.L., 1987. Preparatory physiological adaptations for marine life in salmonids: osmoregulation, growth and metabolism. *American Fisheries Society Symposium* 1, 211-229.
- McDowall, R. M., 1997. The evolution of diadromy in fishes revisited and its place in phylogenetic analysis. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 443-462.
- McKaye, K.R., 1977. Defense of a predators young by a herbivorous fish - unusual strategy. *American Naturalist* 111, 301-315.
- Mead, G.W., Bertelsen, E., Cohen, D.M., 1964. Reproduction among deep-sea fishes. *Deep-Sea Research* 11, 569-596.
- Medcof, J.C., 1966. Incidental records on behaviour of eels in lake ainslie, nova scotia. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 23, 1101-1105.
- Melia, P., Bevacqua, D., Crivelli, A. J., Panfili, J., De Leo, G. A., Gatto, M., 2006. Sex differentiation of the European eel in brackish and freshwater environments: a comparative analysis. *Journal of Fish Biology* 69, 1228-1235.
- Metcalf N.B., Taylor A.C., Thorpe J.E., 1995. Metabolic rate, social status and life-history strategies in Atlantic salmon. *Animal Behaviour*. 49, 431-436.
- Metcalf, N.B., 1986. Intraspecific variation in competitive ability and food-intake in salmonids - consequences for energy budgets and growth-rates. *Journal of Fish Biology* 28, 525-531.
- Milinski, M., 1987. Tit-for-tat in sticklebacks and the evolution of cooperation. *Nature* 325, 433-435.
- Miller, M.J., Kimura, S., Friedland, K.D., Knights, B., Kim, H., Jellyman, D.J, Tsukamoto, K., (2009). Review of ocean-atmospheric factors in the Atlantic and Pacific oceans influencing spawning and recruitment of anguillid eels. In, A. Haro, T. Avery, K. Beal, J. Cooper, R. Cunjak, M. Dadswell, R. Klauda, C. Moffitt, R. Rulifson and K. Smith (eds.),

- Challenges for diadromous fishes in a dynamic global environment. Bethesda, *American Fisheries Society Symposium* 69, 231-249.
- Miller, M.K., Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Yamade, Y., Tsukamoto, K., Ohkouchi, N., 2012. Are anguillid eels larvae marine snow feeders? *Biology Letter*. *In press*.
- Millidine K.J., Metcalfe N.B., Armstrong J.D., 2008. The use of ventilation frequency as an accurate indicator of metabolic rate in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 65, 2081-2087.
- Minegishi, Y., Aoyama, J., Inoue, J. G., Miya, M., Nishida, M., Tsukamoto, K., 2005. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34, 134-146.
- Minegishi, Y., Henkel, C.V., Dirks, R.P., van den Thillart, G., 2012. Genomics in eels - towards aquaculture and biology. *Marine Biotechnology* 14, 583-590.
- Mittwoch, U., 1996. Sex-determining mechanisms in animals. *Trends in Ecology & Evolution* 11, A63-A67.
- Moriarty, C., 1987. Factors influencing recruitment of the Atlantic species of anguillid eels. *American Fisheries Society Symposium* 1, 483-491.
- Murdoch, S.P., Docker, M.F., Beamish, F.W.H., 1992. Effect of density and individual variation on growth of sea lamprey (*petromyzon marinus*) larvae in the laboratory. *Canadian Journal of Zoology* 70, 184-188.
- Myers, R.A., Cadigan, N.G., 1993. Density-dependent juvenile mortality in marine demersal fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 1576-1590.

N

- Naismith, I.A., Knights, B., 1990. Studies of sampling methods and of techniques for estimating populations of eels, *Anguilla anguilla* L. *Aquaculture and Fisheries Management* 21,357-367.
- Naismith, I.A., Knights, B., 1993. The distribution, density and growth of the European eel, *Anguilla anguilla*, in the freshwater catchment of the River Thames. *Journal of Fish Biology* 42, 217-226.
- Nakamura, I., Kusakabe, M., Young, G., 2003. Regulation of steroidogenic enzyme mRNAs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian follicles in vitro. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 355-356.
- Nash, J.F., 1951. Non-cooperative games. *Annals of Mathematics* 54, 286-295.
- Natarajan, D., de Vries, H., Saaltink, D.J., de Boer, S.F., Koolhaas, J., 2009. Delineation of Violence from Functional Aggression in Mice: An Ethological Approach. *Behavioural Genetics* 39, 73-90.
- Navarro-Martin, L., Vinas, J., Ribas, L., Diaz, N., Gutierrez, A., Di Croce, L., Piferrer, F., 2011. DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the european sea bass. *PLoS Genetics* 7.
- Nespolo, R.F., Franco, M., 2007. Whole-animal metabolic rate is a repeatable trait: A meta-analysis. *Journal of Experimental Biology* 210, 3877-3878.
- Nevill, A.M., 1994. The need to scale for differences in body-size and mass - an explanation of kleiber 0.75-mass exponent. *Journal of Applied Physiology* 77, 2870-2873.
- Nicieza, A.G., Metcalfe, N.B., 1999. Costs of rapid growth: the risk of aggression is higher for fast-growing salmon. *Functional Ecology* 13, 793-800.
- Nishi, T., Kawamura, G., 2005. *Anguilla japonica* is already magnetosensitive at the glass eel

- phase. *Journal of Fish Biology* 67, 1213-1224.
- Nishi, T., Kawamura, G., Matsumoto, K., 2004. Magnetic sense in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, as determined by conditioning and electrocardiography. *Journal of Experimental Biology* 207, 2965-2970.
- Nishi, T., Kawamura, G., Sannomiya, S., 2005. Anosmic Japanese eel *Anguilla japonica* can no longer detect magnetic fields. *Fisheries Science* 71, 101-106.
- Nishikawa, S., Amaoka, K., Kawasawa, T., 1971. On the chromosomes on two species of eels. *Chromosomes Information Service* 12, 27-28.
- Nunney, L., 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population-size. *Evolution* 47, 1329-1341.

O

- O'Connor, K.I., Metcalfe, N.B., Taylor, A.C., 2000. Familiarity influences body darkening in territorial disputes between juvenile salmon. *Animal Behaviour* 59, 1095-1101.
- Oldfield, R.G., 2005. Genetic, abiotic and social influences on sex differentiation in cichlid fishes and the evolution of sequential hermaphroditism. *Fish and Fisheries* 6, 93-110.
- Oldfield, R.G., 2011. Gonad development in midas cichlids and the evolution of sex change in fishes. *Evolution & Development* 13, 352-360.
- Oliveira, K., 1999. Life history characteristics and strategies of the American eel, *Anguilla rostrata*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 795-802.
- Oliveira, K., McCleave, J. D., 2000. Variation in population and life history traits of the American eel, *Anguilla rostrata*, in four rivers in Maine. *Environmental Biology of Fishes* 59, 141-151.
- Oliveira, K., McCleave, J. D., Wippelhauser, G. S., 2001. Regional variation and the effect of lake: river area on sex distribution of American eels. *Journal of Fish Biology* 58, 943-952.
- Oliverieu, M., Oliverieu, J., 1985. Effect of 17 α -methyltestosterone on the skin and gonads of freshwater male silver eels. *General and Comparative Endocrinology* 57, 64-71.
- Olivotto, I., Mosconi, G., Maradonna, F., Cardinali, M., Carnevali, O., 2002. Diplodus sargus interrenal-pituitary response: Chemical communication in stressed fish. *General and Comparative Endocrinology* 127, 66-70.
- Oosten, J.E., Magnhagen, C., Hemelrijk, C.K., 2010. Boldness by habituation and social interactions: A model. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64, 793-802.
- O'Rian, J. M., Braude, S., 2001. Inbreeding versus outbreeding in captive and wild populations of naked mole-rats. In *Dispersal* (Ed. by Clobert, J., Danchin, E., Dhont, A. A. & Nichols, J. D.), pp. 451. Oxford: Oxford University Press.
- Ospina-Alvarez, N., Piferrer, F., 2008. Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLoS ONE* 3.
- Otake, T., 2003. Metamorphosis. In: "Eel biology" (K. Aida, K. Tsukamoto, K. Yamauchi, Eds.), p. 61-74, Springer, Hong Kong.
- Otterstatter, M.C., Thomson, J.D., 2007. Contact networks and transmission of an intestinal pathogen in bumble bee (*Bombus impatiens*) colonies. *Oecologia* 154, 411-421.
- Ottolenghi, F., Silvestri, C., Giordano, P., Lovatelli, A., New, M. B., 2004. Capture-based Aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. Food and Agriculture 1602 Organization of the United Nations, Rome.
- Overli, O., Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Overli, E., Winberg, S., 2002. Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness. *Journal of Experimental Biology* 205, 391-395.

Owen, S.F., 2001. Meeting energy budgets by modulation of behaviour and physiology in the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* 128, 631-644.



- Packard, A.S., 1879. The Breeding Habits of the Eel. *The American Naturalist* 13, 25-30
- Palm, S., Dannewitz, J., Prestegard, T., Wickstrom, H., 2009. Panmixia in European eel revisited: no genetic difference between maturing adults from southern and northern Europe. *Heredity* 103, 82-89.
- Palstra, A. P., Heppener, D. F. M., van Ginneken, V. J. T., Szekely, C., Van den Thillart, G., 2007b. Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352, 244-256
- Palstra, A. P., Van den Thillart, G., 2010. Swimming physiology of European silver eels (*Anguilla anguilla* L.): energetic costs and effects on sexual maturation and reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry* 36, 297-322.
- Palstra, A., 2006. Energetic Requirements and Environmental Constraints of Reproductive Migration and Maturation of European Silver Eel (*Anguilla anguilla* L.). Leiden: University of Leiden.
- Palstra, A., van Ginneken, V., Van den Thillart, G., 2008. Cost of transport and optimal swimming speed in farmed and wild European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Comparative Biochemistry A* 151, 37-44.
- Pankhurst, N. W., 1982. Relation of visual changes to the onset of sexual-maturation in the European eel (*Anguilla anguilla* L). *Journal of Fish Biology* 21, 127-140.
- Park, E. H., Grimm, H., 1981. Distribution of c-band heterochromatin in the ZW sex-chromosomes of European and American eels Anguillidae, Teleostomi. *Cytogenetics and Cell Genetics* 31, 167-174.
- Park, E.H., Kang, Y.S., 1979. Karyological confirmation of conspicuous ZW sex chromosomes in two species of Pacific anguilloid fishes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 23, 33-38.
- Parker, G.A., 1992. The evolution of sexual size dimorphism in fish. *Journal of Fish Biology* 41, 1-20.
- Parsons, J., Vickers, K., Warden, Y., 1977. Relationship between elver recruitment and changes in the sex ratio of silver eels *Anguilla anguilla* L. migrating from Lough Neagh, Northern Ireland. *Journal of Fish Biology* 10, 211-229.
- Passakas, T., 1981. Comparative studies on the chromosomes of the European eel *Anguilla anguilla* L. and the American eel *Anguilla rostrata* Le Sueur. *Folia Biologica-Krakow* 29, 41-57.
- Pedersen, M.I., 2000. Long-term survival and growth of stocked eel, *Anguilla anguilla* (L.), in a small eutrophic lake. *Dana* 12, 71-76.
- Pedersen, T., Jobling, M. 1989., Growth rate of large, sexually mature cod, *Gadus morhua*, in relation to condition and temperature during an annual cycle. *Aquaculture* 81, 161-168.
- Penaz, M., Wohlgemuth, E., Parova, J., 1991. Influence of feeding regimens on the growth and mortality during initial rearing of glass eels, *Anguilla anguilla*. *Folia Zoologica* 40, 273-283.
- Pepin, P., Dower, J.F., Davidson, F.J.M., 2003. A spatially explicit study of prey-predator interactions in larval fish: assessing the influence of food and predator abundance on

- larval growth and survival. *Fisheries Oceanography* 12, 19-33.
- Peters, G., Delventhal, H., Klinger, H., 1980. Physiological and morphological effects of social stress in eel, (*Anguilla anguilla* L.). *Archiv Für Fischereiwissenschaft* 30, 157-180.
- Peterson, R. H., Martin - Robichaud, D. J., 1994. First feeding and growth of elvers of the American eel *Anguilla rostrata* Lesueur at several temperature regimes. [S.L.]: Minister of Supply and Services.
- Peuhkuri, N., Ranta, E., Juvonen, S.K., Lindstrom, K., 1995. Schooling affects growth in the 3 spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish Biology* 46, 221-226.
- Pfeiler, E., 1999. Developmental physiology of elopomorph leptocephali. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular, Integrative Physiology* 123, 113-128.
- Pieau, C., Dorizzi, M., Dournon, C., 1989. Influence of environmental factors on sexual differentiation in vertebrates: Evolutionary aspects. *Geobios* 12, 303-311.
- Pike, T. W., Samanta, M., Lindström, J., Royle, N. J., 2008. Behavioural phenotype affects interactions in a social network. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275, 2515–2520.
- Poole, W. R., Reynolds, J. D., 1996. Growth rate and age at migration of *Anguilla anguilla*. *Journal of Fish Biology* 48, 633-642.
- Poole, W.R., Reynolds, J.D., 1998. Variability in growth rate in European eel *Anguilla anguilla* (L.) in a western Irish catchment. *Biology and Environment-Proceedings of the Royal Irish Academy* 98B, 141-145.
- Poole, W.R., Reynolds, J.D., Moriarty, C., 2004. Early post-larval growth and otolith patterns in the eel *Anguilla anguilla*. *Fisheries Research* 66, 107-114.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., 1999. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *General and Comparative Endocrinology* 116, 122-132.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., 2001. Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. *Hormones and Behavior* 40, 419-427.
- Power, J. H., McCleave, J. D., 1983. Simulation of the North Atlantic Ocean drift of *Anguilla leptocephali*. *Fisheries Bulletin* 81, 483-500
- Priede, I.G., 1985. Metabolic scope in fish. In Tyler, P. and Calow, P. (Eds), *Fish energetics new perspectives*. Croom Helm, London.
- Pujolar, J.M., Maes, G.E., Vancoillie, C., Volckaert, F.A.M., 2005. Growth rate correlates to individual heterozygosity in the european eel, *Anguilla anguilla* L. *Evolution* 59, 189-199.

Q

- Quinn, T.P., Hendry, A.P., Wetzel, L.A., 1995. The influence of life history trade-offs and the size of incubation gravels on egg size variation in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Oikos* 74, 425-438.

R

- R Development Core Team, 2009. R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, ISBN 3-900051-07-0, <http://cran.r-project.org/>.
- Rasheeda, M.K., Sridevi, P., Senthilkumaran, B., 2010. Cytochrome p450 aromatases: Impact on gonadal development, recrudescence and effect of hCG in the catfish, *Clarias gariepinus*. *General and Comparative Endocrinology* 167, 234-245.

- Reale, D., Festa-Bianchet, M., 2003. Predator-induced natural selection on temperament in bighorn ewes. *Animal Behaviour* 65, 463-470.
- Régnier T., Bolliet V., Labonne J., Gaudin P., 2010. Assessing maternal effects on metabolic rate dynamics along early development in brown trout (*Salmo trutta*): an individual-based approach. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*. 180, 25-31.
- Regnier, T., Labonne, J., Gaudin, P., Bolliet, V., 2012. Influence of energetic status on ontogenetic niche shifts: Emergence from the redd is linked to metabolic rate in brown trout. *Oecologia* 168, 371-380.
- Reimers, E., Kjørrefjord, A.G., Stavøstrand, S.M., 1993. Compensatory growth and reduced maturation in second sea winter farmed Atlantic salmon following starvation in february and march. *Journal of Fish Biology* 43, 805-810.
- Reinecke, M., 2010. Insulin-like growth factors and fish reproduction. *Biology of Reproduction* 82, 656-661.
- Riemann, L., Alfredsson, H., Hansen, M. M., Als, T. D., Nielsen, T. G., Munk, P., Aarestrup, K., Maes, G. E., Sparholt, H., Petersen, M. I., Bachler, M., Castonguay, M., 2010. Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biology Letters* 6, 819-822.
- Rijsewijk, F., Pritz-Verschuren, S., Kerkhoff, S., Botter, A., Willemsen, M., van Nieuwstadt, T., Haenen, O., 2005. Development of a polymerase chain reaction for the detection of anguillid herpesvirus DNA in eels based on the herpesvirus DNA polymerase gene. *Journal of Virological Methods* 124, 87-94.
- Robertson, B.C., Elliott, G.P., Eason, D.K., Clout, M.N., Gemmell, N.J., 2006. Sex allocation theory aids species conservation. *Biology Letters* 2, 229-231.
- Robins, C. R., Cohen, D. M., Robins, C. H., 1979. The Eels, *Anguilla* and *Histiobranchus*, Photographed on the Floor of the Deep Atlantic in the Bahamas. *Bulletin of Marine Science* 29, 401-405.
- Rodríguez, A., Gisbert, E., Rodríguez, G., Castelló-Orvay, F., 2005. Histopathological observations in european glass eels (*Anguilla anguilla*) reared under different diets and salinities. *Aquaculture* 244, 203-214.
- Roff, D., 1992. The evolution of life histories: theory and analysis. New York: Chapman & Hall. 528 pp.
- Roff, D.A., 1988. The evolution of migration and some life history parameters in marine fishes. *Environmental Biology of Fishes* 22, 133-146.
- Rogers, W., Barlow, G.W., 1991. Sex-differences in mate choice in a monogamous biparental fish, the midas cichlid (*Cichlasoma citrinellum*). *Ethology* 87, 249-261.
- Roncarati, A., Melotti, P., Mordenti, O., Gennari, L., 1997. Influence of stocking density of European eel *Anguilla anguilla*, L. elvers on sex differentiation and zootechnical performances. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* 13, 131-136.
- Rønning, B., Moe, B., Bech, C., 2005. Long-term repeatability makes basal metabolic rate a likely heritable trait in the zebra finch *Taeniopygia guttata*. *Journal of Experimental Biology* 208, 4663-4669.
- Rosell, R., Evans, D., Allen, M., 2005. The eel fishery in Lough Neagh, Northern Ireland - an example of sustainable management? *Fisheries Management and Ecology* 12, 377-385.
- Rossi, R., Carrieri, A., Franzoi, P., Cavallini, G., Gnes, A., 1988. A study of eel (*Anguilla anguilla* L.) population dynamics in the Comacchio lagoons (Italy) by mark-recapture method. *Oebalia* 14, 87-106.
- Rotllant, G., Moranta, J., Massuti, E., Sarda, F., Morales-Nin, B., 2002. Reproductive biology

of three gadiform fish species through the mediterranean deep-sea range (147-1850 m). *Scientia Marina* 66, 157-166.

- Rowe, D.K., Thorpe, J.E., Shanks, A.M., 1991. Role of fat stores in the maturation of male atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 405-413.
- Rozen, S., Skaletsky, J.H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, in: S., Krawetz, S., Misener (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.
- Rubio, V.C., Sanchez, E., Cerda-Reverter, J.M., 2010. Compensatory feeding in the sea bass after fasting and physical stress. *Aquaculture* 298, 332-337.
- Ruffo, S., Kareiva, P.M., 2009. Using science to assign value to nature. *Frontiers in Ecology and the Environment* 7, 3-3.



- Sade D.S. 1967. *Primates* Université of Chicago Press, pp 99-114.
- Saglio, P., 1982. Piégeage d'anguilles (*Anguilla anguilla* L.) dans un milieu naturel au moyen d'extraits biologiques d'origine intraspécifique. Mise en évidence de l'attractivité phéromonale du mucus épidermique. *Acta Oecologica* 3, 223-231.
- Saglio, P., Fauconneau, B., 1988. Free amino acid content in the skin mucus of yellow and silver eel, *Anguilla anguilla* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 91, 101-104.
- Saillant, E., Chatain, B., Menu, B., Fauvel, C., Vidal, M.O., Fostier, A., 2003. Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Zoology* 260, 53-63.
- Salvadori S., Cau A., Coluccia E., Millia A., Deiana A.M., 1994. Karyotype, C- and G-banding, and nucleolar organizer regions of *Conger conger* (Osteichthyes, Anguilliformes). *Bollettino di Zoologia* 61, 59-63.
- Santos, M.A., Weber, M., 1992. Growth studies on monthly captured glass eels from the Rio Minho in two recirculation systems. *Irish Fisheries Investigations Series A* 36, 35-40.
- Satoh, H., Nimura, Y., Hibiya, T., 1992. Sex control of the Japanese eel by an estrogen (desna) in feed. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1211-1218.
- Scharer, L., 2009. Tests of sex allocation theory in simultaneously hermaphroditic animals. *Evolution* 63, 1377-1405.
- Scharer, L., Karlsson, L.M., Christen, M., Wedekind, C., 2001. Size dependent sex allocation in a simultaneous hermaphrodite parasite. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 55-67.
- Scheinert, P., Baath, C., 2004. Das Aal-Herpesvirus – Eine neue Bedrohung der Aalbestände? *Fischer und Teichwirt* 6, 692-693.
- Scheinert, P., Baath, C., 2006. Untersuchungen zum Vorkommen des Herpesvirus anguillae (HVA) in den Aalpopulationen bayerischer Gewässer. *Fischer und Teichwirt* 8, 289-293.
- Schjolden, J., Pulman, K.G.T., Metcalfe, N.B., Winberg, S., 2006. Divergence in locomotor activity between two strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with contrasting stress responsiveness. *Journal of Fish Biology* 68, 920-924.
- Schmidt, J., 1922. The breeding places of the eel. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 211, 179-208.
- Schmidt, J., 1925. The breeding places of the eel. *Annual Report Smithsonian Institute* 1924, 279-316.
- Schnute, J., Fournier, D., 1980. A new approach to length-frequency analysis: Growth structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37, 1337-1351.

- Schuett, W., Tregenza, T., Dall, S.R.X., 2010. Sexual selection and animal personality. *Biological Reviews* 85, 217-246.
- Sebert, M. E., Amerand, A., Vettier, A., Weltzien, F. A., Pasqualini, C., Sebert, P., Dufour, S., 2007. Effects of high hydrostatic pressure on the pituitary-gonad axis in the European eel, (*Anguilla anguilla* L). *General and Comparative Endocrinology* 153, 289-298.
- Sebert, P., Pequeux, A., Simon, B., Barthelemy, L., 1995. Effects of hydrostatic-pressure and temperature on the energy-metabolism of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*) and the yellow eel (*Anguilla anguilla*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 112, 131-136.
- Sebert, P., Vettier, A., Belhomme, M., 2004. A simple relationship to calculate eel surface area. *Animal Biology* 54, 131-136.
- Secor, D.H., 1999. Specifying divergent migrations in the concept of stock: the contingent hypothesis. *Fisheries Research* 43, 13-34.
- Secord, P.F., Backman C.W., 1974. *Social Psychology*. McGraw-Hill, Tokyo.
- Seppa, T., Laurila, A., Peuhkuri, N., Piironen, J., Lower, N., 2001. Early familiarity has fitness consequences for arctic char (*salvelinus alpinus*) juveniles. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1380-1385.
- Seymour, E.A., 1984. Feeding biology, behaviour and growth of European eel *Anguilla anguilla* (L.) in relation to warmwater aquaculture. Ph.D. Thesis, Polytechnic of Central London, University of Westminster, London.
- Seymour, E.A., 1989. Devising optimum feeding regimes and temperatures for the warmwater culture of eel, *Anguilla anguilla* L. *Aquaculture Research* 20, 311-324.
- Shulman, G. E., 1974. Life cycles of fish. Physiology and biochemistry. Hulsted Press. John Wiley and Sons, New York, Toronto, 253 pp.
- Sih, A., Bell, A., Johnson, J.C., 2004. Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 372-378.
- Sih, A., Hanser, S.F., McHugh, K.A., 2009. Social network theory: new insights and issues for behavioral ecologists. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63, 975-988.
- Sinha, V. R. P., Jones, J. W., 1975. The European freshwater eel. Liverpool University, Liverpool, 146 pp.
- Sinha, V.R.P., Jones, W.J., 1966. On the sex and distribution of the freshwater eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Zoology* 150, 371-385.
- Sinn, D.L., Apiolaza, L.A., Moltschaniwskyj, N.A., 2006. Heritability and fitness-related consequences of squid personality traits. *Journal of Evolutionary Biology* 19, 1437-1447.
- Sloman, K.A., Motherwell, G., O'Connor, K.I., Taylor, A.C., 2000. The effect of social stress on the Standard Metabolic Rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 49-53.
- Smith, B.R., 1971. Sea lampreys in the Great Lakes of North America. In: M.W. Hardisty & I.C. Potter (ed.). *The Biology of Lampreys*, Academic Press, New York. pp. 207-247.
- Soares, M.C., Oliveira, R.F., Ros, A.F.H., Grutter, A.S., Bshary, R., 2011. Tactile stimulation lowers stress in fish. *Nature Communications* 2, 534.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, 3rd edn. WH Freeman & Co, New York.
- Sola, C., Tongiorgi, P., 1998. Behavioural responses of glass eels of *Anguilla anguilla* to non-protein amino acids. *Journal of Fish Biology* 53, 1253-1262.
- Sola, L., Gentili, G., Cataudella, S., 1980. Eel chromosomes - cytotaxonomical interrelationships and sex-chromosomes. *Copeia*, 911-913.
- Sorensen, P.W., Bianchini, M.L., 1986. Environmental Correlates of the Freshwater Migration of Elvers of the American Eel in a Rhode Island Brook. *Transactions of the*

- American Fisheries Society* 115, 258-268.
- Spittka, H., 1985. Abwuchsversuche mit Aalen bei unterschiedlichem Salzgehalt. The eel commission of the DFV lectures Hamburg no 38A, 1-15.
- St Mary, C.M., 2000. Sex allocation in lythrypnus (gobiidae): Variations on a hermaphroditic theme. *Environmental Biology of Fishes* 58, 321-333.
- St Mary, C.M., 1997. Sequential patterns of sex allocation in simultaneous hermaphrodites: Do we need models that specifically incorporate this complexity? *American Naturalist* 150, 73-97.
- Stamps, J. A., Groothuis, T. G. G., 2010. Developmental perspectives on personality: implications for ecological and evolutionary studies of individual differences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365, 4029-4041.
- Stamps, J., Groothuis, T. G. G., 2010. The development of animal personality: relevance, concepts and perspectives. *Biological Reviews* 85, 301-325.
- Stamps, J.A., 2007. Growth-mortality tradeoffs and 'personality traits' in animals. *Ecology Letters* 10, 355-363.
- Sugeha, H. Y., Arai, T., Miller, M. J., Limbong, D., Tsukamoto, K., 2001. Inshore migration of the tropical eels *Anguilla* spp. recruiting to the Poigar River estuary on north Sulawesi Island. *Marine Ecology-Progress Series* 221, 233-243.
- Sulak, K. J., 1977. The systematics and biology of *Bathypterois* (Pisces: Chlorophthalmidae) with a revised classification of benthic myctophiform fishes. *Galathea Report*, 14, 49-108.
- Sullivan, M.C., Wuenschel, M.J., Able, K.W., 2009. Inter and intra-estuary variability in ingress, condition and settlement of the american eel *anguilla rostrata*: Implications for estimating and understanding recruitment. *Journal of Fish Biology* 74, 1949-1969.
- Svedang, H., Wickstrom, H., 1997. Low fat contents in female silver eels: Indications of insufficient energetic stores for migration and gonadal development. *Journal of Fish Biology* 50, 475-486.
- Swaney, W., Kendal, J., Capon, H., Brown, C., Laland, K.N., 2001. Familiarity facilitates social learning of foraging behaviour in the guppy. *Animal Behaviour* 62, 591-598.
- Syrski, S., 1874. Über die reproductions-organe der Aale. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie Wissenschaftend Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Classe* 69, 315-326.

T

- Taborsky, B., Dieckmann, U., Heino, M., 2003. Unexpected discontinuities in life-history evolution under size-dependent mortality. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270, 713-721.
- Takahashi, H., 1979. Two new cases of hermaphroditic gonads found in artificially matured Japanese eels, *Anguilla japonica*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* 30, 252-258.
- Takahashi, H., Sugimoto, Y., 1978. Spontaneous hermaphrodite of Japanese eel, *Anguilla japonica*, and its artificial maturation. *Japanese Journal of Ichthyology* 24, 239-245.
- Takai, A., Ojima, Y., 1985. Karyotypic studies of five species of Anguilliformes (Pisces). *The Proceedings of the Japan Academy, Series B* 61, 253-256.
- Tatsukawa, K., 2003. *Eel resources in East Asia*.
- Taylor, D.S., Davis, W.P., Turner, B.J., 1995. Rivulus-marmoratus - ecology of distributional patterns in florida and the central indian-river lagoon. *Bulletin of Marine Science* 57, 202-207.
- Tesch, F. W., Rohlf, N., 2003. Migration from continental waters to the spawning grounds. In *Eel biology* Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, K., eds., pp. 223-237. Tokyo: Springer.

- Tesch, F.-W., 2003. The eel. 5th ed. Blackwell publishing, Oxford, 408p.
- Thibault, I., Dodson, J.J., Caron, F., Tzeng, W., Iizuka, Y., Shiao, J., 2007. Facultative catadromy in American eels: testing the conditional strategy hypothesis. *Marine Ecology Progress Series* 344, 219-229.
- Tosi, L., Spampinato, A., Sola, C., Tongiorgi, P., 1990. Relation of water odour, salinity and temperature to ascent of glass-eels, *Anguilla anguilla* (L.): a laboratory study. *Journal of Fish Biology* 36, 327-340.
- Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R., 2001. Developmental expression of cytochrome p450 aromatase genes (cyp19a and cyp19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology* 290, 475-483.
- Tremblay, V., 2009. Reproductive strategy of female American eels among five subpopulations in the St. Lawrence River watershed. In Eels at the Edge. Science, Status, and Conservation Concerns (Cairns, D. & Casselman, J. M., eds), *American Fisheries Symposium* 58. pp. 85-102
- Trivers, R. L., 1971. The evolution of reciprocal altruism. *The Quarterly Review of Biology* 46, 35-57.
- Trivers, R.L., Willard, D.E., 1973. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* 179, 90-92.
- Trut, L. N., 1999. Early canid domestication: The farm-fox experiment. *American Scientist* 87, 160-169.
- Trzebiatowski, R., Filipiak, J., Jakubowski, R., 1981. Effect of stock density on growth and survival of rainbow trout (*salmo gairdneri* rich.). *Aquaculture* 22, 289-295.
- Tsukamoto, K., 2006. Spawning of eels near a seamount. *Nature* 439, 929-929.
- Tsukamoto, K., Arai, T., 2001. Facultative catadromy of the eel *Anguilla japonica* between freshwater and seawater habitats. *Marine Ecology Progress Series* 220, 265-276.
- Tsukamoto, K., Chow, S., Otake, T., Kurogi, H., Mochioka, N., Miller, M. J., Aoyama, J., Kimura, S., Watanabe, S., Yoshinaga, T., Shinoda, A., Kuroki, M., Oya, M., Watanabe, T., Hata, K., Ijiri, S., Kazeto, Y., Nomura, K., Tanaka, H., 2011. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nature Communications* 2.
- Tveiten, H., Bjorn, P.A., Johnsen, H.K., Finstad, B., McKinley, R.S., 2010. Effects of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* on temporal changes in cortisol, sex steroids, growth and reproductive investment in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology* 76, 2318-2341.
- Tzchori, I., Degani, G., Hurvitz, A., Moav, B., 2004. Cloning and developmental expression of the cytochrome p450 aromatase gene (cyp19) in the European eel (*Anguilla anguilla*). *General and Comparative Endocrinology* 138, 271-280.
- Tzeng W.N., Severin, K.P., Wickstrom, H., 1997. Use of otolith microchemistry to investigate the environmental history of European eel *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology-progress series* 149.
- Tzeng, W.N., 1985. Immigration timing and activity rhythms of the eel, *Anguilla japonica*, in the estuaries of N. Taiwan, with emphasis on environmental influences. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries and Oceanography* 47-48, 11-28.
- Tzeng, W.N., Iizuka, Y., Shiao, J.C., Yamada, Y., Oka, H.P., 2003. Identification and growth rates comparison of divergent migratory contingents of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Aquaculture* 216, 77-86.
- Tzeng, W.N., Shiao, J.C., Iizuka, Y., 2002. Use of otolith Sr:Ca ratios to study the riverine migratory behaviors of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series* 245, 213-22.

Tzeng, W.N., Wang, C.H., Wickström, H., Reizenstein, M., 2000. Occurrence of the semi-catadromous European eel *Anguilla anguilla* in the Baltic Sea. *Marine Biology* 137, 93-98.

U

Uhlenhaut, N.H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N.I., Riethmacher, D., Schutz, G., Cooney, A.J., Lovell-Badge, R., Treier, M., 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by foxl2 ablation. *Cell* 139, 1130-1142.

Utne-Palm, A.C., Hart, P.J.B., 2000. The effects of familiarity on competitive interactions between threespined sticklebacks. *Oikos* 91, 225-232.

V

Valenzuela, N., Adams, D. C., Janzen, F. J., 2003. Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined? *American Naturalist* 161, 676-683.

Van Ginneken, V., Antonissen, E., Muller, U.K., Booms, R., Eding, E., Verreth, J., van den Thillart, G., 2005. Eel migration to the Sargasso: remarkably high swimming efficiency and low energy costs. *Journal of Experimental Biology* 208(7), 1329-1335.

Van Ginneken, V., Maes, G., 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its Lifecycle, Evolution and Reproduction: A Literature Review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15, 367-398.

Van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., van den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., van den Thillart, G., Murk, A., 2009. PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquatic Toxicology* 92, 213-220.

Van Ginneken, V., Vianen, G., Muusze, B., Palstra, A., Verschoor, L., Lugten, O., Onderwater, M., Van Schie, S., Niemantsverdriet, P., Van Heeswijk, R., Eding, E., Van den Thillart, G., 2005. Gonad development and spawning behaviour of artificially-matured European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Animal Biology* 55, 203-218.

Van Ginneken, V.J.T., van den Thillart, G., 2000. Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* 403(6766), 156-157.

Van Oers, K., de Jong, G., van Noordwijk, A.J., Kempenaers, B., Drent, P.J., 2005. Contribution of genetics to the study of animal personalities: A review of case studies. *Behaviour* 142, 1185-1206.

Vandenhurk, R., Vanoordt, P., 1985. Effects of natural androgens and corticosteroids on gonad differentiation in the rainbow-trout, *salmo-gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology* 57, 216-222.

Velez-Espino, L.A., Koops, M.A., 2010. A synthesis of the ecological processes influencing variation in life history and movement patterns of american eel: Towards a global assessment. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20, 163-186.

Verbiest, H., Breukelaar, A., Ovidio, M., Philippart, J. C., Belpaire, C., 2012. Escapement success and patterns of downstream migration of female silver eel *Anguilla anguilla* in the River Meuse. *Ecology of Freshwater Fish* 21, 395-403.

Verreault, G., Dargere, W., Tardif, R., 2009. American eel movements, growth, and sex ratio following translocation. In: Casselman, J.M., Cairns, D.K. (Eds.), *Eels at the edges:*

- Science, status and conservation concerns. Bethesda, Maryland. *American Fisheries Society Symposium* 58, pp. 129–136.
- Verreycken, H., Van Thuyne, G., Belpaire, C., 2011. Length–weight relationships of 40 freshwater fish species from two decades of monitoring in Flanders (Belgium). *Journal of Applied Ichthyology* 27, 1416-1421.
- Vilter, V., 1945. Métamorphose myo-somatique de larves d'anguille et relations avec la croissance stomacale. *Compte rendu des séances de la Société Biologique de Marseille*, 808-810.
- Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., Guiguen, Y., 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics* 236, 2198-2206.
- Vladykov, V. D., 1966. Remarks on the American eel (*Anguilla rostrata* Le Sueur): size of elvers entering streams; the relative abundance of adult males and females; and present economic importance of eels in North American. *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie* 16, 1007–1017.
- Vladykov, V.D., Liew., P.K.L., 1982. Sex of American eels (*Anguilla rostrata*) collected as elvers in two different streams along the eastern shore of Canada, and raised in the same freshwater pond in Ontario. pp. 88–93. *In: K.H. Loftus (ed.) Proceedings of the 1980 North American Eel Conference, Ontario Ministry of Natural Resources, Ontario Fisheries Technica Report 4, Toronto.*
- Vøllestad, L. A., Jonsson, B., 1986. Life-history characteristics of the European eel *Anguilla anguilla* in the imsa river, norway. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, 864-871.
- Vøllestad, L.A., 1992. Geographic-variation in age and length at metamorphosis of maturing european eel - environmental-effects and phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology* 61, 41-48.
- Vøllestad, L.A., Jonsson, B., 1988. A 13-year study of the population dynamics and growth of the European eel *Anguilla anguilla* in a Norwegian river, evidence for density dependent mortality, and development of a model for predicting yield. *Journal of Animal Ecology*, 57, 983–997.
- Vøllestad, L.A., Quinn, T.P., 2003. Trade-off between growth rate and aggression in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Animal Behaviour* 66, 561-568.
- Von Bertalanffy, L., 1938. A quantitative theory of organic growth (inquiries on growth laws II). *Human Biology* 10, 181–213.
- Vonholst, D., 1985. Coping behavior and stress physiology in male tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Fortschritte Der Zoologie* 31, 461-470.



- Wang, C. H., Tzeng, W. N., 1998. Interpretation of geographic variation in size of American eel *Anguilla rostrata* elvers on the Atlantic coast of North America using their life history and otolith ageing. *Marine Ecology-Progress Series* 168, 35-43.
- Ward, A.J.W., Hart, P.J.B., 2003. The effects of kin and familiarity on interactions between fish. *Fish and Fisheries* 4, 348-358.
- Ward, A.W., Thomas, P., Hart, P.B., Krause, J., 2004. Correlates of boldness in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55, 561-568.
- Ware, D.M., 1982. Power and evolutionary fitness of teleosts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 3-13.

- Warner, R.R., 1988. Sex change in fishes - hypotheses, evidence, and objections. *Environmental Biology of Fishes* 22, 81-90.
- Warner, R.R., Fitch, D.L., Standish, J.D., 1996. Social control of sex change in the shelf limpet, *crepidula norrisiarum*: Size-specific responses to local group composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 204, 155-167.
- Watts, D. J., Strogatz, S. H., 1998. Collective dynamics of “small-world” networks. *Nature* 393, 440–442.
- Wedekind, C., 2012. Managing population sex ratios in conservation practice: how and why? In: Povilitis T (ed) Topics in conservation biology. ISBN: 978-953-51-0540-4. InTech.
- Weih, D., 1978. Tidal stream transport as an efficient method for migration. *Journal du Conseil International pour l'exploitation de la Mer* 38, 92-99.
- Weiss, K. M., 1999. Genetic variation and human disease. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Werner, E. E., Gilliam, J. F., 1984. The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15, 393–425.
- West, S.G., Ryu, E., Kwok, O.M., Cham, H., 2011. Multilevel modeling: Current and future applications in personality research. *Journal of Personality* 79, 2-50.
- Westin, L., 1990. Orientation mechanisms in migrating European silver eel, *Anguilla anguilla*; Temperature and olfaction. *Marine Biology* 106, 175-179.
- WGEEL, 2011: Report of the 2011 session of the joint EIFAAC / ICES Working Group on eels. Lisbon, Portugal, 5–9 September 2011. 241 pp.
- White, E. M., Knights, B., 1997. Dynamics of upstream migration of the European eel, (*Anguilla anguilla* L.), in the Rivers Severn and Avon, England, with special reference to the effects of man-made barriers. *Fisheries Management and Ecology* 4, 311-324.
- Wiberg, U. H., 1983. Sex determination in the european eel (*Anguilla-anguilla*, L) - a hypothesis based on cytogenetic results, correlated with the findings of skewed sex-ratios in eel culture ponds. *Cytogenetics and Cell Genetics* 36, 589-598.
- Wickins, J.F., 1985. Growth variability in individually confined elvers, *Anguilla anguilla* (L). *Journal of Fish Biology* 27, 469-478.
- Wickström, H., Westin, L., Clevestam, P., 1996. The biological and economical yield from a long-term stocking experiment. *Ecology of Freshwater Fish* 5, 140–147.
- Willson, M. F., Halupka, K. C., 1995. Anadromous Fish as Keystone Species in Vertebrate Communities
- Wilson, A.D.M., Godin, J.-G.J., 2009. Boldness and behavioral syndromes in the bluegill sunfish, *lepomis macrochirus*. *Behavioral Ecology* 20, 231-237.
- Winberg, G.G., 1956. Rate of metabolism and food requirements of fishes. Translation Series No. 194. Fisheries Research Board of Canada Biological Station. Nanaimo, British Columbia.
- Wippelhauser, G.S., McCleave, J.D., 1987. Precision of behavior of migrating juvenile American eels (*Anguilla rostrata*) utilizing selective tidal stream transport. *Journal Du Conseil* 44, 80-89.
- Wirth, T., Bernatchez, L., 2001. Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature* 409, 1037-1039.
- Wohlfarth, G.W., 1977. Shoot carp. *Bamidegh* 29, 25–40.
- Wood, S. C., Johansen, K., 1973. Blood oxygen transport and acid–base balance in eels during hypoxia. *American Journal of Physiology* 225, 849–851.
- Wu, L.-Q., Dickman, J. D., 2012. Neural Correlates of a Magnetic Sense. *Science* 336, 1054-1057.

- Yamaguchi, T., Yoshinaga, N., Yazawa, T., Gen, K., Kitano, T., 2010. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the japanese flounder. *Endocrinology* 151, 3900-3908.
- Yamamoto, T., 1959. A further study of induction of functional sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*) and progenies of sex reversals. *Genetics* 44, 739-757.
- Yamamoto, T., 1962. Hormonic factors affecting gonadal sex differentiation in fish. *General and Comparative Endocrinology* Supplement 1, 341-345.

Annexe 1

Estimation des paramètres pour tous les individus : **Méthode de Francis**

Avec L1 à 0,3 ans

L2 à 1,5 ans

L3 à 2,7 ans

Formula: $L \sim \text{vbFrancis}(\text{Année}, L1, L2, L3, t1 = \text{ages}[1], t2 = \text{ages}[2], t3 = \text{ages}[3])$

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
L1	116.999	2.630	44.49	<2e-16 ***
L2	269.228	1.839	146.38	<2e-16 ***
L3	359.796	2.615	137.57	<2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 46.9 on 1317 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 3

Achieved convergence tolerance: 1.561e-06

Estimation des paramètres pour tous les individus : **Méthode de Schnute**

Formula: $L \sim \text{vbShnute}(\text{Année}, L1, L2, K, t1 = 0.3, t2 = 2.7)$

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
L1	116.99920	2.62986	44.49	<2e-16 ***
L2	359.79604	2.61539	137.57	<2e-16 ***
K	0.43274	0.03834	11.29	<2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 46.9 on 1317 degrees of freedom

Correlation of Parameter Estimates:

L1	L2
L2	-0.09
K	-0.18 -0.69

Number of iterations to convergence: 4

Achieved convergence tolerance: 1.291e-06

Comparaison des modèles de croissance en fonction du sexe Macroscopique :

Modèles	SC	LD	F	p-value	Modèles	SC	DL	F	p-value
4	2857533				3	2896993			<0,001
10	2847032	2	2,42	0,09	4	2857533	1	18,17	***
5	2864635				3	2896993			<0,001
10	2847032	2	4,06	0,017**	5	2864635	1	14,87	***
6	2853638				3	2896993			<0,001
10	2847032	2	1,52	0,22	6	2853638	1	19,99	***
7	2850497				3	2896993			<0,001
10	2847032	1	1,60	0,21	7	2850497	2	10,73	***
8	2856529				3	2896993			<0,001
10	2847032	1	4,38	0,036*	8	2856529	2	9,31	***
9	2853636				3	2896993			<0,001
10	2847032	1	3,05	0,08	9	2853636	2	9,99	***

Tableau 1bis Comparaisons des modèles de croissance sur la longueur des individus. SC : Sommes des Carrés, DL : Degré de Liberté.

		Model 6	Estimation	IC 2,5%	IC 97,5%	t value	Pr(> t)
Paramètres	L_{∞}		499,87	462,01	551,94	21,96	<0,001 ***
	K femelles		0,39	0,32	0,46	11,11	<0,001 ***
	K mâles		0,43	0,35	0,50	11,08	<0,001 ***
	t0		-0,33	-0,40	-0,27	-9,78	<0,001 ***

Tableau 2bis Estimation des paramètres L_{∞} , K et t0 pour le meilleur modèle (6) selon le critère d'Aikaike (AIC). IC, Intervalle de confiance

		Model 7	Estimate	IC 2,5%	IC 97,5%	t value	Pr(> t)
Paramètres	L_{∞} femelles		562,09	461,53	764,00	8,25	<0,001 ***
	L_{∞} mâles		492,15	454,67	543,75	21,81	<0,001 ***
	K femelles		0,32	0,21	0,45	5,25	<0,001 ***
	K mâles		0,44	0,36	0,52	10,92	<0,001 ***
	t0		-0,32	-0,39	-0,26	-9,74	<0,001 ***

Tableau 3bis Estimation des paramètres L_{∞} , K et t_0 pour le modèle (7) selon le critère d'Aikaike (AIC). IC, Intervalle de confiance

Comparaison des modèles de croissance en fonction des 4 conditions de densité initiales :

AIC (mod10,mod9,mod8,mod7,mod6,mod5,mod4,mod3)

	df	AIC
mod10	13	14288.53
mod9	10	14287.73
mod8	10	14287.01
mod7	10	14284.11
mod6	7	14282.79
mod5	7	14288.96
mod4	7	14282.38
mod3	4	14296.68

summary(mod4)

Formula: $L \sim \text{Linf}[\text{Cond}] * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$

Parameters:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
Linf1	478.70272	19.66387	24.344	<2e-16 ***
Linf2	474.93527	19.61003	24.219	<2e-16 ***
Linf3	489.89694	19.81647	24.722	<2e-16 ***
Linf4	465.18064	18.68466	24.896	<2e-16 ***
K	0.47159	0.03924	12.019	<2e-16 ***
t0	-0.29637	0.03143	-9.428	<2e-16 ***

anova(mod3,mod10)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$

Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{Cond}] * (1 - \exp(-K[\text{Cond}] * (\text{Année} - t_0[\text{Cond}])))$

	Res.Df	Res.Sum Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	1348	3100573				
2	1339	3041132	9	59441	2.908	0.002053 **

**Comparaison des modèles de croissance en fonction
du sexe déterminé à l'échelle microscopique :**

AIC (mod10,mod9,mod8,mod7,mod6,mod5,mod4,mod3)

df	AIC
mod10	10 6762.499
mod9	8 6760.024
mod8	8 6760.020
mod7	8 6759.206
mod6	6 6756.496
mod5	6 6758.758
mod4	6 6756.368
mod3	4 6757.276

Comparaison des modèles 2 à 2:

anova(mod4,mod10)

Model 1: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)

1	630	1523925				
2	626	1519446	4	4479.3	0.4614	0.7641

anova(mod5,mod10)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)

1	630	1529671				
2	626	1519446	4	10225	1.0531	0.379

anova(mod6,mod10)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0)))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)

1	630	1524232				
2	626	1519446	4	4786.2	0.493	0.7409

anova(mod7,mod10)

Model 1: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0)))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)
 1 628 1521140
 2 626 1519446 2 1693.6 0.3489 0.7056
 anova(mod8,mod10)

Model 1: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)
 1 628 1523089
 2 626 1519446 2 3642.9 0.7504 0.4726

anova(mod9,mod10)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)
 1 628 1523099
 2 626 1519446 2 3652.9 0.7525 0.4716

anova(mod3,mod4)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)
 1 632 1535750
 2 630 1523925 2 11824 2.4441 0.08763 .

anova(mod3,mod5)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)
 1 632 1535750
 2 630 1529671 2 6078.7 1.2518 0.2867

anova(mod3,mod6)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$
 Model 2: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0)))$
 Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)
 1 632 1535750
 2 630 1524232 2 11517 2.3802 0.09336 .

anova(mod3,mod7)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$

Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0)))$

Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)

1 632 1535750

2 628 1521140 4 14610 1.5079 0.1982

anova(mod3,mod8)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$

Model 2: $L \sim \text{Linf}[\text{HISTO}] * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$

Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)

1 632 1535750

2 628 1523089 4 12661 1.3051 0.2667

anova(mod3,mod9)

Model 1: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K * (\text{Année} - t_0)))$

Model 2: $L \sim \text{Linf} * (1 - \exp(-K[\text{HISTO}] * (\text{Année} - t_0[\text{HISTO}])))$

Res.Df Res.Sum Sq Df Sum Sq F value Pr(>F)

1 632 1535750

2 628 1523099 4 12651 1.304 0.2671

Annexe 2

Les courbes de croissance en fonction des sexes ont été calculées à partir du nombre de degrés-jour (au lieu du nombre de jours seul dans le Chapitre 8) afin de comparer les études entre elles. Ainsi, il est possible de connaître le sexe qu'auraient pu avoir les individus morts à partir de leurs courbes de croissances. Dans l'exemple ci-après, seul les individus pour lesquels l'erreur d'estimation de taille n'excède pas 20% ont été pris en compte (Fig. 1bis). Dix femelles et treize mâles remplissaient ces critères. Tous les mâles estimés par le modèle étaient de vrais mâles (déterminé par l'analyse histologique des gonades). En revanche, 2 femelles « prédites » étaient en réalité des mâles. À partir de ces prédictions basées sur la taille des individus à un certain nombre de degrés-jour (lors de la mort des individus), on a pu déterminer que les femelles prédites (FP) étaient plus grosses et plus grandes que les mâles prédits (MP) (respectivement de 30 mg et de 3,5 mm au début de l'expérience). Le nombre de contacts chez les FP est supérieur à celui des MP tout au long des 7 premiers mois (effet sexe significatif, glm avec loi de Poisson, Fig. 2bis). Ces derniers sont en revanche globalement plus agressifs que les FP pendant les 7 premiers mois (effet sexe significatif, glm avec loi de Poisson, Fig. 2bis). Les MP, plus petits en début d'expérience ont pu devenir agressifs afin d'accéder à la nourriture, et avoir ensuite une meilleure croissance. Chez l'anguille jaune (30-100 gr), un statut énergétique faible (associé au fait d'être privé de nourriture) peut déclencher la sécrétion de cortisol (Caruso et al. 2010) *via* la production de corticotropin-releasing hormone, qui en retour stimule la production d'hormones de croissance (Rousseau et al. 1999). Les FP, ont pu avoir un niveau de stress diminué par le fait d'avoir un comportement plus grégaire et une plus grande taille initiale que les mâles. Chez l'esturgeon (*Acipenser fulvescens*), la cohésion du groupe est associée à une diminution du stress (Allen et al. 2009). Ainsi, les individus très stressés (haut niveau de cortisol), de part leur faible niveau initial d'énergie et leurs participations actives aux événements agressifs auraient pu devenir mâles. Ceux moins stressés (peu de cortisol), car plus grégaires, auraient pu devenir femelles.

Allen, P.J., Barth, C.C., Peake, S.J., Abrahams, M.V., Anderson, W.G., 2009. Cohesive social behaviour shortens the stress response, the effects of conspecifics on the stress response in lake sturgeon *Acipenser fulvescens*. *Journal of Fish Biology* 74, 90-104.

Caruso, G., Maricchiolo, G., Micale, V., Genovese, L., Caruso, R., Denaro, M., 2010. Physiological responses to starvation in the european eel (*Anguilla anguilla*) Effects on haematological, biochemical, non-specific immune parameters and skin structures. *Fish Physiology and Biochemistry* 36, 71-83.

Rousseau, K., Le Belle, N., Marchelidon, J., Dufour, S., 1999. Evidence that corticotropin-releasing hormone acts as a growth hormone-releasing factor in a primitive teleost, the European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Neuroendocrinology* 11, 385-392.

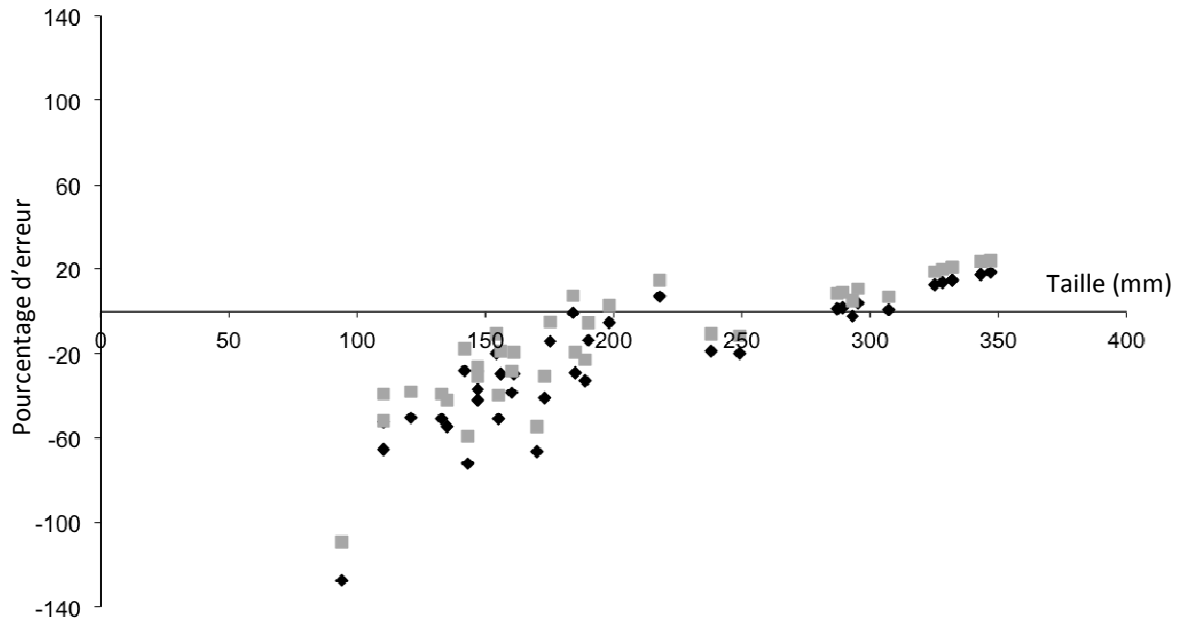


Fig. 1bis. Pourcentage d'erreur lors de l'estimation de la taille des individus de l'expérience 1 à partir des courbes de croissance de l'expérience 2. Lorsque le pourcentage d'erreur est positif, les individus sont réellement plus grands que ce qui est estimé par le modèle ; lorsqu'il est négatif, les individus sont plus petits que ce qui est estimé par le modèle. Les points gris représentent la vraie taille des femelles et les points noirs, la vraie taille des mâles à un temps donné. On remarque que la croissance des individus de l'expérience 1 est généralement plus faible que celle des mâles et femelles de l'expérience 2, à nombre de degrés-jour équivalent.

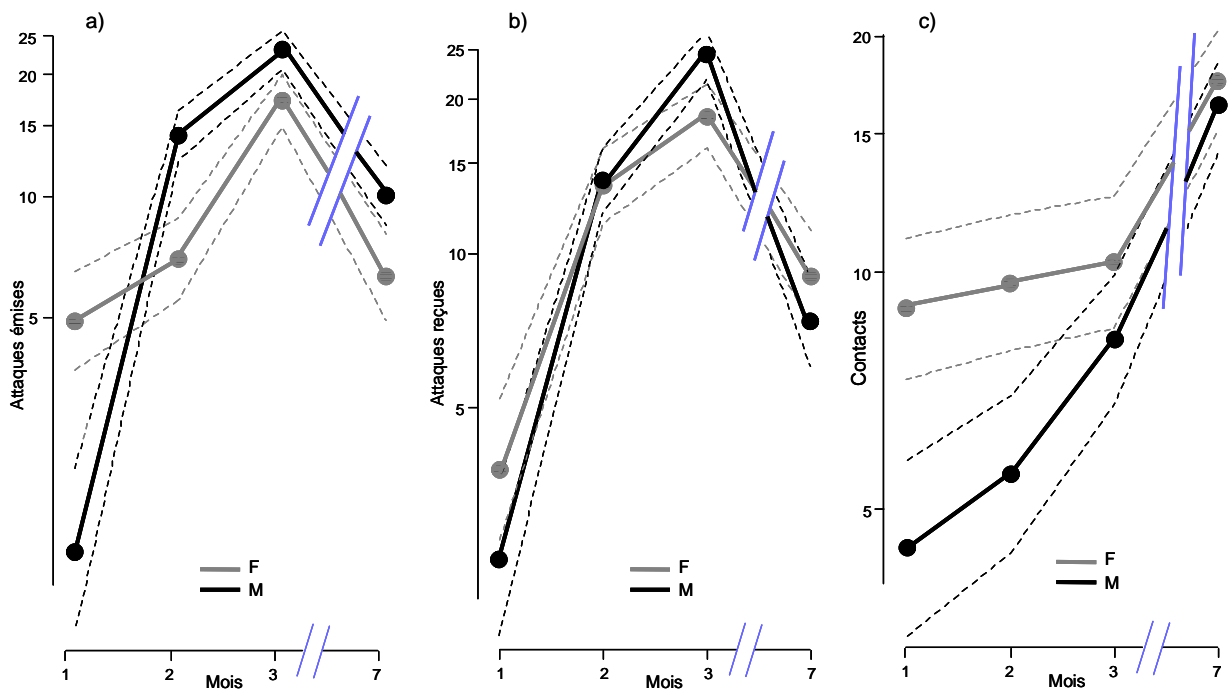


Fig. 2bis. Nombre estimé par un modèle de type GLM avec loi de Poisson a) D'attaques émises, b) D'attaques reçues et de c) Contacts en fonction du sexe. M : Mâle (n=13) et F : Femelles (n=10).

Adresse mail :
bgeffroy@st-pee.inra.fr
geffroybenjamin@hotmail.fr
Phone : 06 87 28 55 59

Curriculum Vitae

Work Experiences

- Oct 09 – Oct 12:** PhD student, laboratory of Behavioral Ecology and Biology of Fish Communities (ECOBIOP), INRA. **Subject:** Environmental Sex Determination in the European Eel *Anguilla anguilla*.
- Nov. 08 – Aug. 09:** Research Assistant in biology, physiology at the Institute of Radioprotection and Nuclear safety, Laboratory of Radioecology and Ecotoxicology (LRE) **Subject:** Rearing and breeding of model's organisms (*Danio rerio*, *Oryzias latipes*).
- Jan. 08 – June 08:** Research assistant at the Marine station of Arcachon (CNRS), GEMA Laboratory. **Subject:** impact of gold and cadmium nanoparticles on the zebra fish *Danio rerio* administrated by trophic transfer.
- April 2007:** Research assistant at the National Oceanographic Center of Southampton NOCS. **Subject:** impact of iron and light intensity on the growth's rate of two diatoms *Thalassiosira weissflogii* and *Thalassiosira pseudonana*
- February 2007:** Scientific training at the aquaculture center: L'Esturgeonnière on *Acipenser Baeri*.
- July 2006:** Training in microbiology at The Research Marine Entropic Ecosystems Centre (La Rochelle) about the aquatic food web: Copepods-Bacteria-Virus.

Education

- 2009-2012:** **PhD Student**, Behavioural Ecology, Molecular Biology, University of **Pau**.
- 2009 : Engineering Degree** Aquaculture (Equivalent to MSc in Fish Biology) University **Bordeaux 1**
- 2008 : MASTER 2** Function and Dysfunction of Aquatics Ecosystems, University **Bordeaux 1**
- 2007 : MASTER 1** Coastline Environment (Equivalent to BSc in Marine Biology) University of **La Rochelle**, 1st Semester.
University Of **Southampton**, NOCS, England, 2nd semester
- 2006 : License** Biology of organisms, populations and ecosystems University Paul Sabatier, **Toulouse**. (UPS)
- 2005 : DEUG** University Degree in General Studies Specialized in biology UPS.

Areas of Expertise

Engineering:	Designed a working plan in long and short term, contacts with suppliers, handling technical problems, treating results and time management.
Communication:	Designed presentations for World Wildlife Fund (public awareness).
Techniques:	Gene expression analyses (real time RT-PCR), ADN and ARN extraction, genotoxicity assessment and genetical diversity measurements (RAPD-PCR). Riboprobes synthesis and <i>in situ</i> hybridization. Histology. Oxygen consumption measurements at the individual and sub-cellular scale. Elaboration of gold and cadmium nanoparticles. Virus and bacterial coloration (DAPI), spectrophotometry, GFAAS and ICP-OES. Fluorometry and counter cells. Social network analysis.
Languages	French: native tongue English: fluent. Spanish: basic. German: scholar.
Computer Skills:	Software : Pack Microsoft office, R, Primer.

Funding awarded

- PhD Project 100 K€
- Fulbright scholarship 25 K€ (Not taken) The project was about the reproduction of *Synchiropus splendidus*

Communications

Peer reviewed Publications:

Geffroy B & Bardonnnet A. (2012). Differential effects of behavior, propensity to migrate and recruitment season on glass eels' growing performance. *Ecology of Freshwater Fish* 21 (3): 469-482.

Geffroy B, Fostier A, Guiguen Y, & Bardonnnet A. (2012) Unusual cases of adult intersexuality in the European eel *Anguilla anguilla*. *Sexual Development*. 6:316-319.

Geffroy B, Guiguen Y, Fostier A & Bardonnnet A (2012) Aromatase gene expression in the gonad of the European eel during sex differentiation: Implication for the gonadal development process. *Fish Physiology and Biochemistry*. *Accepted*

Geffroy B, Chiraz Ladhar, Sébastien Cambier, Mona Treguer-Delapierre, Daniel Brèthes & Jean-Paul Bourdineaud (2012). Impact of dietary gold nanoparticles on zebrafish: the role of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 6 (2): 144-160.

Geffroy B & Simon O (2012). Effects of a dietary rich omega-6 alga: *Spirulina platensis* on females' reproduction performances and larval survival rate of the zebrafish *Danio rerio*. *Cybium*. *Accepted*

Simon O, Mottin E, **Geffroy B** & Hinton T. (2011). Effect of dietary uranium on reproductive endpoints fecundity, survival, reproductive success of the Fish *Danio rerio*. *Environmental Toxicology* 30 (1): 220-225.

Submitted: **Geffroy B**, Bru N, Dossou-Gbete S & Bardonna A. Social network density influence rank-order consistency in aggressiveness. *Proceedings of the Royal Society B*

Submitted: Chiraz Ladhar, **Geffroy B**, Sébastien Cambier, Mona Treguer-Delapierre, Daniel Brèthes & Jean-Paul Bourdineaud. Impact of dietary cadmium sulfide nanoparticles on zebrafish at very low contamination pressure. *Nanotoxicology*

In preparation: **Geffroy B** & Bardonna A. Is there a link between nocturnal and diurnal activity and elvers' growth rate? A long term laboratory study

In preparation: **Geffroy B**, Bru N, Dossou-Gbete S & Bardonna A. Behavioural reaction norms and Behavioural Syndrome in eels: When consistency in activity meets inconsistency in aggressiveness

Oral Presentations:

Geffroy B, Bru N, Dossou-Gbete S & Bardonna A. Influence de la densité du réseau social sur le niveau relatif d'agressivité chez le juvénile d'anguille. Réunion MIRA 22 November 2012.

Geffroy B, Guiguen Y, Fostier A & Bardonna A. Aromatase gene expression during the gonad development of the European eel *Anguilla anguilla*. XIV European Congress of Ichthyology, Liège, Belgium. 03-08 July 2012.

Geffroy B, Bru N, Dossou-Gbete S & Bardonna A. Is there a behavioural syndrome in eels ? Toulouse, France. Réseau EFPA, thème « Personality » 06/07 June 2012.

Geffroy B & Bardonna A. Aspects temporels du comportement et de la croissance précoce chez les jeunes stades d'Anguille *Anguilla anguilla*. La Rochelle, France. GRISAM du 03-06 April 2012.

Geffroy B, Guiguen Y, Fostier A & Bardonna A. Dynamique d'expression de l'aromatase en fonction du stade de développement des gonades chez l'anguille *Anguilla anguilla*. V Rencontres Ichtyologie Française, Paris, France. 27-30 March 2012.

Geffroy B & Simon O. Effet de la spiruline sur la reproduction et le développement larvaire du poisson zèbre *Danio rerio*. V Rencontres Ichtyologie Française, Paris, France. 27-30 March 2012.

Geffroy B & Bardonna A. Déterminisme environnemental du sexe chez l'anguille *Anguilla anguilla*. Séminaire des doctorants EFPA, Lyon-Valpré, France. 10-12 January 2011.

Geffroy B, Bolliet V, Bardonna A (2010). Glass eel's growing performance in relation to metabolism and behavior. International congress of Fish biology, Barcelona, Spain. July 5-9 2010.

Posters:

Geffroy B and Bardonnet A. Environmental Sex Determination in the European Eel *Anguilla anguilla*. Les journées de l'école Doctorale, Pau, France. June 2011.

Simon O, Floc'h E, **Geffroy B** & Gilbin R. Reprotoxicité de l'Uranium chez le poisson zèbre. SEFA 2010. 31 March - April 2010. Versailles. France

Simon O, Mottin E, Bourrachot S, Aubergat L, **Geffroy B** & Gilbin R. Effects of Uranium on the reproduction and The Accumulaiton levels of in *Danio rerio*. PRIMO, Bordeaux, France, may 2009.

Technical Reports

Bardonnet A, Bolliet V & **Geffroy B**. Evaluation du potentiel de colonisation par les anguilles - Influence du statut énergétique et du déterminisme du sexe. ONEMA. 2012. 32 pp

Research interest

Behavioural ecology, evolution, fish reproduction (courtship, spawning, eggs quality), genetics and development.

Hobbies

Travelling, Sea water Aquarium, Snorkling, Scuba diving: PADI open water diver licence.

References:

- Dr Agnès Bardonnet, Lab Director
UMR Ecobiop - INRA/UPPA, Pôle D'Hydrobiologie de l'INRA
Quartier Ibarron, 64310 Saint-Pée sur Nivelle, France
Tel : + 33 559 51 59 73 Fax : + 33 559 54 51 52

E-mail : bardonne@st-pee.inra.fr
- Pr Jean-Paul Bourdineaud, Université Bordeaux 1 – CNRS, UMR 5805 Laboratoire EPOC. Station Marine - Place du Dr Peyneau – 33120 Arcachon France.
Tel : + 33 (0) 556223926 Fax : + 33 (0) 556549383

E-mail : jp.bourdineaud@epoc.u-bordeaux1.fr
- Dr Olivier Simon, IRSN/DEI/SECRE/LRE.
Centre de Cadarache, 13115 St Paul lez Durances
Tel : + 33 (0) 442199692 Fax : + 33 (0) 442199151

E-mail : olivier.simon@irsn.fr

Déterminisme environnemental du sexe chez l'Anguille Européenne *Anguilla anguilla*.

Benjamin GEFROY

Directeur de thèse : Agnès BARDONNET
Laboratoire d'accueil : UMR ECOBIOP, INRA/UPPA St Pée Sur Nivelle.

Résumé :

Contrairement à la majorité des mammifères, la plupart des poissons ne possèdent pas de chromosomes sexuels hétéromorphes (type XY/XX). Chez un grand nombre de poisson la labilité du sexe est extrêmement prononcée. Cela se traduit par le fait que le déterminisme du sexe peut être sous l'influence de variables environnementales. C'est le cas chez l'anguille où la proportion de mâle augmente avec le nombre d'individus présents en un lieu donné. Cette thèse a pour but de mieux comprendre les facteurs qui régissent la destinée sexuelle des individus. Ainsi, les relations inter-individuelles et la croissance ont été étudiées afin d'évaluer leur possible rôle dans le déterminisme du sexe. Les résultats acquis au cours de cette thèse suggèrent que la densité *per se* ne serait pas le facteur primordial influençant le déterminisme du sexe, mais plutôt l'estimation faite par les individus de la qualité du milieu.

Mots clefs: Anguille, différenciation sexuelle, croissance, densité, comportement, aromatasase.

Environmental sex determination in the European eel *Anguilla anguilla*.

Benjamin GEFROY

Supervisor : Agnès BARDONNET
Laboratory : UMR ECOBIOP, INRA/UPPA St Pée Sur Nivelle.

Résumé :

Contrarily to most mammals, the majority of fish doesn't have heteromorphic sexual chromosomes (type XY/XX). In most fish, the gonad development is extremely labile and for some of them, the sex can be influenced/determined by environmental factors. This is observed in eel, where the proportion of males increases with the number of individuals at a given location. The goal of this thesis is to better understand processes that act upon sex determination in eel. Thus, inter-individual relationships as well as the growing potential of each fish were studied to evaluate their possible role in sex determination. The findings gathered throughout this thesis support the hypothesis of a metagametic (environmental) sex determination and also suggests that the estimation of the quality of the environment, made by juveniles' eels, is one of the key factors influencing sex determination.

Key words: Eel, sex differentiation, growth, density, behaviour, aromatasase.