

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE TOURS**

**DEA de Biologie des Populations, Génétique et Ecoéthologie**

**Option Biologie des populations TOURS**

**Janvier-septembre 1998**

**VERONIQUE HERVOUET**

**Utilisation d'un marqueur microsatellite  
pour l'étude  
des contributions parentales  
chez l'huître creuse *Crassostrea gigas***

70871  
ELCO. HER. U  
584

**Stage effectué dans le laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie**

**IFREMER, La Tremblade**

**sous la direction de Pierre BOUDRY**



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 00584

## Remerciements

A André Gérard et Jean-Pierre Flassch pour m'avoir permis de passer ces huit mois dans leur laboratoire.

A toute l'équipe de l'écloserie sans laquelle cette étude n'aurait pas vu le jour.

A François Bonhomme et Nicolas Bierne, pour leur remarques et suggestions concernant cette étude.

A Pierre, pour son support tout au long de ce stage et pour ses commentaires judicieux sur ce rapport.

A Bertrand, surtout, pour avoir eu la patience de m'initier aux techniques de biologie moléculaire; merci pour ton aide.

Bonne chance à la *Marteilia* team (et à Magali) et encore merci pour l'ambiance.

A la plage et à ceux qui m'y ont accompagnée.

## SOMMAIRE

<b>I INTRODUCTION</b>	1
Travaux préalables	3
<b>II MATERIEL ET METHODES</b>	5
<b>II 1 Matériel biologique</b>	5
Choix des parents	5
<b>II 2 Méthodes</b>	6
II 2.1 Schéma de croisement	6
II 2.2 Elevage larvaire	6
II 2.3 Echantillonnage	6
II 2.4 Géotypage	7
II 2.4.1 Extraction	7
II 2.4.2 Amplification	8
II 2.4.3 Migration sur gel	9
II 2.5 Analyses statistiques	9
<b>III RESULTATS</b>	10
<b>III 1 Contributions parentales</b>	10
<b>III 2 Compétition gamétique</b>	13
<b>III 3 Evolution dans le temps de la structure génétique de la population</b>	15
<b>III 4 Comparaison entre compétition spermatique et survie des descendants des mâles</b>	16
<b>III 5 Performances de croissance</b>	17
<b>IV DISCUSSION</b>	20
<b>IV 1 Contributions parentales</b>	20
<b>IV 2 Compétition spermatique</b>	21
<b>IV Evolution durant la phase larvaire</b>	21
<b>IV 4 Evolution après métamorphose</b>	21
<b>IV 5 Croissance</b>	22
<b>V CONCLUSION</b>	23

## I INTRODUCTION

L'une des mesures de la valeur adaptative d'un être vivant consiste à évaluer le nombre de ses descendants viables, c'est-à-dire sa contribution à la génération suivante. Ce qui comprend l'identification des parents d'un groupe de descendants, et éventuellement la quantification des contributions parentales au sein de ce groupe. De telles recherches de parenté ont été récemment menées chez des végétaux (Burczyk *et al.*, 1996), de nombreux mammifères (Fredholm et Winterø, 1996; Heyen *et al.*, 1997), des oiseaux (Burke, 1989), des poissons (Morán *et al.*, 1996 ; Jones et Avise, 1997 ; Garcia de Leon, 1998 ; Batargias *et al.*, 1997). Les marqueurs génétiques, qui s'avèrent être des outils puissants pour mesurer cette contribution, notamment chez les espèces au polymorphisme biochimique faible, ont permis de développer ces approches. Ils aident aussi à comprendre les changements survenant au cours du temps dans la composition génétique d'une population donnée. Ces marqueurs sont également couramment utilisés en recherche de paternité, en criminalité chez l'humain (Callen *et al.*, 1993 ; Alford *et al.*, 1994).

L'utilisation de marqueurs génétiques très polymorphes, comme les microsatellites, est particulièrement intéressante lors de l'étude d'espèces à très grande fécondité, telles que de nombreuses espèces d'aquaculture (Hospital *et al.*, 1992). Chez celles-ci, il est courant dans les élevages de produire un grand nombre d'individus à partir d'un nombre restreint de géniteurs. La variabilité génétique qui est présente au sein de ces élevages dépend alors du nombre de géniteurs utilisés et du taux de polymorphisme propre à l'espèce, mais peut aussi être réduite du fait de contributions déséquilibrées entre les parents, conduisant à une petite taille effective des populations. La conséquence de ces pratiques est qu'une dépression de consanguinité peut apparaître (Kincaid, 1976; Bierne *et al.*, 1998), si les descendants obtenus sont à leur tour utilisés comme parents pour engendrer de nouvelles générations. De plus, une réduction de la variabilité génétique diminue les possibilités d'amélioration du cheptel par croisements sélectifs.

Parallèlement à ces pratiques, pour permettre une gestion génétique des stocks, des familles sont souvent élevées dans des structures séparées, d'où un environnement plus ou moins hétérogène entre les familles, ce qui peut biaiser les analyses génétiques. L'emploi de marqueurs génomiques est alors une solution, moins coûteuse que la mise en place de lots, pour identifier le pedigree des populations élevées en masse (Harris *et al.*, 1991; Herbinger *et al.*, 1995; Garcia de Leon *et al.*, 1998 ; Magoulas, 1998) ou provenant du milieu naturel (Ferguson *et al.*, 1995; Kellog *et al.*, 1995; Colbourne *et al.*, 1996; Herbinger *et al.*, 1996).



Plus généralement, en élevage comme en milieu naturel la taille effective ( $N_e$ ) d'une population est presque toujours plus petite que le nombre d'individus observés, pour de multiples raisons dont: générations chevauchantes, accouplements préférentiels, sex-ratio déséquilibrée, sélection exercée tant sur les géniteurs que sur leurs descendants (Avisé, 1994; Hedgecock, 1994). L'étude des contributions parentales d'une génération à une autre permet d'éclairer ces phénomènes.

Chez les mollusques cependant, aucune étude de ce type n'a été publiée jusqu'à présent. Pourtant, chez de nombreux bivalves marins, dont les huîtres, un déficit en hétérozygotes a été mis en évidence par l'utilisation de marqueurs enzymatiques aussi bien que génomiques (Zouros et Foltz, 1984). Ce phénomène peut s'expliquer si les tailles effectives populations sont plus petites que celles observées, c'est-à-dire si seuls certains géniteurs potentiels contribuent à la formation de la génération suivante. La panmixie n'est plus conservée et l'équilibre d'Hardy-Weinberg est inapplicable pour calculer le taux d'hétérozygotie attendu. Le déficit en hétérozygotes s'accompagne souvent d'une corrélation positive entre le degré d'hétérozygotie d'un individu et sa valeur sélective, en milieu naturel comme en élevage (Fujio, 1982; Zouros et Pogson, 1994; Hedgecock *et al.*, 1995; Launey, 1998). Le fardeau génétique présent chez ces animaux (Beattie *et al.*, 1987; Bierne *et al.*, 1998), et d'autant plus lourd que la taille effective de la population est petite, est probablement à l'origine de cette corrélation hétérozygotie-valeur sélective, un homozygote présentant plus de chance de porter deux allèles délétères récessifs à un même locus (Zouros, 1993).

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

Dans notre étude, nous avons donc utilisé des géniteurs d'huître creuse du pacifique *Crassostrea gigas*, dont la composition génétique était déterminée sur un marqueur microsatellite, pour produire des individus que nous avons suivi du stade larvaire au stade de naissain, en effectuant trois prélèvements dans le temps et en "génotypant" chaque fois sur ce même marqueur les individus prélevés. Cela nous a permis de quantifier les différentes contributions parentales et de suivre l'évolution de la composition génétique des descendants survivants.

De plus, deux types de croisements différents ont été effectués, l'un en situation de

compétition gamétique, l'autre non. Ceci afin de mieux connaître le rôle d'une éventuelle sélection ou l'existence de croisements préférentiels dès le stade de rencontre des gamètes dans l'eau de mer (la fécondation est externe chez *Crassostrea gigas*).

### **Travaux préalables**

Cette étude fait suite à deux autres expériences menées au laboratoire IFREMER de Génétique, Aquaculture et Pathologie de la Tremblade, sur *Crassostrea gigas*. Ces expériences font partie du programme européen de recherche GENEPHYS et concernent l'analyse de parenté par utilisation de marqueurs microsatellites.

Lors de la première expérience, 20 mâles et 20 femelles, originaires des côtes atlantiques françaises, furent croisés séparément, soit 400 fécondations séparées. Les larves furent ensuite mises à élever ensemble et l'échantillonnage eut lieu 45 jours après fécondation. Les 40 parents et 197 descendants furent analysés sur un locus (Cg44), décrit par Magoulas *et al.* (in press), tout comme les locus Cg49 et Cg 108 (voir deuxième expérience). 28 allèles furent observés parmi les 40 parents; le père fut déterminé pour 54 descendants, la mère pour 62; 19 juvéniles furent attribués sans ambiguïté à une famille biparentale. Les contributions parentales restèrent toutefois en grande partie indéterminées: en utilisant un seul marqueur microsatellite, seul un quart des descendants furent assignés à une famille. Une analyse sur d'autres locus permettrait de classer tous les descendants dans l'une des familles biparentales.

Dans la deuxième expérience, 3 lots de 5 mâles et 5 femelles furent utilisés pour réaliser 3 fois 25 croisements séparés; puis, pour chacun des 3 lots, les larves issues des différents croisements furent mises à élever ensemble. Pour chacun de ces lots, 50 individus de 10 mois furent prélevés et analysés sur 3 locus microsatellites (Cg108, Cg49 et Di10Cg), Cela s'avéra suffisant pour identifier sans ambiguïté les parents de chacun des descendants analysés. Les marqueurs microsatellites sont en effet suffisamment polymorphes chez cette espèce pour permettre cette identification: plus de 50 allèles différents existent sur chacun des 4 marqueurs mis au point (Huvet, 1997). Dans les cas où une distinction formelle entre plusieurs géniteurs n'est pas possible, une approche probabilistique peut être développée (Alford *et al.*, 1994; Fredholm et Winterø, 1996 ; Heyen *et al.*, 1997 ). Pour les trois lots (A, B et C), les résultats de cette identification de parenté sont résumés dans la table 1.



**Table 1:** Nombre de descendants par famille dans les trois lots "5 × 5" et test  $\chi^2$  d'hétérogénéité.

<b>LOT A</b>		Mâles					Total	test d'hétérogénéité entre	
Femelles	A1	A2	A3	A4	A5		mâles	femelles	
A6	1	2	3	2	3	11			
A7	1	2	3	6	8	20			
A8	0	0	0	0	0	0	NS	***	
A9	4	3	4	1	5	17			
A10	0	0	0	0	1	1			
Total	6	7	10	9	17	49			

<b>LOT B</b>		Mâles					Total	test d'hétérogénéité entre	
Femelles	B1	B2	B3	B4	B5		mâles	femelles	
B6	1	6	0	0	0	7			
B7	0	1	2	0	0	3			
B8	0	1	0	0	0	1	***	***	
B9	1	6	1	1	1	10			
B10	5	17	0	4	1	27			
Total	7	31	3	5	2	48			

<b>LOT C</b>		Mâles					Total	test d'hétérogénéité entre	
Femelles	C1	C2	C3	C4	C5		mâles	femelles	
C6	0	0	2	0	1	3			
C7	0	2	12	0	2	16			
C8	0	0	3	0	0	3	***	**	
C9	1	0	11	0	2	14			
C10	2	1	7	0	1	11			
Total	3	3	35	0	6	47			

\*\*\*:  $\alpha < 0.001$ ; \*\*:  $\alpha < 0.01$ ; NS: non significatif au risque  $\alpha=5\%$

Au total, les parents furent identifiés pour 146 des 150 individus analysés. Dans l'un des lots, un allèle nul (allèle non amplifié, donc non visible sur le gel d'électrophorèse) a été détecté en proportion élevée au locus Di10cg pour les descendants d'une seule et même femelle; il est fréquent que de tels allèles soient découverts lors des études de filiation (Pemberton *et al.*, 1995 ; Chakraborty *et al.*, 1992) la preuve de la filiation à cette femelle fut apportée par l'analyse des deux autres locus.

Pour chaque lot, le nombre de descendants observés est significativement différent entre les parents, mais pas entre les 25 familles. Ceci peut être dû au nombre limité d'individus analysés pour chacun des lots.

Dans ces deux expériences, les parents ont été choisis au hasard. L'analyse de parenté dépend donc du taux de polymorphisme sur les locus étudiés: quand un allèle est porté par un seul parent, il permet la reconnaissance directe des descendants de celui-ci. Plus un allèle est rare, plus il est informatif. dans la première expérience, un locus a permis de reconnaître la parenté du quart des descendants génotypés. Dans la seconde expérience, 3 locus sont nécessaires pour assigner leurs parents à tous les descendants génotypés.

## **II MATERIEL ET METHODES**

### **II 1 Matériel biologique**

L'huître creuse du pacifique *Crassostrea gigas* (Crassostreidea) a été introduite en Europe de l'ouest, Amérique, Nouvelle-Zélande, Afrique de l'ouest, à partir d'un foyer asiatique naturel: Japon, Corée, Chine, Taïwan, d'où provient également *Crassostrea angulata* (Huvet, en préparation). Elle vit en zone infralittorale jusqu'à 15 m de profondeur, fixée sur fonds meubles et durs. On la trouve sur les côtes atlantiques françaises depuis le début des années 1970s, après que des épidémies successives aient décimé les populations d'huître plates (*Ostrea edulis*).

#### **Choix des parents**

100 huîtres provenant d'un stock issu du milieu naturel (côte atlantique française) ont été marquées individuellement (marque collée sur la coquille), puis biopsées: prélèvement d'un fragment de branchie. Elles ont ensuite été maturées pendant une période de six semaines.

A partir des fragments prélevés, une extraction d'ADN, puis l'utilisation du marqueur microsatellite dinucléotidique Di10Cg (dont la séquence est fournie par l'équipe du Dr. F. Bonhomme, laboratoire CNRS Génome et Populations, Université de Montpellier II) a permis de génotyper chacun de ces 100 individus à ce locus. Les parents ont ainsi été choisis de manière à pouvoir effectuer les reconnaissances de parenté sur la descendance à partir de ce seul locus: chacun des parents est hétérozygote pour ce locus, et diffère des autres par ses



deux allèles (chaque allèle correspondant à un nombre donné de répétitions en tandem du motif CG). Ainsi, l'identification d'un allèle chez l'un des descendants permet à coup sûr de désigner le parent correspondant, sans risque d'allèle nul qui pourrait perturber l'interprétation des résultats (Koorey et al., 1993 ; Callen *et al.*, 1993). Des résultats acquis en 1997 dans le cadre du programme GENEPHYS (cf. "travaux préalables") montrent qu'une telle reconnaissance est possible.

## II 2 Méthodes

### II 2.1 Schéma de croisement

Une fois les huîtres matures, elles ont été ouvertes puis sexées. En fonction de leur sexe et de leur génotype, 5 mâles et 5 femelles ont été choisis. Par observation des gamètes au microscope, il a été vérifié qu'aucun d'entre eux n'était hermaphrodite, donc qu'aucune autofécondation ne pouvait se produire, comme cela arrive parfois chez les huîtres (pendant une courte période entre deux changements de sexe). Chaque parent a été "strippé" (prélèvement du contenu des gonades) indépendamment; puis ses gamètes ont été dilués à l'eau de mer filtrée sur 1 µm et comptés par analyseur d'image (Alcatel), sur cellules de Thoma pour le sperme et cellules de Malassez pour les ovocytes. Deux types de croisements ont alors été réalisés conjointement:

- des croisements séparés: fécondations séparées de chaque couple mâle-femelle dans un becher, soit 25 bechers au total, pendant une heure; puis l'ensemble est mélangé après trois heures.
- un croisement mélangé: fécondation des 5 femelles par les 5 mâles dans un seul becher.

Dans tous les cas, le nombre de gamètes est égal pour les 5 mâles ainsi que pour les 5 femelles, et le ratio sperme-ovocyte est de 150/1.

### II 2.2 Elevage larvaire

Chacune des deux populations issues des deux types de croisements est subdivisée en trois lots (lots 1, 2 et 3 pour le croisement mélangé, lots 4, 5 et 6 pour les croisements séparés), de manière à pouvoir distinguer les variations dues à l'environnement des variations génétiques au cours de l'expérience. Puis les six lots ainsi obtenus sont élevés séparément dans 6 bacs distincts en GPR (Glass Reinforced Polyester), alimentés par eau de mer filtrée sur 1 µm, sous des conditions standards identiques: température 21.5°C et salinité 28-30%. Les larves sont nourries avec du phytoplancton *Isochrysis galbana* et *Extubocellulus*

*criberiger*, à une concentration de 60 cellules/ $\mu$ l. Cette concentration est en excès pour éviter la compétition alimentaire chez les larves et permettre à la variabilité phénotypique de s'exprimer au maximum.

La mise en fixation a été réalisée sur brisure de coquille, dès que les premières larves pédivéligères sont apparues, c'est-à-dire 20 jours après fécondation dans ces conditions d'élevage standards (Walne, 1974).

### **II 2.3 Echantillonnage**

Des larves ont été prélevées dans chaque lot à chaque tamisage, c'est-à-dire trois fois par semaine, dès J1, soit 24h après la fécondation. A chaque fois, ces larves sont comptées et mesurées au projecteur de profil (Nikon). L'utilisation de tamis à mailles fines permet de limiter au maximum l'élimination des larves les plus petites, ou "queues de lot". Des individus ont également été échantillonnés une semaine après fixation, puis à l'âge de trois mois (stade J90) (voir cycle de développement en Annexe 1). Parmi ces derniers ainsi que pour les larves de 6 jours (stade J6) et de 18 jours (J18), des individus ont été prélevés individuellement, mesurés puis conservés dans de l'éthanol absolu avant d'être génotypés sur le même locus que leurs parents, soit Di10Cg.

### **II 2.4 Génotypage**

Pour les parents comme pour les descendants, le génotypage passe par l'obtention d'ADN par extraction à partir des tissus (ou des larves entières), puis par l'hybridation de fragments microsatellites sur le génome et la révélation des produits de cette hybridation amplifiés par PCR après migration sur un gel d'acrylamide.

#### *II 2.4.1 Extraction*

L'extraction d'ADN à partir des tissus branchiaux des parents a été effectuée d'après le protocole Phénol-Chloroforme (Moore, 1993). Chaque fragment de branchie est placé dans 400 $\mu$ l de tampon d'extraction (9.3g EDTA, 1.5g Tris, 2.5g SDS, qsp H<sub>2</sub>O 250ml) et 5 $\mu$ l de Protéinase K, le tout au bain-marie à 55°C pendant une nuit; puis ajout de 500 $\mu$ l de Phénol (pH 8) et 400 $\mu$ l de Chloroforme, centrifugation à 10000trs/min à 4°C pendant 10min, récupération du surnageant; ajout de 400 $\mu$ l d'Ethanol 100%, le tout au moins une heure à -20°C; centrifugation à 10000trs/min à 4°C pendant 10min, élimination du surnageant, lavage par de l'Ethanol 70% (ajout de 400 $\mu$ l) et centrifugation à 10000trs/min à 4°C pendant 10min; élimination du surnageant et séchage du culot au speed-vac pendant 5min; enfin, redissolution



dans 200µl d'eau distillée. L'ADN natif ainsi obtenu est conservé à -20°C, une partie diluée à 5%, conservée à 4°C, est immédiatement utilisable.

L'ADN des larves et du naissain a été extrait au Chélex (Estoup *et al.*, 1996) à partir des larves entières ou d'un petit morceau de tissu pour les juvéniles. Chaque échantillon est placé dans 400µl de Chélex 5%, plus 30µl de TE 1X (pH 7.5; TE 100X: 121.1g Tris, 37.2g EDTA, qsp H<sub>2</sub>O mQ) et 5 µl de Protéinase K; le tout au bain-marie 4h (ou plus) à 56°C, puis 15 min à 100°C; puis Vortex pendant 30s, et centrifugation à 8000trs/min à 4°C pendant 5 min; prélèvement du surnageant. L'ADN natif ainsi obtenu est conservé à -20°C, ou directement utilisable.

#### *II 2.4.2 Amplification*

L'amplification des séquences cibles d'ADN a été effectuée par PCR (Polymerase Chain Reaction), avec l'une des deux amorces marquée au P<sup>33</sup> radioactif. Pour les parents, le mélange réactif est constitué de 261µl d'H<sub>2</sub>O, 100µl de tampon Taq polymérase, 40µl de MgCl<sub>2</sub>, 37µl de dNTP, 40µl d'amorce non-marquée (sens), 15µl d'amorce marquée (antisens), et 7µl de Taq polymérase. Le marquage de l'amorce est réalisé avec 2.25µl d'H<sub>2</sub>O, 3µl d'amorce (antisens), 1.5µl de tampon kinase 10X, 7.5µl d'ATP marqué au P<sup>33</sup>, et 0.75µl de T4kinase; le tout est mis au bain-marie à 37°C pendant 30 min avant d'être ajouté aux réactifs de PCR. Le mélange ainsi obtenu permet l'amplification par PCR de 100 échantillons d'ADN extrait, à raison de 5µl d'ADN par échantillon, auquel on ajoute 5µl de mix.

Pour les larves et le naissain, le mélange réactif nécessaire à 100 réactions d'amplification est composé des mêmes réactifs dans les mêmes proportions, excepté les 261µl d'H<sub>2</sub>O qui ne participent pas au mélange, ceci pour concentrer d'avantage l'ADN, qui est obtenu en plus petite quantité chez les larves que chez les adultes. Le marquage de l'amorce radioactive est réalisé avec 2.36µl d'H<sub>2</sub>O, 3.15µl d'amorce, 1.58µl de tampon kinase 10X, 7.88µl d'ATP marqué au P<sup>33</sup>, et 0.79µl de T4kinase; la phase de bain-marie à 37°C dure également 30 min. Pour chaque échantillon, on ajoute 2.39µl de mix à 7.61µl d'ADN.

Après une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, 30 cycles de PCR sont réalisés, qui comprennent chacun: une phase de dénaturation de 1 min à 94°C, puis l'hybridation des amorces, ou annealing, à 55°C pendant 1 min, enfin l'élongation à 72°C pendant 1 min 45 s; après ces 30 cycles, suit une élongation finale à 72°C pendant 5 min.



### *II 2.4.3 Migration sur gel*

Après ajout de 8µl de tampon de migration (25ml de formamide, 0.025g de xylène cyanol, 0.025g de bleu de bromophénol et 1ml d'EDTA 0.5M) par échantillon et une dénaturation de 5 min à 94°C, des aliquots sont déposés sur un gel d'acrylamide 8% dénaturant. La migration dure 2h30 à 50W (le voltage et l'intensité sont programmés en conditions non restrictives, respectivement 1900v et 150mA), puis les gels sont séchés et exposés à un film pendant 6 à 48h. La résolution permet de discriminer des fragments ayant un nucléotide de différence.

### **II 2.5 Analyses statistiques**

Le test G (logiciel EXCEL) est utilisé pour calculer les différences de contributions parentales: pour un même type de croisement, à un même stade de développement, entre les 5 mâles, entre les 5 femelles, ou entre les 25 familles; entre deux types de croisements, entre deux stades de développement, ou entre deux lots d'un même type de croisement.

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

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

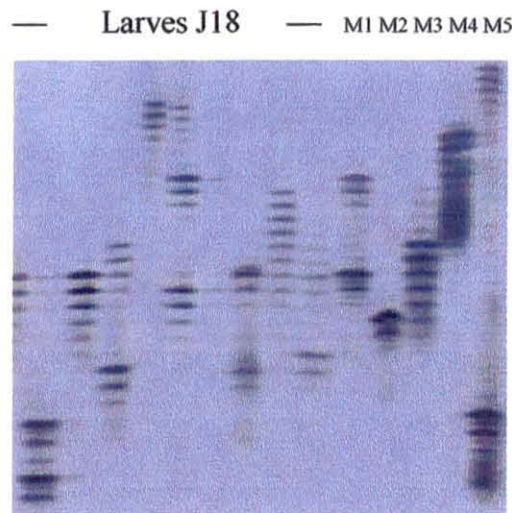
soit 10 valeurs  $G_i$  à 4 ddl chacune. On obtient alors un G résiduel:  $G_r = \sum G_i - G_f - G_g - G_f$ , à  $16 = 4 * 10 - 24$  ddl ou  $G_r$  mesure l'hétérogénéité entre les 25 familles (24 ddl).  $G_r$  est représentatif des interactions mâles-femelles.

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

### III RESULTATS

Ont été analysés: à J6, 272 individus pour les croisements séparés et 249 pour le croisement mélangé; à J18, 399 individus pour les croisements séparés; à J90 (c'est-à-dire à 3 mois), 244 individus pour les croisements séparés. L'analyse de parenté fut simple dans la mesure où les 10 parents choisis portaient tous des allèles différents au locus Di10Cg, et étaient hétérozygotes pour ce locus (Figure 1). Dans la descendance, les 20 allèles ont ségrégué; aucun allèle nouveau, qui n'aurait pas été présent chez les parents, n'est apparu: aucune mutation ne s'est produite dans les échantillons étudiés.

**Figure 1:** Extrait d'un gel d'électrophorèse après amplification au locus Di10Cg: pour les mâles M2 et M4, ainsi que pour trois larves, seule une bande, correspondant à un allèle, est visible; l'autre est hors champ. On observe la correspondance entre l'une des bandes de chaque larve et celle de l'un des mâles, représentant l'allèle qui a été transmis. Deux bandes successives ont une différence de deux nucléotides, c'est-à-dire d'une répétition du motif CG.



#### III 1 Contributions parentales

Pour chaque point d'échantillonnage, aucune différence significative de contributions parentales n'existe entre les 3 lots, ce qui nous autorise à les regrouper (Tableau 2).

**Tableau 2:** Hétérogénéité entre les contributions parentales des différents lots, à chaque échantillonnage.

point d'échantillonnage	Comparaison entre les lots	Hétérogénéité entre	
		mâles	femelles
J6 croisement mélangé	1-2	G=2.27	G=0.85
		$\alpha=0.686$ NS	$\alpha=0.931$ NS
	1-3	G=4.03	G=1.11
		$\alpha=0.402$ NS	$\alpha=0.893$ NS
	2-3	G=5.53	G=4.54
		$\alpha=0.237$ NS	$\alpha=0.337$ NS
J6 croisements séparés	4-5	G=2.03	G=1.34
		$\alpha=0.730$ NS	$\alpha=0.854$ NS
	4-6	G=7.86	G=3.99
		$\alpha=0.097$ NS	$\alpha=0.407$ NS
	5-6	G=7.49	G=9.41
		$\alpha=0.112$ NS	$\alpha=0.052$ NS
J18 croisements séparés	4-5	G=1.47	G=1.10
		$\alpha=0.832$ NS	$\alpha=0.895$ NS
	4-6	G=3.04	G=1.02
		$\alpha=0.551$ NS	$\alpha=0.907$ NS
	5-6	G=2.09	G=0.76
		$\alpha=0.720$ NS	$\alpha=0.943$ NS
J90 croisements séparés	4-5	G=3.08	G=4.08
		$\alpha=0.544$ NS	$\alpha=0.396$ NS
	4-6	G=3.47	G=3.86
		$\alpha=0.482$ NS	$\alpha=0.425$ NS
	5-6	G=0.95	G=0.99
		$\alpha=0.917$ NS	$\alpha=0.912$ NS

NS: non significatif au risque  $\alpha=5\%$

Des contributions parentales déséquilibrées sont relevées, par comparaison entre chacun des tableaux de contingence des différents points d'échantillonnage, et le tableau de valeurs théoriques où chacun des 5 mâles et chacune des 5 femelles seraient également représentés (Table 3).



**Table 3:** Contributions (nombre d'individus par famille et fréquences marginales) des mâles et des femelles lors des croisements mélangé à J6 et séparés à J6, J18 et J90.

Croisements séparés J6		Femelles					Contribution (%)	Test G d'hétérogénéité entre	
Mâles	1	2	3	4	5	mâles		femelles	
1	18	10	8	9	25	0.26			
2	9	13	11	8	19	0.22			
3	8	8	3	10	14	0.16	NS	NS	
4	11	17	4	5	21	0.21	(G=2.81)	(G=7.57)	
5	10	13	7	6	5	0.15	( $\alpha=0.589$ )	( $\alpha=0.109$ )	
Contribution (%)	0.21	0.22	0.12	0.14	0.31	1			

Croisement mélangé J6		Femelles					Contribution (%)	Test G d'hétérogénéité entre	
Mâles	1	2	3	4	5	mâles		femelles	
1	4	1	3	0	26	0.14			
2	7	8	5	5	21	0.18			
3	4	14	2	9	11	0.16	*	**	
4	19	21	20	4	31	0.38	(G=10.24)	(G=13.95)	
5	5	9	6	6	8	0.14	( $\alpha=0.037$ )	( $\alpha=0.007$ )	
Contribution (%)	0.16	0.21	0.14	0.1	0.39	1			

Croisements séparés J18		Femelles					Contribution (%)	Test G d'hétérogénéité entre	
Mâles	1	2	3	4	5	mâles		femelles	
1	25	20	17	19	56	0.34			
2	4	12	4	5	16	0.10			
3	8	11	10	8	17	0.14	**	NS	
4	20	22	17	6	22	0.22	(G=16.81)	(G=8.807)	
5	19	17	12	17	15	0.20	( $\alpha=0.002$ )	( $\alpha=0.066$ )	
Contribution (%)	0.19	0.20	0.15	0.14	0.32	1			

Croisements séparés J90	Femelles					Contri- bution (%)	Test G d'hétérogénéité entre		
	Mâles	1	2	3	4		5	mâles	femelles
1		8	2	17	17	5	0.20		
2		2	3	5	12	4	0.11		
3		11	4	16	20	21	0.29	NS	**
4		1	7	11	14	4	0.15	(G=7.401)	(G=14.709)
5		10	5	15	24	6	0.25	( $\alpha=0.116$ )	( $\alpha=0.005$ )
Contribution (%)		0.13	0.09	0.26	0.36	0.16	1		

\*:  $\alpha < 0.05$ ; \*\*:  $\alpha < 0.01$ ; NS: non significatif au risque  $\alpha=5\%$

Seul le croisement mélangé à J6 présente une différence significative de contribution entre les 25 familles ( $\alpha=0.006$ ). Aucune hétérogénéité due aux interactions entre mâles et femelles n'est décelée ( $G_r$  non significatif), à aucun point d'échantillonnage (Tableau 4). Cependant, à J18, la famille 21, correspondant au croisement mâle 1 par femelle 5, est nettement plus représentée que les autres. En fait, les disparités visualisées sur les graphes (Annexe 2) sont essentiellement dues aux différences de contributions des mâles d'une part, des femelles d'autre part, et à leurs effets cumulés.

**Tableau 4:** Hétérogénéité entre familles et hétérogénéité due aux interactions entre mâles et femelles pour chaque point d'échantillonnage.

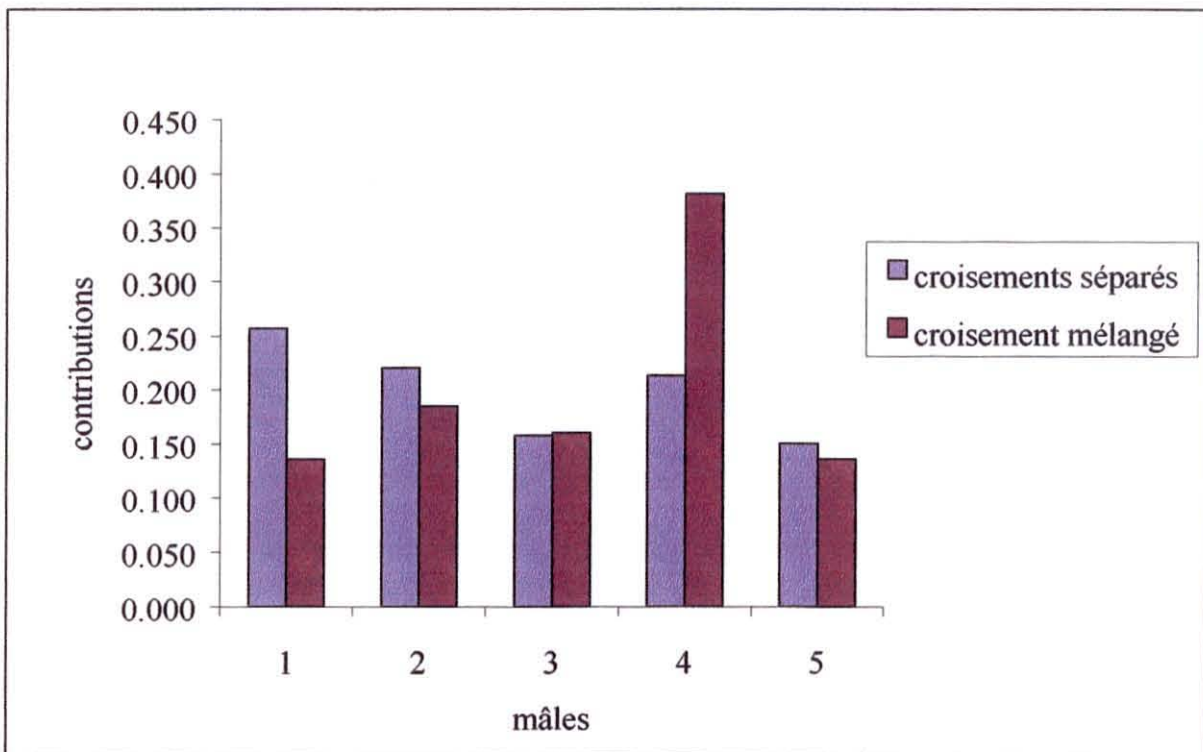
Point d'échantillonnage	Hétérogénéité entre familles	$G_r$
J6 croisement mélangé	** (Gf=44.86) ( $\alpha=0.006$ )	$G_r=16.10$ $\alpha=0.446$ NS
J6 croisements séparés	NS (Gf=16.44) ( $\alpha=0.872$ )	$G_r=16.10$ $\alpha=0.446$ NS
J18 croisements séparés	NS (Gf=32.52) ( $\alpha=0.115$ )	$G_r=8.43$ $\alpha=0.935$ NS
J90 croisements séparés	NS (Gf=31.85) ( $\alpha=0.131$ )	$G_r=6.80$ $\alpha=0.977$ NS

\*\* :  $\alpha < 0.01$ ; NS: non significatif au risque  $\alpha=5\%$

### III 2 Compétition gamétique

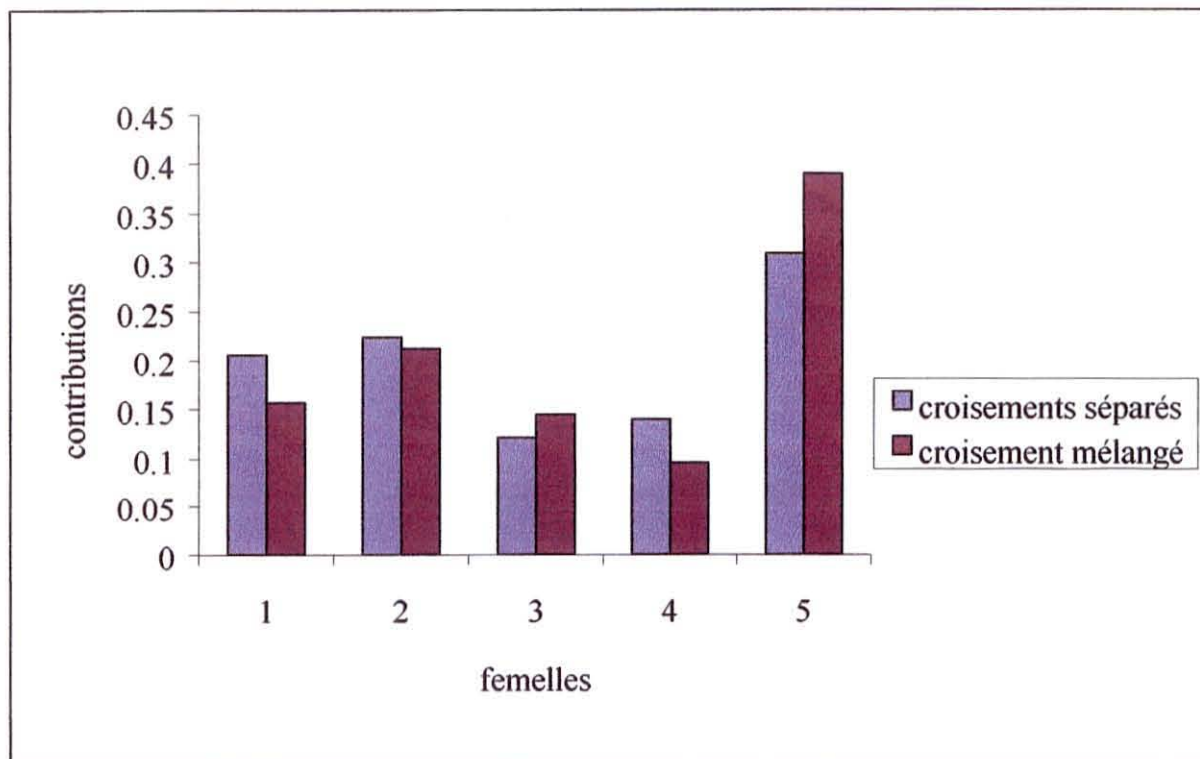
La compétition gamétique intervenant pendant la fécondation in vivo est mise en évidence par la comparaison des deux types de croisements. Cette comparaison est effectuée à J6, pour que les effets de l'élevage larvaire ne masquent pas ceux de la compétition gamétique. Les contributions des mâles sont significativement différentes entre les deux croisements ( $G=11.26$ ;  $\alpha=0.024$ ), mais pas les contributions des femelles ( $G=3.23$ ;  $\alpha=0.520$ ) (Figures 2 et 3). On a donc regroupé les deux tableaux pour obtenir les contributions globales des femelles à J6. L'hétérogénéité entre femelles est alors hautement significative (Tableau 5).

**Figure 2:** Contributions (en fréquences) des mâles à J6 dans les deux types de croisements.





**Figure 3:** Contributions (en fréquences) des femelles à J6 pour les deux types de croisements.



**Tableau 5:** Contributions globales (nombre d'individus par familles et fréquences marginales) des femelles à J6 (croisements mélangé + croisements séparés).

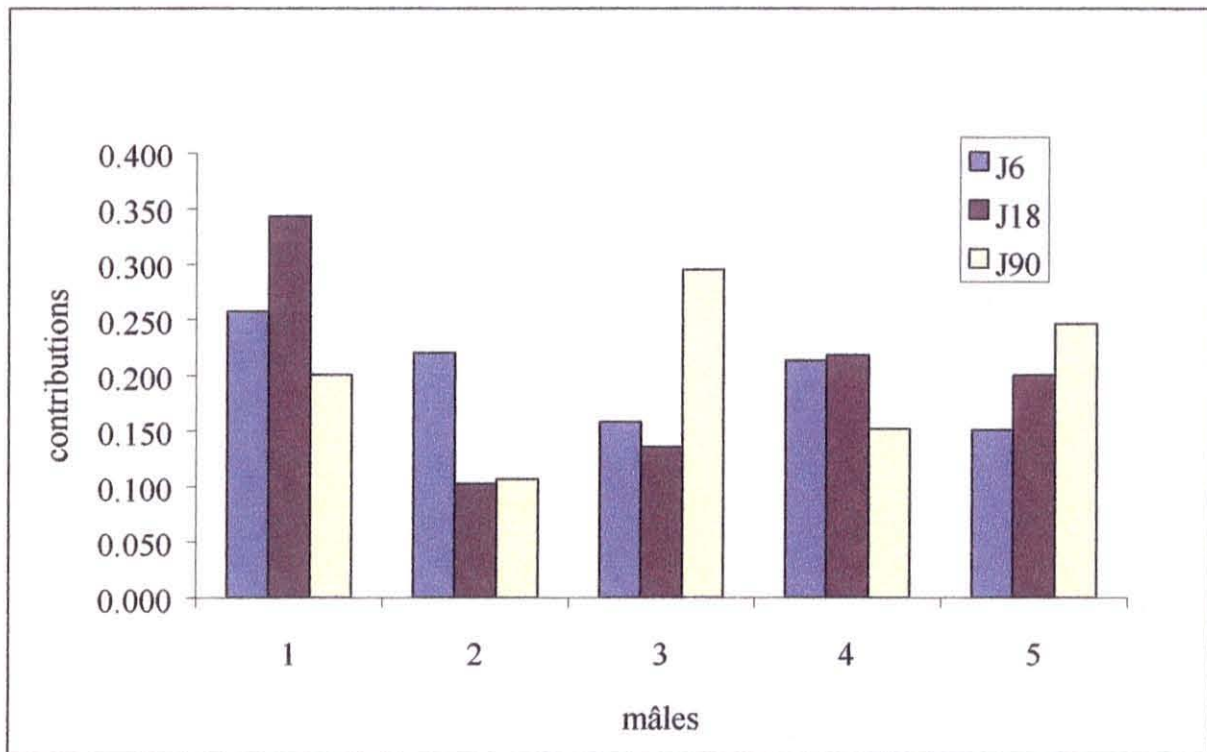
Croisement J6	Femelles					Test G d'hétérogénéité entre femelles
	1	2	3	4	5	
Mâles						
1	4	1	3	0	26	*** (G=19.68) ( $\alpha=0.0006$ )
2	7	8	5	5	21	
3	4	14	2	9	11	
4	19	21	20	4	31	
5	5	9	6	6	8	
Contribution (%)	0.18	0.22	0.13	0.12	0.35	

\*\*\*:  $\alpha < 0.001$

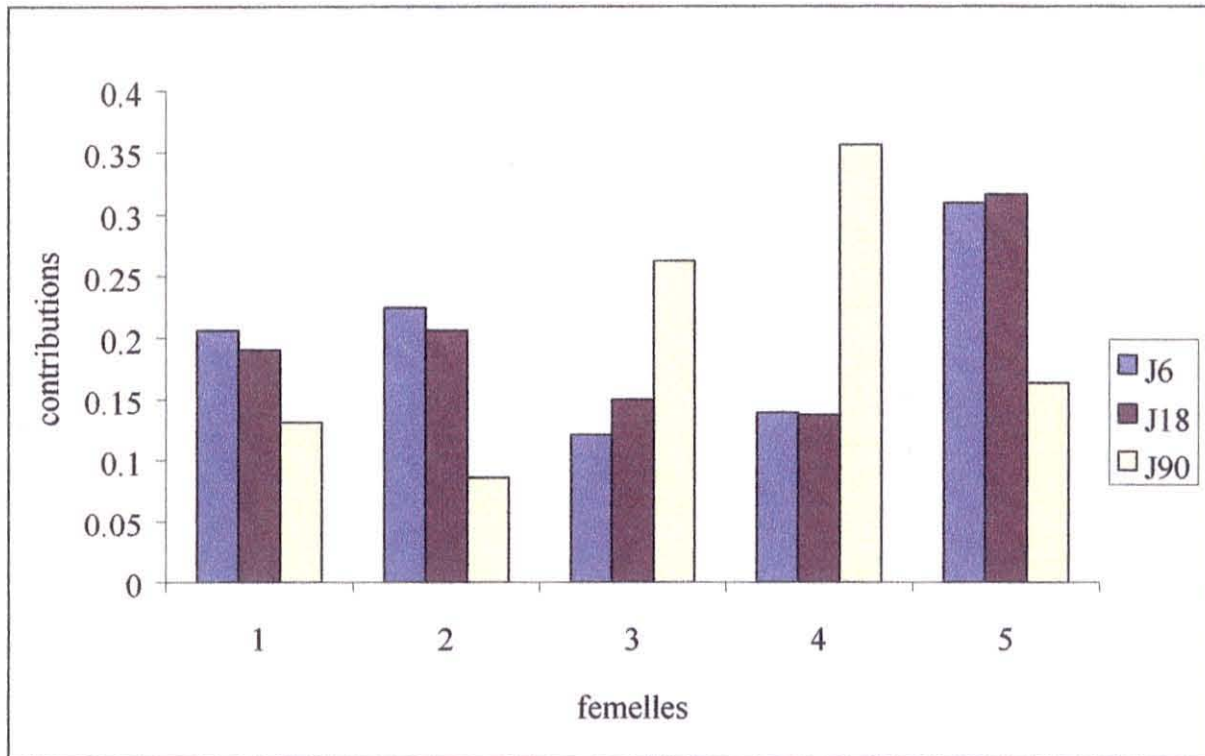
### III 3 Evolution dans le temps de la structure génétique de la population

Les changements dans le temps des contributions parentales, c'est-à-dire des fréquences de chaque famille dans la population, sont illustrés par les tableaux représentant les contributions parentales dans les croisements séparés aux stades J6, J18 (avant métamorphose) et J90 (juvéniles de 3 mois) (Table 3). Seuls les croisements séparés ont été utilisés, pour ne conserver que l'information de survie dans le temps, sans inclure les phénomènes de compétition gamétique du départ. Entre les stades J6 et J18, il existe une différence significative de contributions des mâles ( $G=11.94$ ;  $\alpha=0.018$ ), mais pas des femelles ( $G=0.90$ ;  $\alpha=0.925$ ). Entre les stades J18 et J90, ces contributions sont significativement différentes pour les mâles ( $G=14.03$ ;  $\alpha=0.007$ ) comme pour les femelles ( $G=29.06$ ;  $\alpha=7.596.10^{-6}$ ) (Figures 4 et 5).

**Figure 4:** Contributions (en fréquences) des mâles pour les croisements séparés à J6, J18 et J90.



**Figure 5:** Contributions (en fréquences) des femelles pour les croisements séparés à J6, J18 et J90.

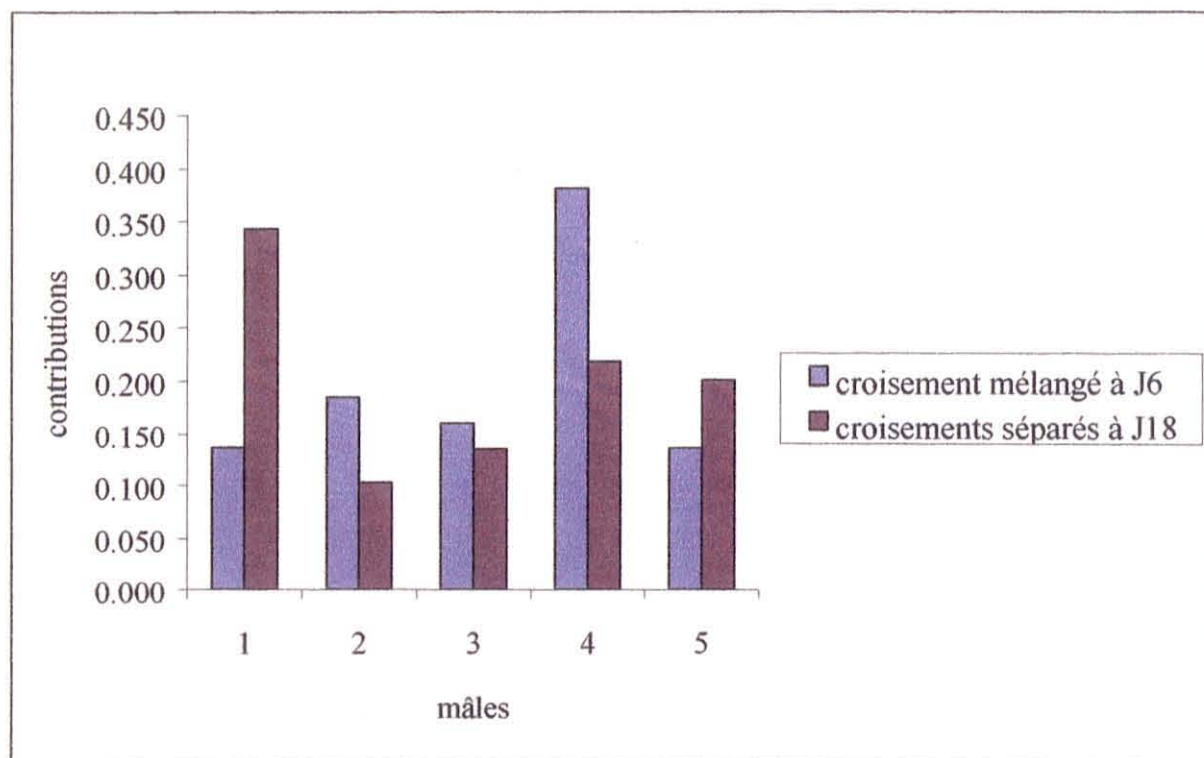


#### III 4 Comparaison entre compétition spermatique et survie des descendants des mâles

Les résultats de la compétition spermatique sont dans le tableau de contributions parentales du croisement mélangé, à J6 (Table 3). La comparaison de ce tableau avec celui des contributions parentales des croisements séparés à J18 (Table 3) permet de déceler une éventuelle corrélation entre efficacité spermatique et survie larvaire des descendants, pour chacun des mâles. En fait, les contributions des mâles sont significativement différentes entre ces deux tableaux ( $G=33.69$ ;  $\alpha=8.626 \cdot 10^{-7}$ ).



**Figure 6:** Contributions (en fréquences) des mâles, à J6 pour le croisement mélangé, à J18 pour les croisements séparés.



### III 5 Performances de croissance

Aucun des croisements, à aucun stade, ne présente de différences de taille (ou de poids) significatives entre les 25 familles, ni entre les descendants des 5 mâles ou des 5 femelles (Annexes 3 et 4). Cependant, des différences significatives sont observées entre les tailles des croisements mélangé (lots 1, 2 et 3) et séparés (lots 4, 5 et 6) à J6 (Tableaux 6 et 9), et entre les différents lots à J6 et J18 (Tableaux 7 et 10); de même, une différence de poids significative existe entre les lots à J90 (Tableaux 8 et 10).

**Tableau 6:** Tailles (en  $\mu\text{m}$ ) et poids (en g) moyens des individus à chaque point d'échantillonnage.

CROISEMENTS		
	Mélangé	Séparés
J6	106.50	100.65
J18		268.69
J90		0.77

**Tableau 7:** Tailles moyennes (en  $\mu\text{m}$ ) des individus dans chacun des lots à J6 et J18.

LOTS						
	1	2	3	4	5	6
J6	106.61	102.24	108.04	100.13	98.78	102.19
J18				274.82	261.15	267.21

**Tableau 8:** Poids moyens (en g) des individus dans chacun des lots à J90.

LOTS			
	4	5	6
J90	0.80	0.70	0.78

**Tableau 9:** Test d'hétérogénéité de taille entre les deux types de croisements à J6.

Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F	$\alpha$
Modèle	1	4469	4468.56		***
Erreur	515	34079	66.17	67.53	<0.0001
Totale	520	39887			

\*\*\*:  $\alpha < 0.001$ .

**Tableau 10:** Test d'hétérogénéité de taille (à J6 et J18) ou de poids (à J90) entre les lots à chaque stade.

Stade	Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F	$\alpha$
J6	Modèle	5	5808	1161.56		***
	Erreur	515	34079	66.17	17.55	<0.0001
	Totale	520	39887			
J18	Modèle	2	11908	5953.90		*
	Erreur	396	706484	1784.05	3.34	0.037
	Totale	398	718391			
J90	Modèle	2	0.72	0.36		*
	Erreur	241	27.54	0.11	3.16	0.044
	Totale	243	28.27			

\*:  $\alpha < 0.05$ ; \*\*\*:  $\alpha < 0.001$ .

3 lots sont pris en compte à J18 et J90 (croisements séparés), 6 à J6 (croisements mélangé + séparés).

## IV DISCUSSION

### IV 1 Contributions parentales

Aucune incompatibilité complète entre gamètes n'a été observée, toutes les familles ayant participé à la formation de la génération des descendants, même en situation de compétition gamétique. Ces participations ne sont significativement déséquilibrées que lors de ce dernier croisement. Dans tous les cas, l'hétérogénéité à l'intérieur des croisements est due aux différences de contributions des femelles d'une part, des mâles d'autre part; les interactions entre mâles et femelles, qui résulteraient de fécondations préférentielles, ne sont pas source d'hétérogénéité. Cependant, les effectifs dans chacune des familles sont souvent faibles. Les contributions marginales, reposant sur des effectifs plus élevés, sont bien plus informatives. C'est pourquoi toutes les comparaisons entre types de croisements ou entre stades de développement ont été effectuées à partir des contributions marginales (contributions des mâles d'une part et des femelles d'autre part), et non pas à partir des contributions des familles (correspondant aux interactions mâles-femelles). L'intérêt de cette étude repose de toutes façons essentiellement sur les différences de contributions parentales, et non pas sur la répartition des descendants entre les familles.



## **IV 2 Compétition spermatique**

En situation de compétition gamétique (croisement mélangé J6), les contributions des parents diffèrent suffisamment pour qu'une hétérogénéité entre familles apparaisse (Tableau 4). En fait, lors de la fécondation, la pression de sélection s'exerce sur les mâles seuls: alors que chacun contribue de la même manière lorsque les croisements sont réalisés séparément, une distinction apparaît quand il y a compétition. Les femelles, quant à elles, contribuent de la même manière qu'il y ait compétition ou non. Cela n'a rien de surprenant: alors que les ovules restent passifs, les spermatozoïdes recherchent activement les gamètes femelles. Seuls certains d'entre eux parviendront à féconder un ovule, puisque le ratio spermatozoïdes/ovules de départ est de 150/1. La compétition gamétique consiste donc plus précisément en une compétition spermatique.

## **IV 3 Evolution durant la phase larvaire**

Au cours de la phase larvaire, les contributions parentales des mâles changent et deviennent significativement différentes, en raison d'une survie différentielle des larves. Mais les mâles ayant été favorisés par la compétition spermatique ne sont pas ceux dont les larves ont la meilleure survie: en particulier, le mâle 4, possédant de nombreux descendants à J6, voit la survie de ceux-ci pendant la phase larvaire inférieure à celle des descendants du mâle 1, dont la contribution à J6 était pourtant assez faible.

Les contributions des femelles sont déséquilibrées, mais ne varient pas durant toute la phase larvaire: l'effet maternel de départ, visualisé à J6, est suffisamment fort pour que la répartition qui en découle reste stable durant tout ce temps. Cet effet maternel induit une survie différentielle des larves, voir des zygotes, dans les toutes premières heures suivant la fécondation.

## **IV 4 Evolution après métamorphose**

Si la survie des larves varie selon leur père, cette variation est encore accentuée chez les juvéniles de 3 mois. Les mâles qui contribuent le plus à ce stade ne sont plus les mêmes qu'en fin de phase larvaire. Le mâle 3, en particulier, voit la survie de ces descendants devenir supérieure à celle des autres, alors qu'elle était basse en phase larvaire; dans le même temps, la contribution du mâle 1 diminue sérieusement. Un phénomène similaire se produit chez les femelles: les contributions des femelles 3 et 4 augmentent nettement (jusqu'à doubler pour la femelle 4), tandis que celle du mâle 5 chute. Pour expliquer ces changements, deux

hypothèses, non exclusives:

- entre les deux prélèvements à J18 et J90, la métamorphose des larves a eu lieu; celle-ci correspond à une étape cruciale du développement, toutes les larves ne parvenant pas à se fixer, puis en raison du stress physiologique occasionné. Leur survie peut donc en être altérée différemment selon leur potentiel génétique. Par la suite, les conditions de vie des juvéniles diffèrent de celles des larves pélagiques; un individu ayant su s'adapter aux conditions de vie larvaire ne sera pas nécessairement celui présentant la meilleure adaptation à la vie fixée.
- d'important taux de mortalité (jusqu'à 90% environ), dont la cause n'est pas déterminée, ont été observés dans les bacs d'élevage des juvéniles. L'hérédité de ces derniers influe très certainement sur leur résistance à des conditions stressantes de l'environnement.

En milieu naturel comme en élevage, métamorphose et changement de conditions de vie sont toujours présents, ce qui n'est sans doute pas le cas des conditions stressantes ayant occasionné la mortalité observée par la suite.

#### **IV 5 Croissance**

Jusqu'à 3 mois, la croissance dans les différentes familles reste sensiblement la même, comme en atteste les différences de poids ou de tailles non significatives observées. Jusqu'à ce stade du moins, survie et croissance semblent donc indépendantes.

Les différences de tailles et de poids observées entre les lots, particulièrement significatives à J6, sont selon toute probabilité dues à des différences de densité dans les bacs d'élevage larvaire: le lot 3, qui présente la taille moyenne la plus élevée à J6, est aussi celui dont la densité est la plus faible (87000 larves/bac contre plus de 150000 larves/bac pour les autres lots). Les densités peuvent varier rapidement d'un jour à l'autre, en raison des mortalités importantes qui peuvent survenir chez les larves. Ces différences s'estompent avec le temps: peut-être les individus les plus petits ont-ils tendance à rattraper leur retard de croissance, du moins au cours de la phase larvaire; plus probablement, ils ont un taux de survie inférieur à celui des individus plus grands, auquel cas ils n'apparaissent plus aux stades avancés (Collet et al., en préparation).

A J6, on observe également une différence de taille très significative entre les croisements mélangé et séparés. Cette différence repose sans doute en partie sur les différences existant entre lots, mais cela ne suffit pas à expliquer le haut niveau de significativité ( $P < 0.0001$ ). Les larves provenant du croisement mélangé sont les plus grandes à ce stade, ce qui pourrait provenir d'une élimination dans ce croisement des individus les moins "aptés" (plus petits dès le départ, ou à croissance plus faible) dès le stade zygotique.



## V CONCLUSION

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

D'autre part, ces contributions varient au cours du temps, avec notamment un changement crucial entre les phases larvaire et juvénile (Lannan, 1980a). Pour connaître le rôle exact de la métamorphose dans ce changement, il reste à analyser les génotypes de juvéniles prélevés une semaine après celle-ci, à J30 (dans notre expérience, avant que les taux de mortalité n'augmentent brusquement). Quoiqu'il en soit, la sélection par l'environnement n'agit pas sur les mêmes génotypes avant et après métamorphose.

Pendant la phase larvaire, l'influence des génotypes paternels et maternels diffère: pour les mâles, c'est d'abord la compétition spermatique qui détermine leurs contributions, puis une survie différentielle de leurs descendants; les contributions des femelles dérivent de l'effet maternel intervenant dès le stade zygotique, jusqu'à la métamorphose.

Finalement, certains individus participent plus que d'autres à la formation d'une nouvelle génération de juvéniles, puis d'adultes: un suivi dans le temps des descendants obtenus permettra de déterminer si les individus ayant les contributions parentales les plus importantes chez les juvéniles restent les mêmes jusqu'à ce que leurs descendants soient adultes, ou si de nouvelles modifications apparaissent. Pour les élevages, il est de toutes façons plus intéressant de choisir comme reproducteurs ceux dont les descendants adultes sont les plus représentés, tout en prenant garde à ne pas engendrer de consanguinité qui ferait ressortir le fardeau génétique de l'espèce (Sheridan, 1997). Reste à vérifier que l'expérience est renouvelable et que, sous certaines conditions d'élevage, ce sont toujours les mêmes reproducteurs qui ont les contributions parentales les plus élevées: les trois lots séparés pour chaque type de croisements ne constituaient que des pseudo-réplicats, la division n'ayant été



faite que trois heures après fécondation.. L'analyse d'individus provenant du croisement mélangé à J18, puis après métamorphose, devrait permettre de confirmer les résultats obtenus. L'augmentation du nombre d'individus génotypés par croisement rendrait également les tests statistiques plus robustes.

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

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

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

## BIBLIOGRAPHIE

- Alford R.L., Hammond H.A., Coto I., Caskey C.T. (1994). Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 55:190-195.
- Avise J.C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New-York.
- Batargias C., Kotoulas G., Magoulas A., Zouros E. (1997). Retrospective parentage identification in a mass spawning of gilthead sea bream, by means of microsatellite DNA. Preliminary results of genetic selection. In: Fifth Panhellenic Congress of Oceanography and Fisheries. Kavala, Greece, 15-18 April 1997.
- Beattie J.H., Perdue J., Hershberger W., Chew K. (1987). Effects of inbreeding on growth in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Shell. Res.* 6: 25-28.
- Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y., Bonhomme F (1998). Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* 148:1893-1906.
- Borsa P., Zainuri M., Delay B. (1991). Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity* 66:1-8.
- Burczyk J., Adams W.T., Jarbas Y.S. (1996). Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. *Heredity* 77(3): 251-260.
- Burke T. (1989). DNA fingerprinting methods for the study of mating success. *TREE* 4(5): 139-144.
- Callen D.F., Thompson A.D., Shen Y., Phillips H.A., Richards R.I., Mulley J.C., Sutherland G.R. (1993). Incidence and origine of "null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* 52:922-927.
- Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S.P., Budowle B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann. Hum. Genet.* 56: 45-57.
- Colbourne J.K., Neff B.D., Wright J.M., Gross M.R. (1996). DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)<sub>n</sub> microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Can. J. Fish. Aq. Sc.* 53: 342-349.



- David P., Jarne P. (1997). Context-dependent survival differences among electrophoretic genotypes in natural populations of marine bivalve *Spisula ovalis*. *Genetics* 146: 335-344.
- Estoup A., Largiader C.D., Perrot E., Chourrout D. (1996). Rapid one-tube extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol. Mar. Bio. Biotech.* 5(4): 295-298.
- Ferguson, A., Taggart J.B., Prodohl P.A., McMeel O., Thompson C., Stone C., McGinnity P., Hynes R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *J. Fish Bio.* 47(Suppl. A): 103-126.
- Fredholm M., Winterø A.K. (1996). Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Animals Genetics* 27: 19-23.
- Fujio Y. (1982). A correlation of heterozygosity with growth rate in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Toh. J. Agri. Res.* 33(2): 66-75.
- Garcia de Leon F.G., Canonne M., Quillet E., Bonhomme F., Chatain B. (1998). The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 159(3-4): 303-316.
- Harris A.S., Bieger S., Doyle R.W., Wright, J.M. (1991). DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. *Aquaculture* 92(2-3): 157-163.
- Hedgecock, D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In Beaumont A.R. (ed.). *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman and Hall, London, pp. 122-134.
- Hedgecock D., McGoldrick D.J., Bayne B.L. (1995). Hybrid vigor in Pacific oysters: an experimental approach using crosses among inbred lines. *Aquaculture* 137: 285-298.
- Herbinger C.M., Doyle R.W., Pitman E.R., Paquet D., Mesa K.A., Morris D.B., Wright, J.M., Cook D. (1995). DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* 137(1-4): 245-256.
- Herbinger CM, Doyle R.W, Taggart C.T., Lochmann S.E., Brooker A.L., Wright J.M., Cook D. (1996). Family relationships and effective population size in a natural cohort of cod larvae. *Can. J. Fish Aqua. Sc.* 54 (Suppl. 1): 11-18.

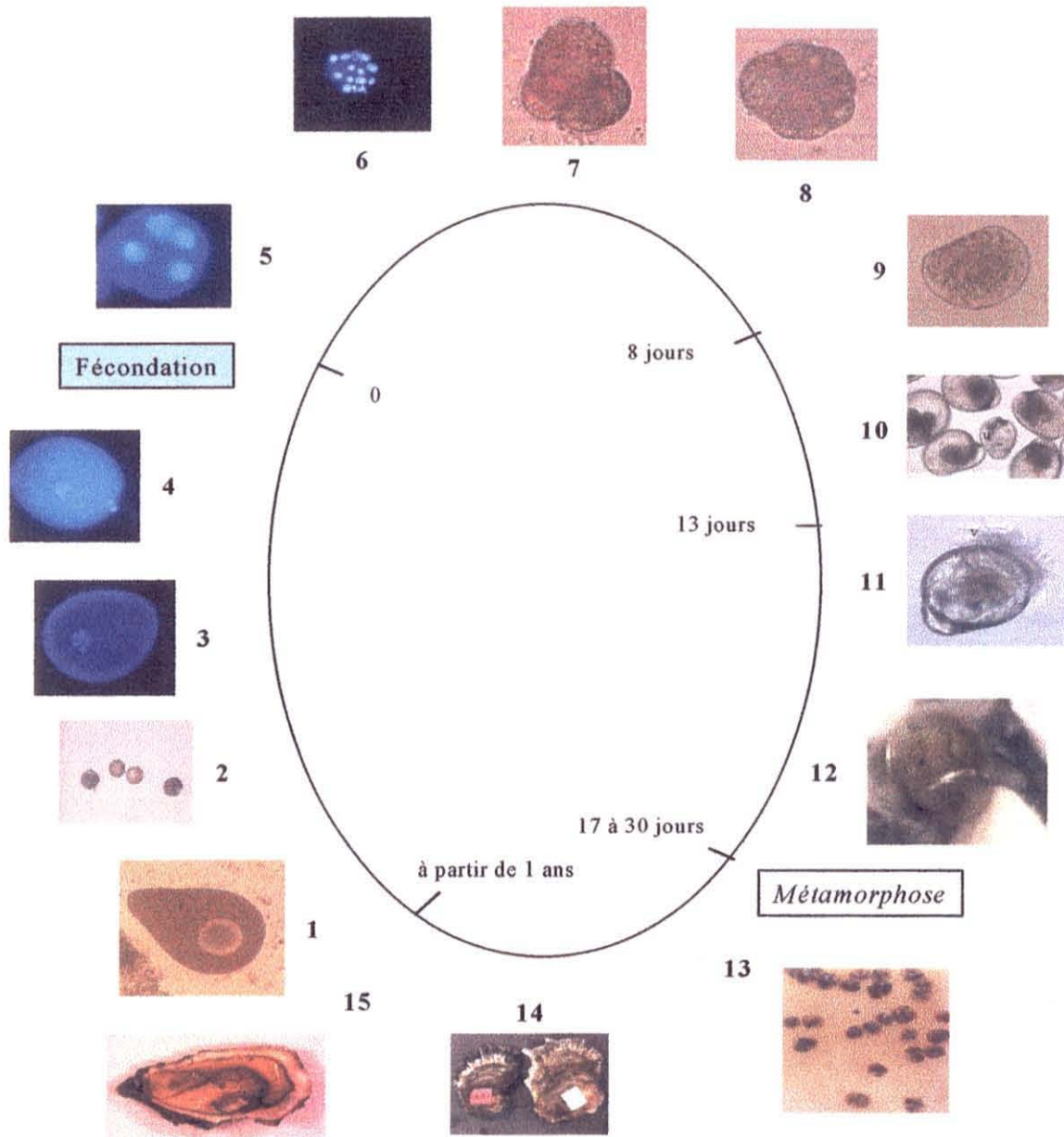


- Heyen D.W., Beever J.E., Da Y., Evert R.E., Green C., Bates S.R.E., Ziegle J.S., Lewin H.A. (1997). Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semi-automated parentage testing. *Animals Genetics* 28: 21-27.
- Hospital F., Chevalet C., Mulsant P. (1992). Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics* 132: 1199-1210.
- Huvet A. (1997). Différenciation génétique de deux huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*: apport des marqueurs microsatellites. Rapport de DEA de Biologie des Populations, Génétique et Eco-éthologie.
- Jones A.G., Avise J.C. (1997). Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnatus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Mol. Ecology* 6: 203-213.
- Kellog K.A., Markert J.A., Stauffer J.R., Kocher T.D. (1995). Microsatellite variation demonstrate multiple paternity in lekking cichlid fish from lake Malawi, Africa. *Proceedings of the Royal Society, London* 260B: 79-84.
- Kincaid H.L. (1976). Inbreeding in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board, Canada* 33: 2420-2426.
- Koorey D.J., Bishop G.A., McCaughan G.W. (1993). Allele non-amplification: a source of confusion in linkage studies employing microsatellite polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.* 2(3): 289-291.
- Lannan J. E. (1980a). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. I. Genetic and environmental variation in survival in the larval rearing system. *Aquaculture* 21: 323-336.
- Lannan J. E. (1980b). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstocks conditioning to maximise larval survival. *Aquaculture* 21: 337-345.
- Lannan J. E. (1980c). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. III. Selective breeding for improved larval survival. *Aquaculture* 21: 347-351.
- Lannan J. E. (1980d). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. IV. Inbreeding and larval survival. *Aquaculture* 21: 353-356.
- Launey S. (1998). Marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* L.: caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles. Thèse présentée à l'Institut National Agronomique Paris Grignon.

- Magoulas A. (1998). Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA. Proceeding of the Seminar Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM). Zaragoza, Spain, April 28-30, 1997. pp 153-168.
- Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V., Zouros E. Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics*, in press.
- Moore D. (1993). Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In Ausubel F.M. (Ed.). *Current protocols in molecular biology*, vol. 1. New-York, unit 2-2: 1-2.
- Morán P., Pendás A.M., Beall E., García-Vásquez E. (1996). Genetic assessment of the reproductive success of Atlantic salmon precocious parr by means of VNTR loci. *Heredity* 77(6): 655-660.
- Pemberton J.M., Slate J., Bancroft D.R., Barrett J.A. (1995). Non amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecology* 4: 249-252.
- Roughgarden J., Gaines S., Possingham H. (1988). Recruitment dynamics in complex life cycles. *Science* 241: 1460-1466.
- Sheridan A.K. (1997). Genetic improvement of oyster production - a critique. *Aquaculture* 153: 165-179.
- Walne P.R. (ed.) (1974). *Culture of bivalve molluscs: fifty years experience at Conwy*. Whitefriars Press Ltd, London.
- Zouros E. (1993). Associative overdominance: evaluating the effects of inbreeding and linkage disequilibrium. *Genetica* 89: 35-46.
- Zouros E., Foltz D.W. (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia* 25(2): 583-591.
- Zouros E., Pogson G.H. (1994). The present status of the relationship between heterozygosity and heterosis. In Beaumont A.R. (ed.). *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman and Hall, London, pp. 135-146.

## ANNEXE 1

### Cycle de développement de *Crassostrea gigas*

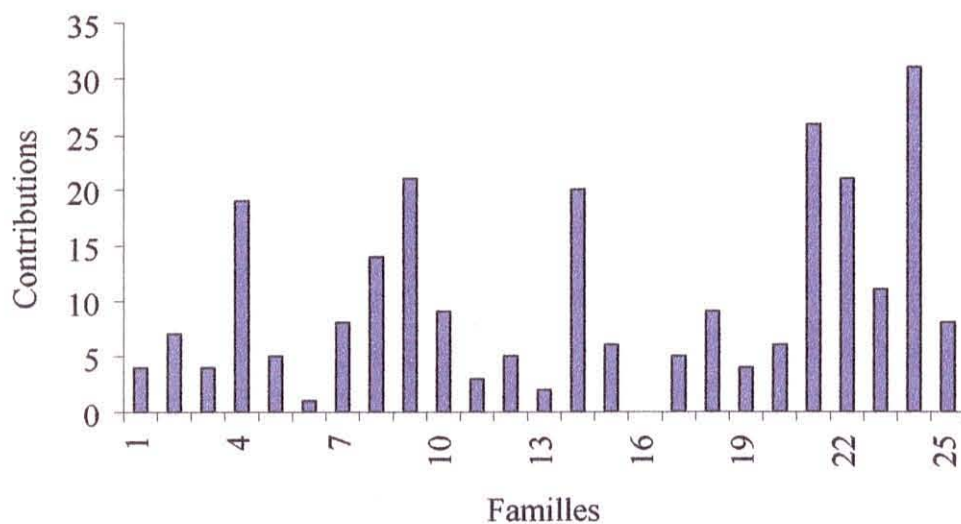


1. Ovocyte en cours de maturation; 2., 3. et 4. Ovocyte mature; 5. Embryon stade 4 cellules; 6. Embryon stade 16 cellules; 7. et 8. Embryon stade Morula; 9. Larve stade D; 10. et 11. Larve à J13 (u: umbo, v: velum); 12. Larve stade pédivéligère (p: pied, o: organe sensoriel); 13. Post-larves fixées sur plaque PVC; 14. Juvéniles (environ 6 mois); 15. Géniteur mature.

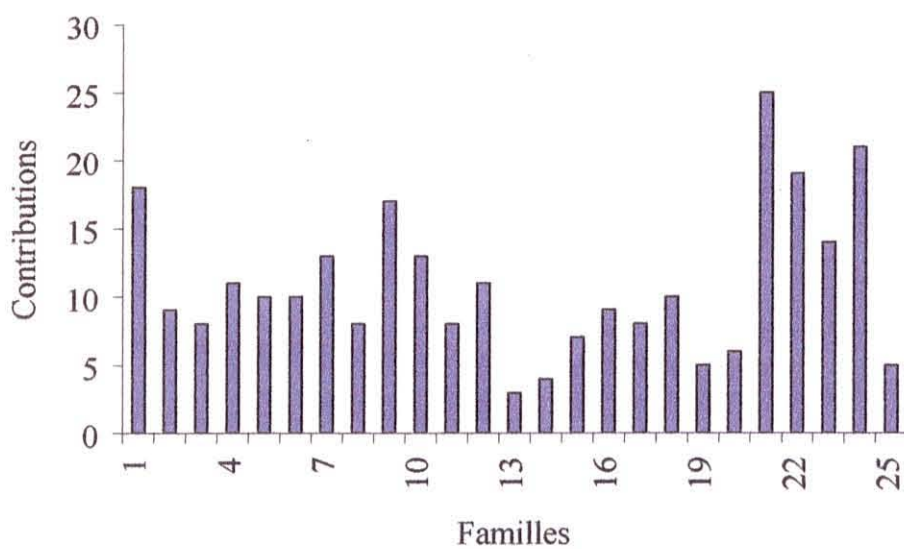


## ANNEXE 2

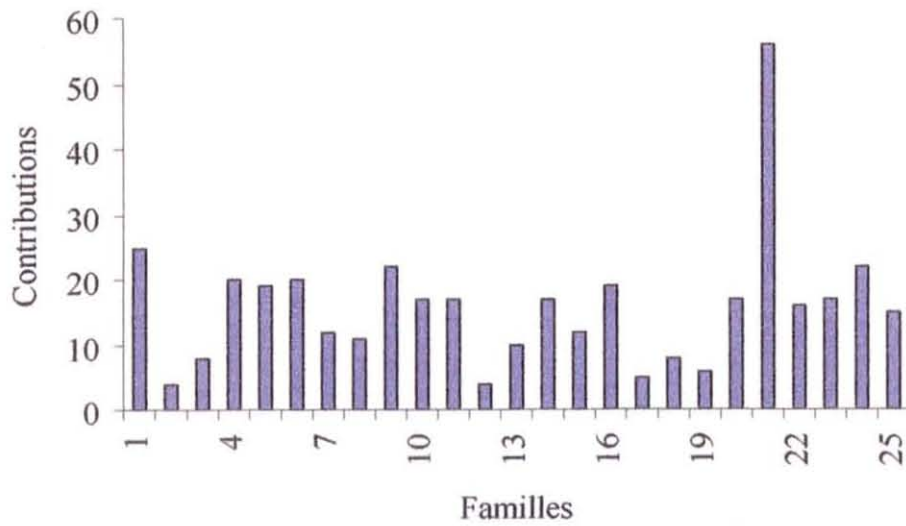
**Contributions (en fréquences) des familles pour le croisement mélangé à J6**



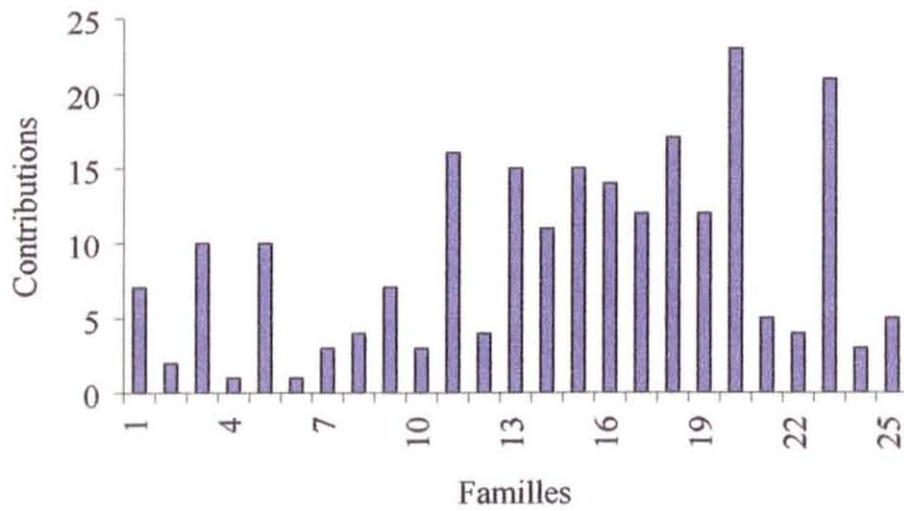
**Contributions (en fréquences) des familles pour les croisements séparés à J6**



**Contributions (en fréquences) des familles pour les croisements séparés à J18**



**Contributions (en fréquences) des familles pour les croisements séparés à J90**



### ANNEXE 3

Test d'hétérogénéité de taille (à J6 et J18) ou de poids (à J90) entre les familles à chaque point d'échantillonnage.

Point d'échantillonnage	Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F	$\alpha$
Croisement mélangé J6	Modèle	23	759	33.01		
	Erreur	225	17063	75.83	0.44	0.990
	Totale	248	17822			NS
Croisements séparés J6	Modèle	24	1305	54.37		
	Erreur	247	16291	65.96	0.82	0.704
	Totale	271	17596			NS
Croisements séparés J18	Modèle	24	39874	1661.42		
	Erreur	374	678517	1814.22	0.92	0.581
	Totale	398	718391			NS
Croisements séparés J90	Modèle	24	2.39	0.10		
	Erreur	219	25.87	0.12	0.84	0.677
	Totale	243	28.27			NS

NS: non significatif au risque  $\alpha=5\%$



Test d'hétérogénéité de taille (à J6 et J18) ou de poids (à J90) entre les descendants des 5 mâles à chaque point d'échantillonnage.

Point d'échantillonnage	Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F	$\alpha$
	Modèle	4	80	20.10		
Croisement mélangé J6	Erreur	244	17742	72.71	0.28	0.893
	Totale	248	17822			NS
	Modèle	4	75	18.85		
Croisements séparés J6	Erreur	267	17521	65.62	0.29	0.886
	Totale	271	17596			NS
	Modèle	4	5038	1259.61		
Croisements séparés J18	Erreur	394	713353	1810.54	0.70	0.595
	Totale	398	718391			NS
	Modèle	4	0.47	0.12		
Croisements séparés J90	Erreur	239	27.79	0.12	1.02	0.397
	Totale	243	28.27			NS

NS: non significatif au risque  $\alpha=5\%$

Test d'hétérogénéité de taille (à J6 et J18) ou de poids (à J90) entre les descendants des 5 femelles à chaque point d'échantillonnage.

Point d'échantillonnage	Source de variation	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F	$\alpha$
Croisement mélangé J6	Modèle	4	46	11.38		
	Erreur	244	17777	75.86	0.16	0.960
	Totale	248	17822			NS
Croisements séparés J6	Modèle	4	41	10.25		
	Erreur	267	17555	65.75	0.16	0.960
	Totale	271	17596			NS
Croisements séparés J18	Modèle	4	11087	2771.82		
	Erreur	394	707305	1795.19	1.54	0.189
	Totale	398	718391			NS
Croisements séparés J90	Modèle	4	0.47	0.12		
	Erreur	239	27.79	0.12	1.02	0.397
	Totale	243	28.27			NS

NS: non significatif au risque  $\alpha=5\%$

# ANNEXE 4

