

Université des Sciences et Technologies de Lille 1

DEA Biodiversité et Ecosystèmes Fossiles et Actuels

SAUVAGE Christopher

**Domestication en phase larvaire
chez l'huître creuse *Crassostrea gigas***

**Effets sélectifs des conditions environnementales
appliquées en écloséries sur la diversité génétique**



Responsables: Pierre Boudry & Nicolas Taris.
Laboratoire de Génétique et Pathologie
IFREMER
17390 La Tremblade

Ifremer

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02417



IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

11881
1005803
1005803

1005803

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION.....	2
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	6
	II.1.CHOIX DES GÉNITEURS	6
	II.2.RÉALISATION DU CROISEMENT	6
	II.2.1.OBTENTION DES GAMÈTES.....	6
	II.2.2.LA FÉCONDATION.....	6
	II.3.ELEVAGE LARVAIRE	7
	II.4.FIXATION.....	8
	II.5.MESURES INDIVIDUELLES DES LARVES.....	9
	II.6.PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN ET DE PCR.....	9
	II.6.1.EXTRACTION D'ADN.....	9
	II.6.2.L'AMPLIFICATION PAR PCR EN MULTIPLEXAGE	10
	II.6.3.CHOIX DES MARQUEURS MICROSATELLITES	11
	II.6.4.GÉNOTYPAGE	11
	II.7.LA CATÉGORISATION DES GROUPES D'ALLÈLES OU « BINNING »	12
	II.8.ASSIGNATION DE PARENTÉ	13
	II.9.ANALYSES STATISTIQUES	14
	II.9.1.TAUX D'ÉCLOSION	15
	II.9.2.CROISSANCE LARVAIRE	15
	II.9.3.SURVIE LARVAIRE	15
	II.9.4.COMPOSITION DE LA POPULATION À J22	16
III.	RÉSULTATS	17
	III.1.TAUX D'ÉCLOSION.....	17
	III.2.GÉNOTYPAGE ET ASSIGNATION DE LA GÉNÉRATION F1	18
	III.3.CROISSANCE LARVAIRE.....	18
	III.4.SURVIE LARVAIRE	21
	III.5.COMPOSITION DE LA POPULATION À J22.....	22
IV.	DISCUSSION	24
V.	CONCLUSION.....	28
	BIBLIOGRAPHIE.....	30
	LEXIQUE	33
	ANNEXE.....	34

I. Introduction

Suite à la quasi disparition de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* (Grizel *et al.*, 1991), l'huître creuse *Crassostrea gigas*, originaire du Japon, a été introduite en France dans les années 1970 où elle s'est naturalisée. Aujourd'hui, *C. gigas* représente la première espèce conchylicole française avec une production annuelle de 140 000 tonnes par an (données FAO 2001). La France est le premier producteur européen et le quatrième mondial. Les principales zones de captage naturelles sont les bassins d'Arcachon et de Marennes-Oléron où le recrutement est variable d'une année à l'autre en fonction des variations environnementales (notamment de la température de l'eau Robert *et al.*, 1999). Cette fluctuation dans la disponibilité en naissain est un problème pour assurer une production ostréicole régulière. En parallèle, depuis les années 1960, la production de naissain en éclosérie s'est développée, afin notamment de pallier aux fluctuations du recrutement annuel. Dans d'autres pays, tels que les Etats-Unis ou la Nouvelle Zélande, où l'introduction de *C. gigas* a été réalisée, les écloséries assurent la quasi totalité de la production de naissain chez cette espèce car la reproduction naturelle y est très limitée. La production de naissain en écloséries se réalise, aujourd'hui, dans des conditions environnementales très différentes de celles du milieu naturel (densité, alimentation, température,...) afin de l'optimiser et de la rentabiliser. En 1998, environ 10% du naissain français provenait d'élevage en éclosérie (Robert *et al.*, 1999). Aujourd'hui, les écloséries françaises assurent la production de plus de 20% du naissain mis en culture (soit environ 900 millions de naissain). Cette augmentation est notamment liée au développement d'huîtres triploïdes. Parallèlement, des programmes d'amélioration génétique par sélection ont été initiés dans de nombreux pays (Langdon *et al.*, 2002) dont la France. Le doublement annoncé de leur production en 2004, montre l'importance croissante des écloséries françaises dans la filière de production ostréicole nationale.

Les conditions d'élevage appliquées en éclosérie peuvent induire des effets (sélection) dès les stades précoces de développement des larves et du naissain d'huîtres. Selon Doyle (1983), la domestication est définie par des changements génétiques affectant le comportement, la morphologie et la physiologie sous la contrainte d'une culture en condition artificielle. Pour une espèce commerciale comme l'huître creuse, il existe un intérêt économique pour une sélection précoce ayant des effets sur la qualité ultérieure du naissain et des paramètres tels que la survie, la croissance et la reproduction.

Les zones de captage présentent des conditions biotiques et abiotiques variables, nettement différentes de celles des écloséries (température souvent supérieure à 25°C, apport trophique optimal, tamisage pour l'homogénéisation des lots et l'élimination des « queues de lots »). Aucun travail ne s'est encore intéressé aux effets génétiques de cette pratique d'élevage intensif et aux interactions éventuelles entre populations naturelles et populations issues d'écloséries qui en résulteraient. En effet, les conditions intensives d'éclosérie pourraient induire une forte pression de sélection. La forte fécondité des huîtres (25 à 50x10⁶ ovocytes / femelles / an) et la grande taille des populations permettent, d'une part, le maintien d'un polymorphisme génétique important au sein des populations des bassins d'élevage et d'autre part, induisent des effets de dérive génétique importants dans les populations issues d'écloséries (forte variabilité du succès reproducteur entre individus (Hedgecock *et al.*, 1992 ; Boudry *et al.*, 2002). Il en résulte des tailles efficaces de populations, issues d'écloséries, faibles pouvant induire l'expression de l'important fardeau génétique mis en évidence chez cette espèce (Launey *et al.*, 2001).

Chez les bivalves, la majorité des études s'intéressent à la phase adulte plutôt qu'à la phase larvaire. Cependant, de nombreux travaux menés sur l'écologie larvaire des invertébrés marins sont la preuve de l'intérêt porté à ce stade de développement (Jablonski, 1986). La maîtrise de la reproduction des huîtres en éclosérie, a apportée d'importantes connaissances sur leur développement précoce. Par exemple, Collet *et al.* (1999) ont mis en évidence une corrélation positive entre la croissance des larves et la date de fixation : plus cette dernière est tardive, plus les larves prêtes à se fixer ont un diamètre moyen important lorsque les conditions environnementales (température, salinité, apport trophique) ont été maintenues constantes. Cependant, les larves qui tardent à fixer présentent un coefficient de variation de taille supérieur (20%) aux larves les plus précoces (3%). Les éventuelles conséquences de ces corrélations restaient à étudier.

Récemment, Ernande *et al.* (2003), se basant sur l'étude de 15 familles (5 mâles x 3 femelles) élevées séparément, ont montré qu'il existait une composante génétique aux variations de survie et de croissance larvaire et des corrélations génétiques négatives entre taux de développement larvaire et succès à la métamorphose, permettant la coexistence de différentes stratégies de développement précoce (figure 1). Mais, l'influence des conditions environnementales sur cette variabilité génétique, son expression phénotypique et d'éventuelles interactions génotype - environnement restaient à étudier.

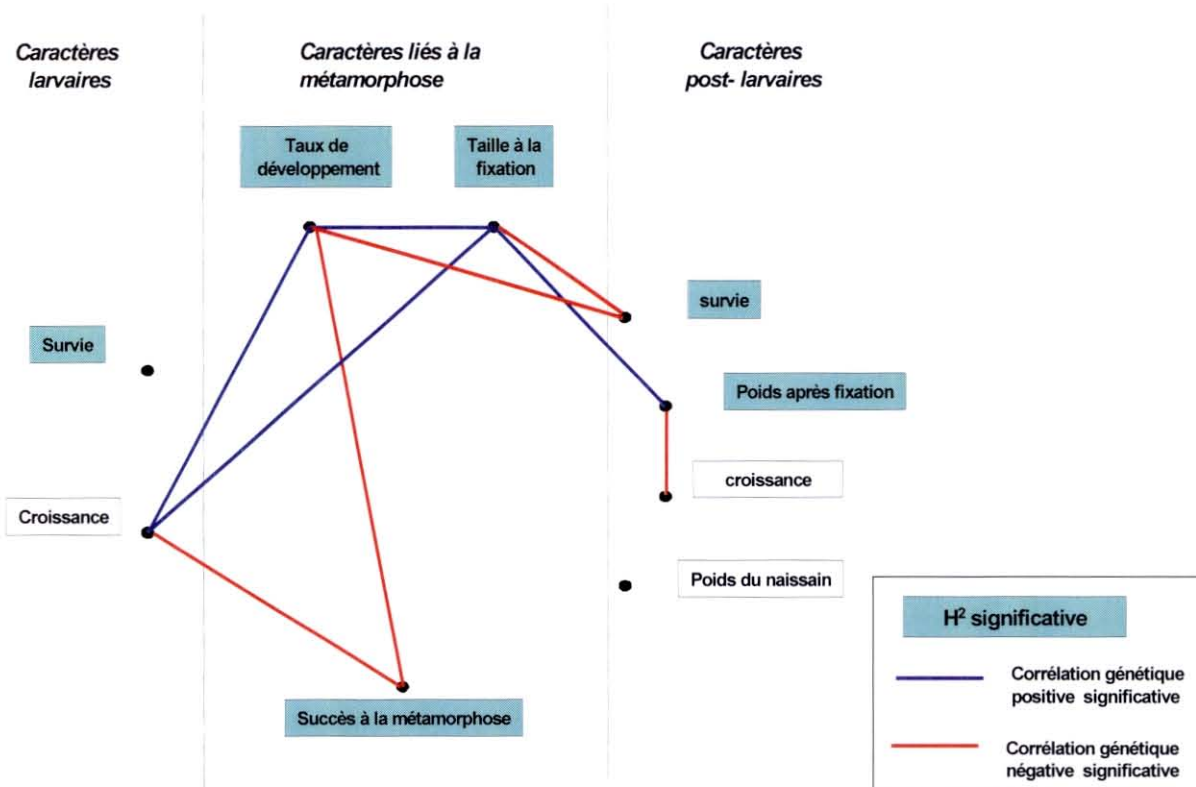


Figure 1 : représentation schématique des différentes stratégies de développement en phase larvaire chez *Crassostrea gigas* (d'après Ernande *et al.*, 2003)

L'étude de l'effet de différents environnements sur la diversité génétique au sein de nombreuses familles élevées séparément est difficilement réalisable. En effet, ce type d'étude exige des moyens zootechniques très importants et des biais expérimentaux sont inévitables. Afin de s'affranchir de cette contrainte, l'élevage de familles groupées est une solution possible. Suite à la fécondation, les familles sont mélangées puis réparties équitablement entre les différentes conditions d'élevage. Dans l'étude des variations de performance de traits tel que le taux de croissance, cela permet de distinguer l'effet génétique de l'effet environnemental (Selvamani *et al.*, 2001). En effet, élever en commun des larves issues de parents multiples par le biais de croisements factoriels (où chaque mâle est croisé avec chaque femelle) permet de mieux évaluer l'effet génétique sous-jacent à la performance d'un trait tout en distinguant l'effet environnemental sur ce même trait (Herbinger *et al.*, 1999).

Jusqu'à présent, aucune étude n'avait considérée l'effet que pourrait avoir les variations des conditions environnementales (notamment la température) durant la phase larvaire sur la croissance et la survie. Cette étude avait donc pour but principal de mieux comprendre l'effet des conditions environnementales appliquées lors du développement larvaire sur la diversité génétique chez *C. gigas*. Ainsi, deux conditions environnementales

correspondant, d'une part, à l'élevage extensif en milieu naturel (traitement 1: 20°C) et, d'autre part, à l'élevage intensif en éclosérie (traitement 2 : 26°C) ont été appliquées à une population de larves issues d'un croisement factoriel. L'effet attendu sur la croissance et la survie larvaire est présenté en figure 2. L'effet sur la diversité génétique a été évalué *via* l'utilisation de marqueurs moléculaires neutres que sont les microsatellites* (voir définition dans le lexique), permettant l'assignation de parenté des larves. Afin d'optimiser l'utilisation de ces marqueurs, l'amplification simultanée (ou « multiplexage ») de trois loci* a été réalisée. L'estimation des contributions parentales dans les deux élevages, a permis l'étude de la variabilité génétique et des interactions génotype* / environnement. Plus concrètement, des prélèvements de larves ont été effectués dans chaque environnement d'élevage, puis, ces larves ont été mesurées individuellement et génotypées.

Au final, les résultats obtenus permettront de quantifier l'effet des pratiques d'élevage intensives sur la diversité génétique des populations élevées en écloséries, de décrire la composition de la population au début de la fixation des larves les plus précoces, mais aussi d'étudier l'interaction génotype – environnement sur la survie et la croissance.

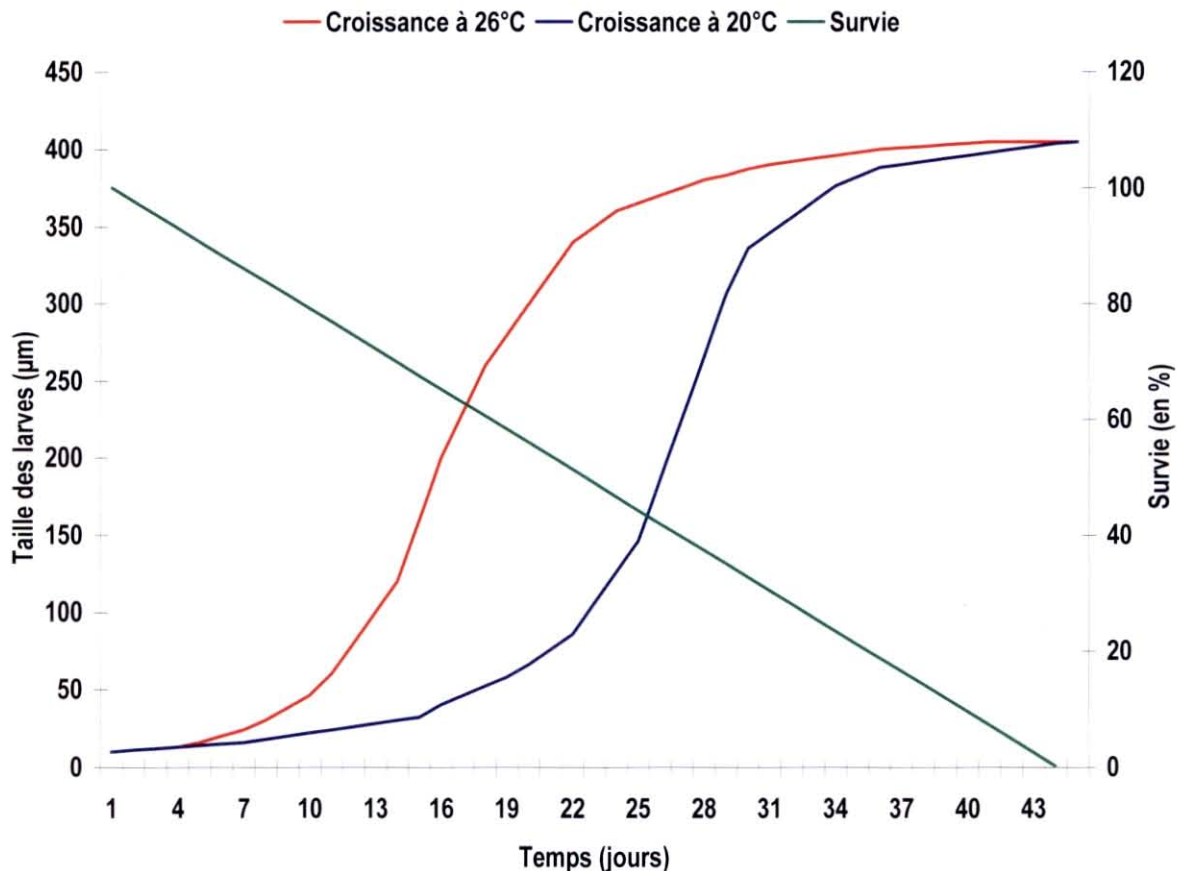


Figure 2 : Evolution attendue de la croissance larvaire et de la survie selon le traitement.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Choix des géniteurs

Sur un ensemble de 200 individus adultes prélevés en milieu naturel (Port des Barques, Charente-Maritime), une sélection a été effectuée en vue de conserver des mâles et des femelles présentant un maximum d'hétérozygotie afin de faciliter l'assignation de parenté. Ces 200 huîtres ont été sexées et génotypées aux 3 loci microsatellites utilisés dans cette étude (voir note technique en annexe). Les individus hermaphrodites ont été éliminés de la sélection. Par la suite, les individus sélectionnés ont été placés dans un raceway¹ alimenté par de l'eau de mer filtrée et maintenus dans des conditions trophiques et à une température optimales, dans l'attente de leur maturation sexuelle durant environ 2 mois.

II.2. Réalisation du croisement

II.2.1. Obtention des gamètes

Le croisement a eu lieu le 2 mars 2004. Les gamètes ont été obtenues par stripping de la gonade. Cette technique consiste à récupérer manuellement les gamètes. Tout d'abord, les géniteurs sont ouverts proprement afin de ne pas endommager la gonade. Puis à l'aide d'un scalpel, la gonade est dilacérée et rincée à l'eau de mer afin de récupérer les gamètes. Ainsi, ces gamètes mâles et femelles sont récupérés séparément et filtrés sur un tamis de 25µm pour les mâles et de 60µm pour les femelles, afin d'éliminer les débris de tissus provenant de la scarification. Enfin, un comptage pour déterminer la concentration optimale de gamètes à utiliser lors de la fécondation a été effectué. Ce comptage est réalisé grâce à des cellules de Malassez² pour les ovocytes et de Thoma pour les spermatozoïdes et assisté par un logiciel d'analyse d'images SAMBA™. En fonction des concentrations, une dilution peut être réalisée.

II.2.2. La fécondation

Le nombre d'ovocytes désiré est mis en suspension dans de l'eau de mer à raison de 15000 ovocytes par ml. Cette concentration élevée est maintenue pour faciliter le rapprochement des gamètes pendant les premières minutes suivant la fécondation. Puis, la quantité de suspension de sperme nécessaire pour avoir un ratio de 100 spermatozoïdes / ovocytes est ajoutée. C'est le ratio optimal pour réaliser la fécondation car en deçà de 50

¹ Enceinte dans laquelle l'eau circule dans un sens et permet l'alimentation en phytoplancton des animaux.

² Les cellules de Malassez et de Thoma sont des lames de plastique ou de verre quadrillées permettant un comptage.

spermatozoïdes/ovocytes, le taux de fécondation diminue et au delà de 500 spermatozoïdes/ovocytes, le risque de polyspermie devient significatif.

Les 48 croisements factoriels (12 mâles par 4 femelles) ont été réalisés séparément dans des béciers de 500ml ce qui évite la compétition spermatique et maximise la diversité génétique (Boudry *et al.*, 2002). Les embryons n'ont été mélangés que 3 heures après la fécondation constituant ainsi des familles en mélange.

Afin de déterminer le taux d'éclosion, trois prélèvements (333 μ l) post-fécondation pour chaque croisement ont été réalisés à 24hrs et chacun des prélèvements a été compté trois fois. Ce taux est déterminé par le ratio Nombre de larves / Nombre total d'ovocytes.

II.3. Elevage larvaire

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

Espèces d'algues distribuées (nb de Cellules/mL/j)					
Phase d'élevage	<i>Isochrysis tahiti</i>	<i>Chaetoceros calcitrans forma pumilum</i>	<i>Gracilis galbana</i>	Volume distribué par espèce (en L)	Diamètre des larves d'huîtres (μ m)
1- J1 à J6	18	25	16	0,34/ 0,125/ 0,19	40
2- J7 à J12	20	26	12	1,7/ 0,76/ 0,97	110
3- J13 à Fin	20	25	18	2,6/ 1,315/ 1,82	210

Tableau 1 : Description de la ration alimentaire distribuée

Suite à la fécondation, un réajustement de densité des larves est nécessaire. Après 24 heures d'incubation, la concentration a été ramenée à 100 individus par ml. Cela se réalise selon la méthodologie suivante :

- Filtration sur tamis de 45 μm ,
- Transvasement dans une éprouvette graduée qsp 500ml,
- Echantillonnage pour comptage et estimation de la survie selon la méthode développée par Utting (1991),
- Estimation de la croissance *via* le logiciel d'analyse d'images SAMBA™.

Lors de chaque filtration (tous les 2 à 3 jours), une maille de tamis non sélective, c'est-à-dire retenant l'ensemble des larves, a été utilisée permettant ainsi de conserver l'ensemble de la variabilité de taille. Durant les 42 jours d'élevage larvaire, la température de l'eau a régulièrement été relevée afin de maintenir une différence de température d'au moins 6°C entre les salles d'élevage. De plus, un prélèvement quotidien de larves a également été effectué afin d'en mesurer la taille moyenne et ainsi adapter la ration trophique. Pour les analyses ADN, des échantillonnages ont été réalisés : les larves prélevées ont été conservées dans de l'éthanol à 70% et stockées à température ambiante.

II.4. Fixation

Quelques jours avant la fin de la phase larvaire, l'organe sensoriel des larves apparaît sous forme d'un point noir ou « œil » correspondant à un épaissement de l'épithélium de la cavité branchiale. Ensuite, ces larves, dites « œillées », développent un pied qui leur permettra de se fixer sur un substrat propice. Celles-ci mesurent alors environ 300-350 μm et caractérisent le stade pédivéligère. Lorsqu'elles ont atteint ce stade, la fraction de la population retenue sur un tamis de 220 μm est placée en micro-nurserie pour fixation. Les larves sont alors disposées dans des tamis de 150 μm , dont le fond est tapissé de microbrisure de coquilles d'huîtres, constituant un substrat adéquat pour se fixer.

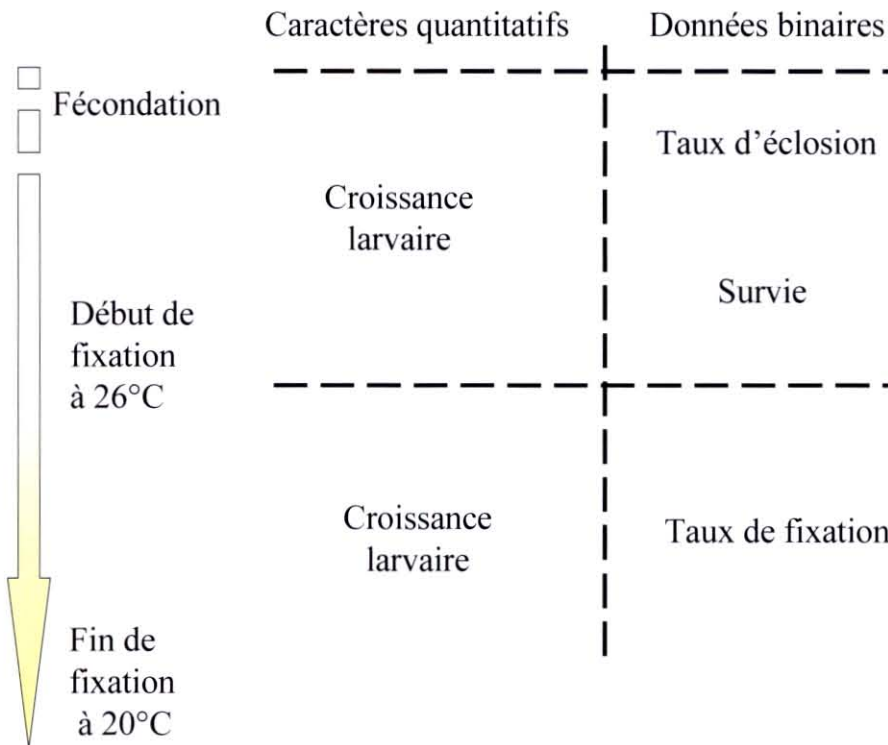
Chaque cohorte de fixation est ainsi dirigée vers la micro-nurserie et disposée dans des tamis avec un effectif maximal de 50000 individus par tamis. Ces tamis sont disposés dans des raceways dont l'alimentation est assurée par un flux continu d'eau de mer filtrée et enrichie en phytoplancton.

Environ 10 jours après la fixation, une estimation de l'effectif du naissain a été réalisée (Ernande *et al.*, 2003). Une règle de trois est réalisée à partir du poids total de la cohorte et du poids moyen de 3 échantillons dont les effectifs sont mesurés. Enfin, l'ensemble des cohortes a été réduit à un effectif de 5000 individus par tamis pour éviter un impact sur la vitesse de croissance liée à la densité des individus dans chaque tamis. En comparant le nombre de juvéniles fixés au nombre de larves placées en micro-nurserie, le succès à la métamorphose est calculé. Ce matériel biologique sera exploité pour des analyses ultérieures.

II.5. Mesures individuelles des larves

Les larves prélevées pour les analyses ADN larves ont été individualisées à l'aide d'une pipette puis mesurées précisément (dixième de micron) grâce à un projecteur de profil (Nikon) équipé de vis micrométriques. Ensuite, ces larves ont été placées dans 3 μ L d'éthanol à 70% dans l'attente de l'extraction de l'ADN.

Les différents paramètres mesurés durant les phases d'élevage larvaire et de micro-nursage sont résumés par le schéma suivant :



II.6. Protocole d'extraction de l'ADN et de PCR

II.6.1. Extraction d'ADN

Un protocole d'extraction de l'ADN à « haut débit » a été mis au point selon le protocole suivant :

1. Individualisation des larves sur plaques PCR de 96 tubes
2. Pour chaque échantillon, ajout de 30 μ L de tampon d'extraction composé de Buffer PCR sans MgCl₂ 10X (1 mL - Fermentas), 0.1% de Tween 20 (50 μ L - Promega) et d'eau distillée qsp 15mL.
3. Passage au thermocycleur : 1 heure à 55°C et 20 minutes à 100°C.

L'ADN ainsi obtenu est directement utilisable pour effectuer l'étape d'amplification ou PCR (Polymerase Chain Reaction).

II.6.2. L'amplification par PCR en multiplexage

La PCR en multiplexage est une variante de la PCR dans laquelle deux ou plusieurs loci sont amplifiés simultanément. La principale difficulté rencontrée lors du protocole est la non amplification de certains loci. Cela est principalement dû à deux paramètres : la concentration en primers ou amorces et la température d'annealing³ (Henegariu *et al.*, 1997). De plus, de part le fardeau génétique mis en évidence chez *C. gigas* (Launey *et al.*, 2001), le site peut aussi être affecté par une mutation ne permettant pas l'amplification du locus. Des tests ont été entrepris dans le but de déterminer le volume de réaction, la concentration de primers et la température d'annealing optimaux. L'ensemble du protocole expérimental final fait l'objet de la rédaction d'une note technique actuellement soumise. Celle-ci est reportée en annexe et comporte des références bibliographiques justifiant l'utilisation de microsatellites, comme marqueurs moléculaires, pour réaliser les analyses de parenté.

A l'issue du protocole d'extraction, la quantité d'ADN n'est pas suffisante pour assurer directement le génotypage. C'est pourquoi l'étape d'amplification par PCR en multiplexage des loci concernés est nécessaire afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante sur laquelle les analyses des microsatellites pourront être effectuées. Un volume de 1.2µL de chaque échantillon d'ADN est mélangé à 13.8µl d'un « mix de PCR » (tableau 2).

Multiplex 4 couleurs	1 éch. Volume en µL	[C] finale	96 éch. Volume en µL
Buffer 10x	1,5	1x	144
dNTP (2mM)	1,5	0,2mM	144
MgCl2 (25mM)	1,2	2mM	115,2
Primers Mix	1,44		138,24
<i>cg49 R+F (0,18+0,18) NED⁴</i>	0,36	0,15µM	34,56
<i>cg108 R+F (0,36+0,36) FAM</i>	0,72	0,3µM	69,12
<i>110 R+F (0,18+0,18) HEX</i>	0,36	0,15µM	34,56
Taq polymérase	0,3		28,8
H₂O	7,86		754,56
ADN	1,2		
Total	15		1324,8

Tableau 2 : Composition du Mix PCR en multiplexage

³ Température à laquelle l'hybridation entre l'amorce et le brin d'ADN est possible.

⁴ NED (noir), FAM (bleu) et HEX (vert) sont les 3 fluorochromes des amorces utilisées pour le génotypage.

Une fois l'échantillon d'ADN ajouté au Mix, le cycle de PCR en multiplexage se déroule comme suit :

- (1) Phase de dénaturation initiale de l'ADN (5 min)
 - (2) Phase de dénaturation de l'ADN (1 min)
 - (3) Phase d'Annealing ou de liaison des amorces (1 min)
 - (4) Phase de polymérisation en chaîne de l'ADN (1 min)
 - (5) Phase d'élongation terminale (30 min) : évite la formation de chaînes poly A (Fishback *et al.*, 1999)
- } X 30 cycles

II.6.3. Choix des marqueurs microsatellites

Plus d'une centaine de marqueurs microsatellites sont désormais disponibles chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Magoulas *et al.*, 1998 ; Huvet *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2003 ; Sekino *et al.*, 2003). Notre choix s'est porté sur CG49, CG108 (Magoulas *et al.*, 1998) et L10 (Huvet *et al.*, 2000), car ceux-ci sont particulièrement polymorphes (41, 41 et 40 allèles*/locus respectivement ; Huvet *et al.*, 2004) Des amorces* spécifiques à ces loci ont été utilisées pour la PCR en multiplexage (tableau 3).

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

Tableau 3 :Description des amorces de PCR

II.6.4. Génotypage

Afin de réaliser le génotypage des larves d'huîtres aux trois loci considérés, 1 µL de produits de PCR de chaque échantillon est mélangé avec 12µL de formamide et 0.25µL de standard de taille Genescan™ ROX™ (Applied Biosystems). Toutes les analyses ont été réalisées sur un séquenceur à capillaires de type ABI PRISM 3100 *Avant* (Applied

Biosystems) utilisant du polymère POP4 et un jeu de 4 capillaires de 36 cm. Des conditions ont été respectées afin de limiter la variabilité du génotypage entre les « runs ». La salle a été maintenue à 23°C car une variation de température d'au moins 5°C affecte significativement les résultats (Issaq *et al.*, 2000), la température de fonctionnement du laser et le voltage appliqués lors de l'électrophorèse étaient respectivement de 60°C et 15kV. Enfin, les données brutes ont été collectées *via* le logiciel Foundation Data Collection v2.0 (Applied Biosystems).

II.7. La catégorisation des groupes d'allèles ou « Binning »

Afin, de caractériser et de corriger les groupes d'allèles, c'est-à-dire de ne retenir que les allèles parentaux qui apparaissent dans le génotype des larves, puis d'assigner chaque larve à un couple de parents de manière exacte, l'étape de Binning est indispensable. L'utilisation du logiciel GENEMAPPER® permet de déterminer les allèles réellement transmis à la descendance, tout en occultant les artéfacts de lecture sur chaque électrophérogramme et les variabilités observées entre chaque « runs » d'analyse microsatellite. Chaque allèle se caractérisera par une taille en paires de bases et désigné par un nombre entier. L'utilisation du logiciel se décompose selon les étapes suivantes :

1. Importation des données brutes obtenues grâce au séquenceur à capillaires ABI Prism 3100 *Avant*
2. Création d'un Panel comportant des « Bins de référence⁵ », un jeu de données références (profils microsatellites des parents utilisés lors du croisement) et les caractéristiques des marqueurs utilisés (gamme de taille et couleur des marqueurs CG49, CG108 et L10).
3. Création d'un standard de taille
4. Définition d'une méthode d'analyse
5. Analyse des profils bruts avec la méthode précédemment définie
6. Exportation de la table de données vers le logiciel Microsoft Excel

⁵ Ces bins sont des segments de taille insérés manuellement et définissant un allèle. Ils sont définis par une taille et un intervalle de confiance. Le logiciel ne peut définir des allèles que lorsque les pics des microsatellites se superposent aux « bins de référence ».

Cependant, les tailles d'allèles déduites par l'analyse ne sont pas toutes exactes et doivent être corrigées manuellement. Lorsque l'ensemble du jeu de données est corrigé, son exportation est alors possible afin de réaliser l'assignation de parenté.

II.8. Assignation de Parenté

Le développement de marqueurs moléculaires hypervariables, tels que les microsatellites utilisés lors d'analyses de parenté au sein de populations naturelles ou expérimentales, se généralise en aquaculture (Jerry *et al.*, 2004). Il existe une liste non exhaustive de méthode d'analyse de parenté que Jones et Ardren (2003) passent en revue. Trois principales méthodes d'analyse de parenté se dégagent :

- Méthode d'exclusion
- Allocation catégorique
- Allocation fractionnée

La **méthode d'exclusion** utilise les incompatibilités entre parents et descendance, et rejette l'hypothèse qu'un individu est issu de ce couple de parents. Par exemple, si une mère et sa descendance possèdent respectivement les génotypes diploïdes A/A et A/B, alors les mâles dont le génotype est A/C sont exclus de l'hypothèse. Cette technique est avantageuse lorsqu'un petit nombre de parents sont candidats à l'assignation et un nombre conséquent de marqueurs moléculaires très polymorphiques sont disponibles (Jones et Arden, 2003). Cependant, cette méthode est inadaptée lorsque le pool de parents potentiels est très large. Dans ce dernier cas, une simple erreur de génotypage suffit à exclure un parent.

Puisque la méthode d'exclusion n'est pas adaptée à tous les cas de figure, d'autres méthodes ont été développées afin d'assigner la descendance. L'allocation catégorique et l'allocation fractionnée pallient aux limites de la méthode d'exclusion. Plus précisément, **l'allocation catégorique** repose sur une approche du maximum de vraisemblance afin de déterminer le parent le plus probable parmi un pool de parents. Cette méthode implique de calculer le logarithme de rapport de vraisemblance ou LOD score. Ce LOD score correspond à la vraisemblance d'un individu ou d'un couple à être le ou les parents de l'individu que l'on cherche à assigner. Il existe différentes formulations du LOD score selon les connaissances que l'on possède sur le génotype des parents (identification d'un des deux parents lorsque l'autre est connu ou identification du couple de parents).

Cette méthode s'avère plus souple vis à vis des erreurs de génotypage, aux mutations ou la présence d'allèles nuls, car un parent n'est pas directement exclu si son génotype n'est pas correct.

L'autre méthode d'assignation est l'**allocation fractionnée**. Cette méthode assigne des fractions comprises entre 0 et 1 de chaque descendant sur un pool de parents candidats. La proportion d'un descendant alloué à un parent est proportionnelle à la vraisemblance de parenté de ce descendant comparée à celle de tous les autres parents candidats. La vraisemblance d'un parent ou d'un couple de parent est calculée selon la même méthode que l'allocation catégorique.

Dans le cadre de notre étude, le génotype complet des parents aux trois loci considérés est connu. Grâce au guide établi par Jones et Ardren (2003), notre choix s'est porté sur le logiciel PAPA⁶ (**PA**rentage **PA**ir **A**llocation) car il apparaît comme le plus adapté puisqu'il utilise l'allocation catégorique, permet un contrôle sur les erreurs de transmission de valeurs alléliques et considère les allèles nuls comme une quelconque mutation (Duchesne *et al.*, 2002). En effet, concernant les erreurs de transmission, deux paramètres sous contrôle sont disponibles. Il s'agit, tout d'abord, du niveau global d'erreur « e » considéré comme la somme de toutes les probabilités qu'un allèle « a » transmis devienne « b » suite à une mutation ou une erreur de génotypage. Il existe donc une probabilité (1-e) que l'allèle « a » reste « a » au sein de la descendance après sa transmission par un parent et son génotypage. « e » appartient à l'intervalle [0 ; 0.1].

L'autre paramètre « S » contrôle la distribution de l'erreur qui se définit comme la vitesse de perte de probabilité d'erreur vis-à-vis des allèles voisins. Soit l'allèle parental « a », la probabilité d'erreur de l'attribuer à « b » est proportionnelle à $1/D^S$ où D est égal à $|a-b|$. Lorsque S est élevé, seuls les allèles proches de « a » seront recherchés comme porteurs potentiels de l'erreur de génotypage ou de mutation.

De plus, l'excellente interface et la facilité d'utilisation de PAPA constitue un atout majeur comparativement aux autres logiciels d'assignation de parenté

II.9. Analyses statistiques

L'ensemble des tests statistiques de cette étude sont réalisés grâce au logiciel de programmation SASTM.

⁶ http://www.bio.ulaval.ca/louisbernatchez/downloads_fr.htm

II.9.1. Taux d'éclosion

Le taux d'éclosion pour chaque femelle, chaque mâle et de chaque couple a été déterminé selon la formule suivante : Nombre d'ovocytes fécondés observés / Nombre total d'ovocytes. Des comparaisons de ces taux ont été réalisées par régression logistique pour des données binomiales sous le logiciel SAS[®] (SAS Institute Inc., 1989, procédure GENMOD, model nbfinal/nbinit, avec transformation Logit correspondante, (Littell *et al.*, 2002)). La régression logistique et les méthodes associées, comme l'analyse Probit, sont en effet très utiles lorsque nous souhaitons comprendre ou prédire l'effet d'une ou plusieurs variables sur une variable à réponse binaire.

II.9.2. Croissance larvaire

A chaque jour d'élevage, un prélèvement a été effectué afin d'estimer la taille et le taux de croissance actuels des larves. Afin de mettre en évidence une différence de diamètre maximum entre les deux conditions, les valeurs obtenues ont été transformées en données logarithmique (\log_{10}) dans le but d'augmenter la normalité des données et l'homoscédasticité des variances. Les données de croissance ont d'abord été traitées par analyse de covariance (ANCOVA) pour déterminer l'effet global de la température (procédure GLM de SAS[®]). En effet, dans notre cas, l'ANCOVA a pour but de tester les effets d'une variable quantitative (temps) et d'une variable qualitative (température) sur une variable quantitative (diamètre des larves).

Modèle: $\text{Log}(\text{diamètre max}) = \text{trait repl}(\text{trait}) \text{ jour jour} * \text{trait jour} * \text{repl}(\text{trait})$

(trait= traitement (température), repl=réplikat, jour=date)

Dans un second temps, une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée (procédure GLM de SAS[®]). Contrairement à l'ANCOVA, l'ANOVA nous permet de tester l'effet de la température d'élevage sur le diamètre des larves et ceci pour chaque jour afin de déterminer la date, à partir de laquelle, il existe une différence significative de diamètre entre les deux conditions.

Modèle: $\text{Log}(\text{diamètre max}) = \text{trait repl}(\text{trait})$

II.9.3. Survie larvaire

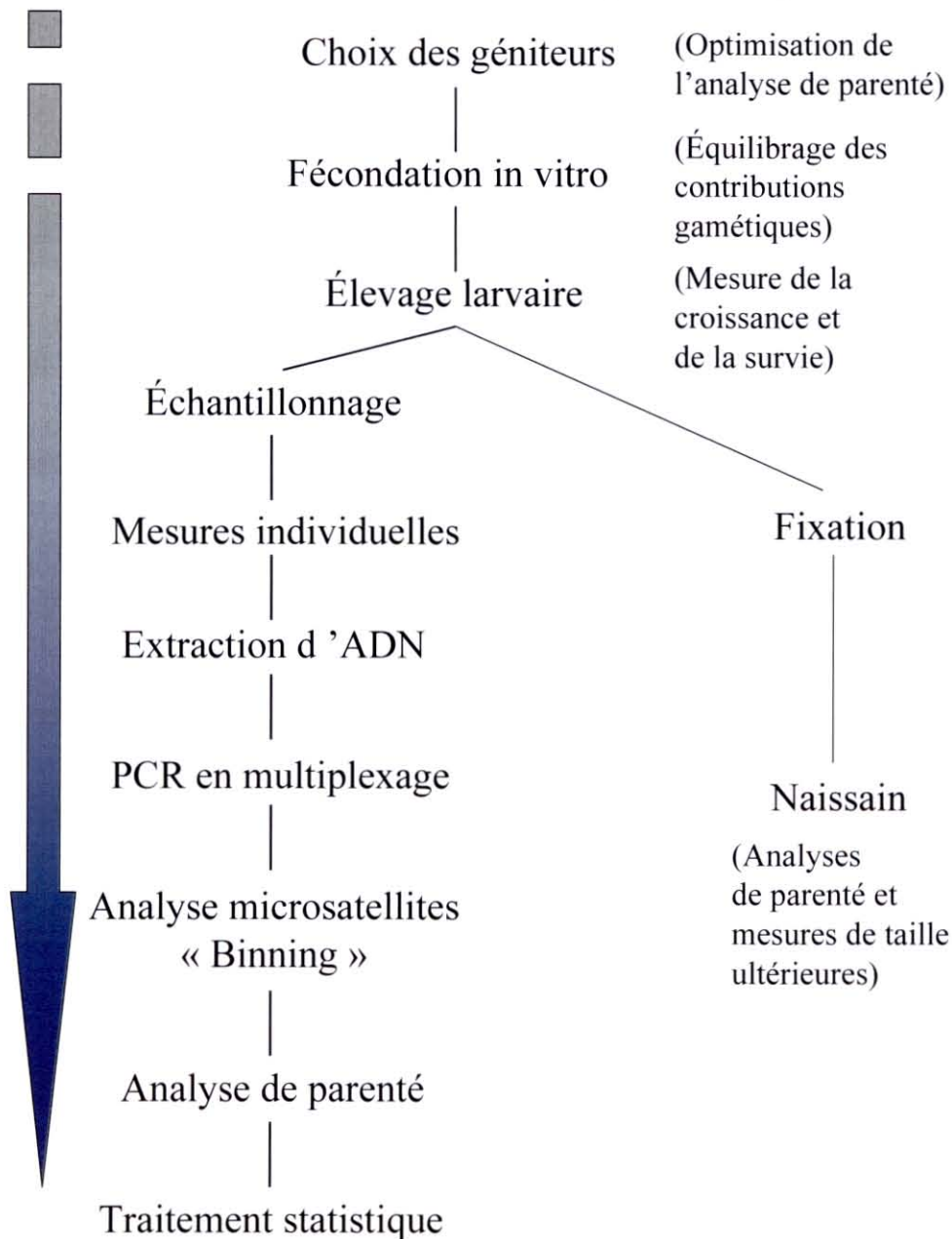
Les données de survie larvaire ont été analysées par régression logistique pour des données binomiales (procédure GENMOD, modèle nbfinal/nbinit, transformation Logit). Selon ce modèle, le nombre initial correspond au nombre d'individus à J3 (date à laquelle une remise à densité dans chaque lot a été effectuée pour obtenir le même effectif par lot). Le

nombre “final” correspond au calcul du nombre d’individus pour les autres jours (de J6 à J20).

II.9.4. Composition de la population à J22

Afin d’estimer la composition de la population lors de l’échantillonnage, l’effectif des descendants de chaque géniteurs a été déterminé. C’est par l’intermédiaire d’un G-Test (Procédure ProcFreq sous SAS) que les analyses statistiques de composition de la population ont été menées.

Le schéma suivant résume le déroulement global de l’expérience :



III. Résultats

III.1. Taux d'éclosion

Une fois le comptage réalisé, les résultats obtenus sont les suivants (voir figure 3) : pour les mâles, les taux d'éclosion sont compris entre 66.22% et 75.78% et pour les femelles, ces taux sont compris entre 27.77% et 84.43%.

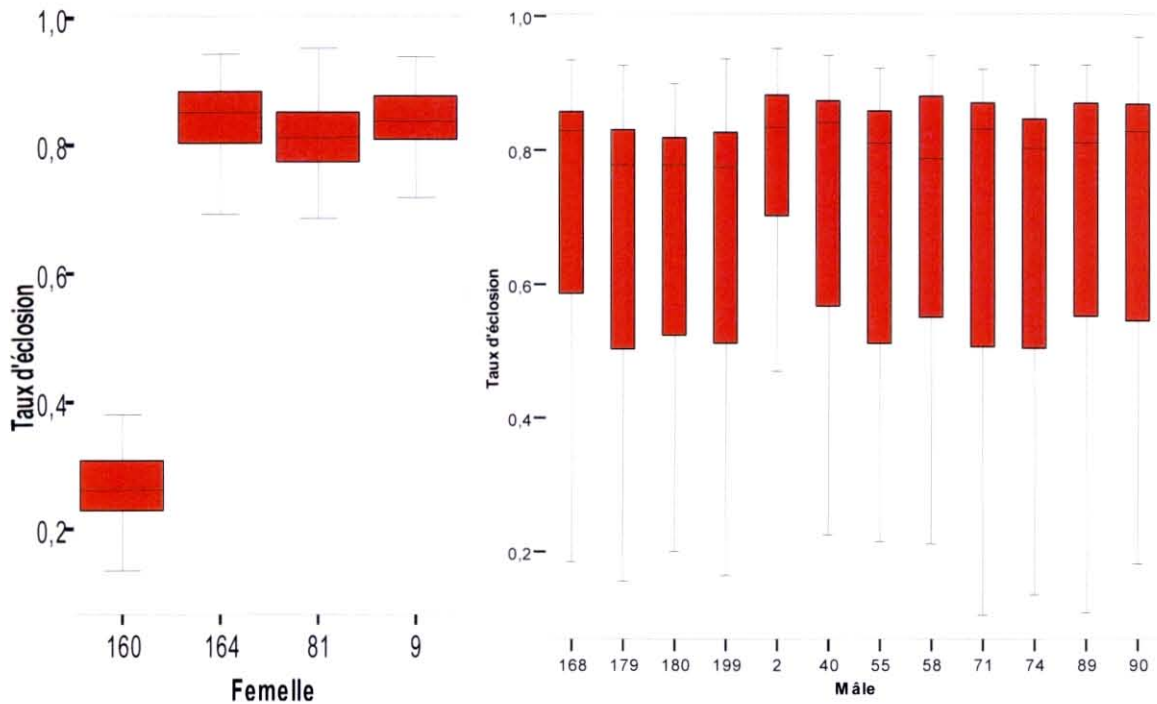


Figure 3 : Représentations en Box plots* des taux d'éclosion des géniteurs.

Parmi les quatre femelles, l'une des trois présente un taux d'éclosion anormalement bas. Ceci est confirmé par l'analyse statistique ($\chi^2=5037.50$, $p<.0001$). De même, il existe une différence significative entre les mâles ($\chi^2=86.23$, $p<.0001$) et entre les familles ($\chi^2=6545.83$, $p<.0001$). Si l'on se réfère aux taux d'éclosion habituellement observés à l'écloserie de La Tremblade ($59,2\pm 3.2\%$ entre 1992 et 1996 ; Robert *et al.*, 1999), les valeurs obtenues pour cette expérience sont relativement élevées, à l'exception de la femelle 160, créant un déséquilibre dans l'effectif des descendants.

III.2. Génotypage et assignation de la génération F1

Après les mesures individuelles des larves, il était initialement prévu de déterminer le génotype de 288 larves par réplicat (c'est à dire 3 plaques de 96 puits), soit un total de 1728 larves d'huîtres. L'objectif a été presque atteint avec 1716 larves génotypées pour les 3 marqueurs microsatellites. Suite à cette étape, des données ont été éliminées, car pour certains individus, l'assignation fut ambiguë. Au final, ce sont **80% des larves** (1359/1716) qui ont été assignées de façon non ambiguë à un seul couple de parents. Les 20% non assignés sont imputables à des difficultés d'amplification de l'ADN, des erreurs de génotypages.

III.3. Croissance larvaire

Dès le premier jour d'élevage, la température influence de manière significative le taux de croissance larvaire ($F=663.60$, $P<0.0001$). Durant l'élevage larvaire, le diamètre moyen des larves placées à 26°C a toujours été supérieur à celui des larves placées à 20°C (Figure 4). Cela est confirmé par l'analyse de covariance. En effet, il existe un **effet significatif du traitement sur le taux de croissance larvaire** sur l'ensemble de la période d'élevage ($F=4.69$, $P<0.0001$).

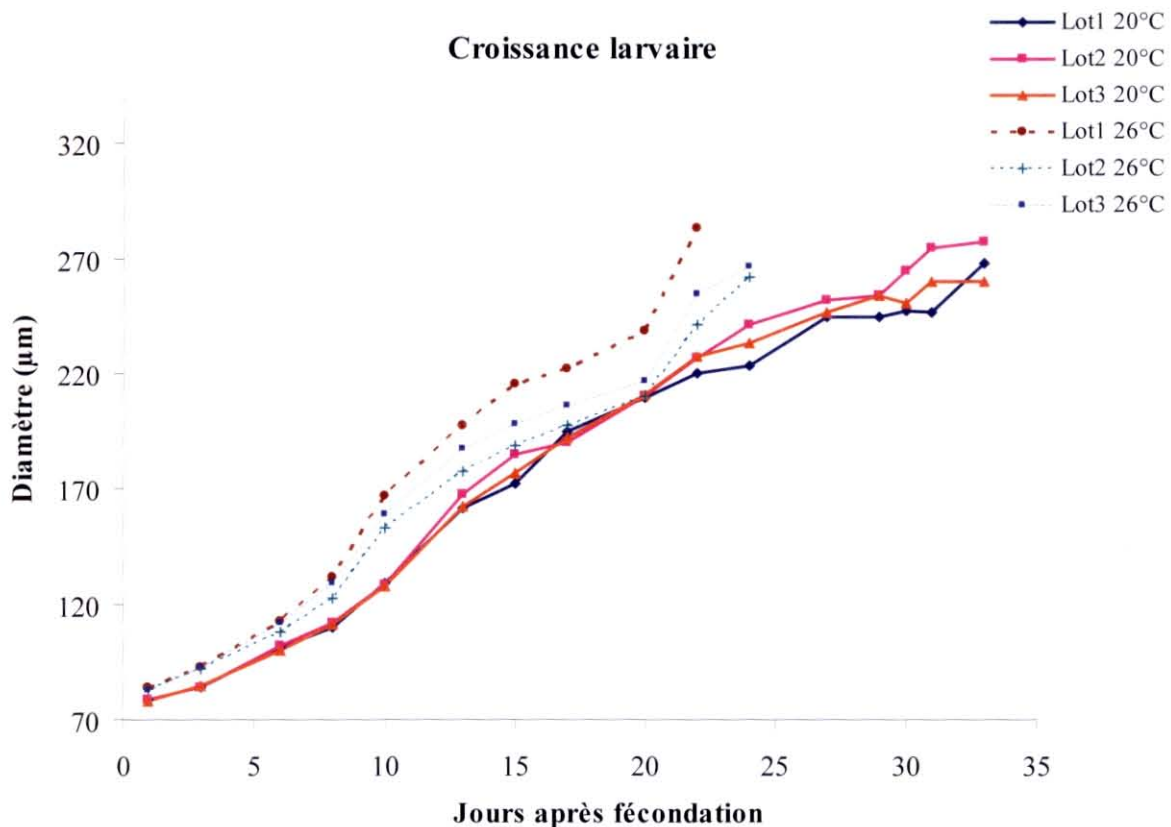


Figure 4 : Evolution du diamètre maximum des larves par réplicat selon chaque condition.

Source	DDL	Carré Moyen	F	P
Effet Mâle sur la croissance	11	2,4739	0,92	NS
Effet Femelle sur la croissance	3	6,479	1,99	NS
Effet Famille sur la croissance	32	1,2161	1,33	NS
Différence entre Traitements	1	53,5913	4,69	**
Différences entre Réplicats	4	16,4917	25,06	***
Interaction Mâle - Traitement	11	2,6756	5,3	*
Interaction Femelle - Traitement	3	3,1	4,56	*

NS= $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$

Tableau 4 : Résultats de l'analyse de variance

En ne considérant que les mâles, aucun « effet mâle » sur les tailles des larves n'est observé (figure 5). En effet, les tailles moyennes des larves issues de chaque mâle sont significativement différentes ($P=0.5467$). Cependant, l'interaction température – mâle est significative ($P=0.0210$) : selon le traitement, les mâles produisent des larves de taille significativement différentes. De même, les femelles ont été traitées séparément. Aucun « effet femelle » sur la taille moyenne des larves n'est mis en évidence ($P=0.2740$, figure 6). Cependant, l'interaction température - femelle est significative ($P=0.0476$). De plus, l'analyse de variance met en évidence des différences significatives de taille moyenne des larves entre réplicats (Tableau 4).

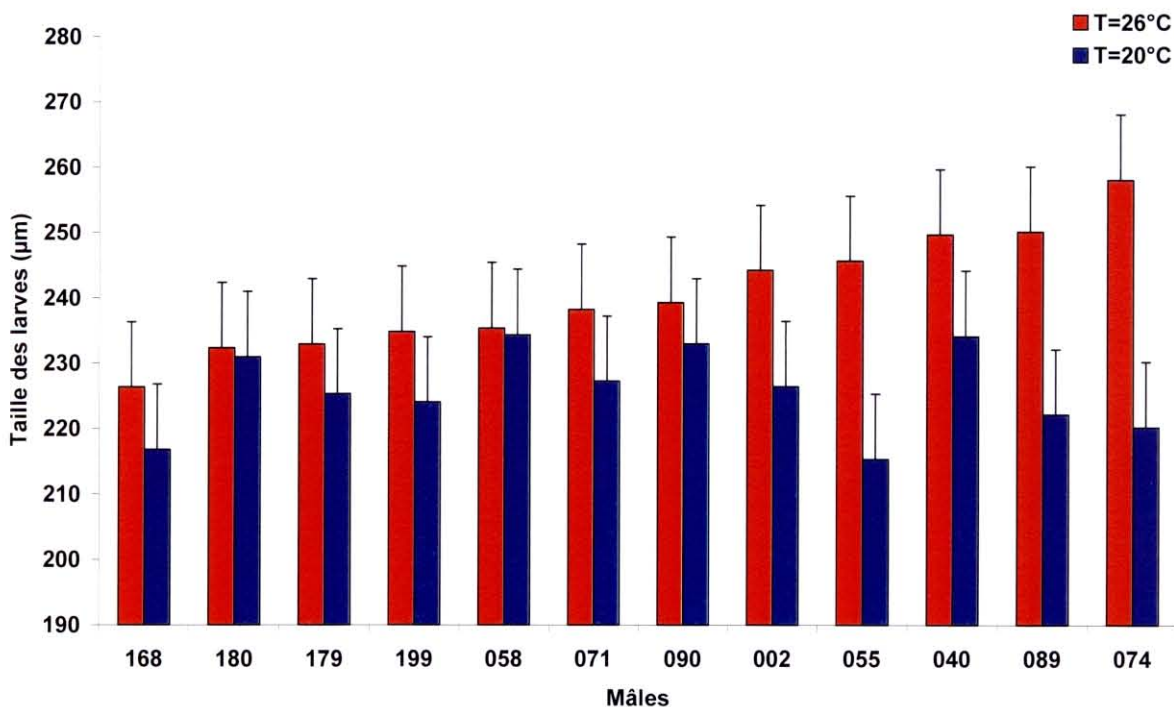


Figure 5: Représentation graphique de la taille moyenne des larves issues de chaque mâle selon la condition d'élevage.

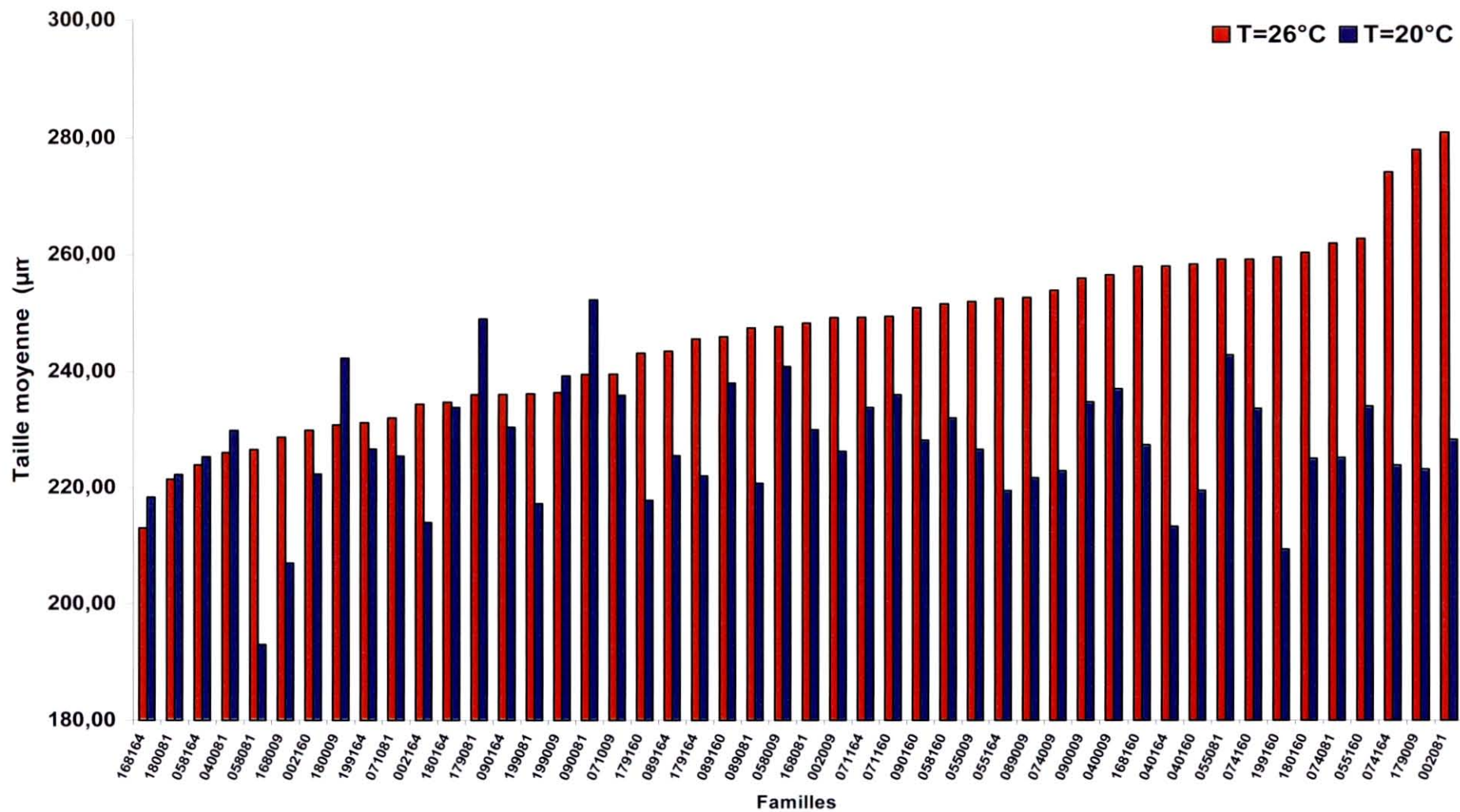


Figure 7 : Représentation graphique des tailles moyennes des larves pour chaque famille et pour chaque traitement, classées par ordre croissant de taille pour la condition T=26°C. Chaque famille est caractérisée par un nombre à 6 chiffres : les 3 premiers correspondent au mâle et les 3 derniers correspondent à la femelle.

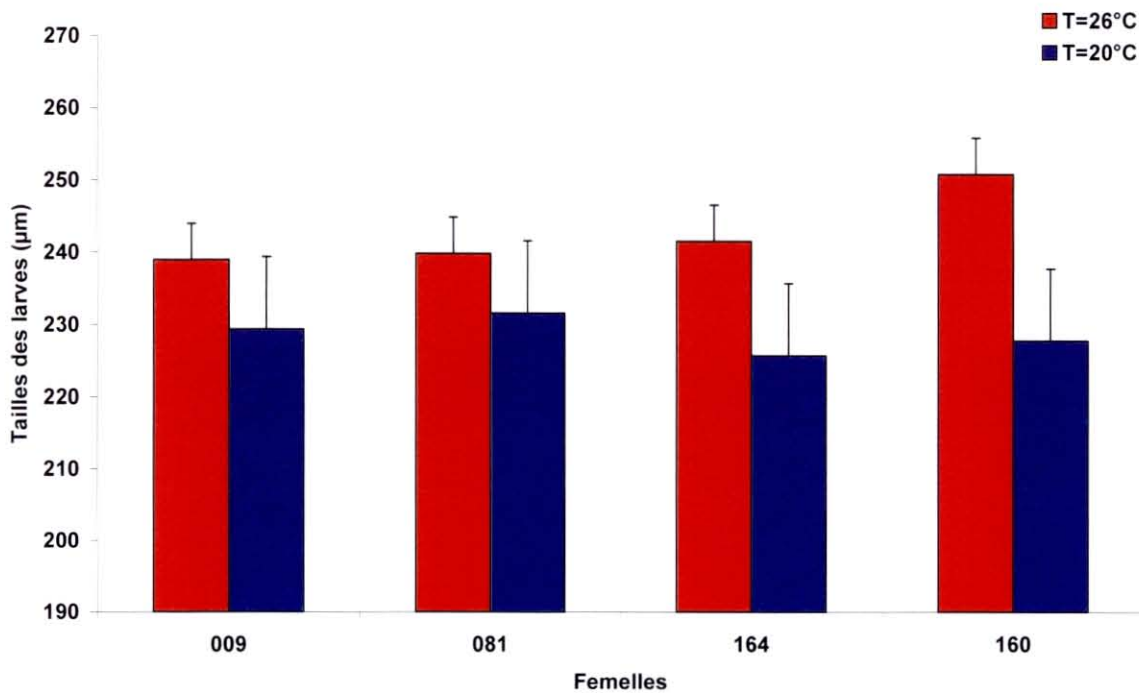


Figure 6 : Représentation graphique de la taille moyenne des larves issues de chaque femelle selon la condition d'élevage.

Enfin, l'analyse de variance nous confirme qu'il n'existe pas de différence significative de taille moyenne des larves entre les 48 familles ($P=0.2084$, figure 7).

Analyse des données par traitement

En analysant séparément les données de chaque traitement, des différences significatives de croissance larvaire ont été observées. En effet, pour le traitement (2)- $T=26^{\circ}\text{C}$, il existe un effet mâle ($P=0.0107$) et un effet femelle ($P=0.0298$) sur la croissance larvaire mais aussi des différences significatives de taille des larves entre réplicats ($P=0.0007$). Cependant, à 20°C (traitement 1) aucun de ces effets n'est significatif.

III.4. Survie larvaire

Les données de survie larvaire ont été analysées par régression logistique pour des données binomiales (procédure GENMOD, modèle nbfinal/nbinit, transformation Logit). Selon ce modèle, le nombre initial correspond au nombre d'individus à J3 (qui est considéré comme jour initial à cause de la remise à densité effectuée). Le nombre "final" correspond au calcul du nombre d'individus pour les autres jours (de J6 à J20). Il existe un effet significatif de la température sur la survie visible à J8 ($P=0.0107$), J10 ($P=0.0322$) et surtout à J20 ($P=0.0020$).

III.5. Composition de la population à J22

L'échantillonnage des larves a été réalisé au 22^{ème} jour d'élevage c'est-à-dire avant que les larves les plus précoces ne commencent à fixer. C'est par l'intermédiaire d'un G-Test (Procédure ProcFreq sous SAS) que les analyses statistiques de composition de la population ont été menées (Tableau 6).

Source	DDL	χ^2	P
Déséquilibre entre Mâles	11	76,973	***
Déséquilibre entre Femelles	3	224,311	***
Déséquilibre entre Familles	47	464,207	***
Interaction Mâles - Traitement	11	32,701	***
Interaction Femelles - Traitement	3	23,486	***
Interaction Familles - Traitement	47	95,164	***

NS=P>0.05 ; * P<0.05 ; ** P< 0.01 ; *** P<0.001

Tableau 6 : Résultats du G-Test sur la composition de la population à J22

Dans chacune des conditions, l'effectif attendu des descendants (Na) pour chaque mâle est égale à 1/12 (soit 8.33% des descendants) dans l'éventualité où les taux d'éclosion de ces mâles étaient égaux. Or ce n'est pas le cas (P<0.0001). En terme d'effectifs de descendants, il existe donc des **différences significatives de contribution des mâles et des femelles à J22**. Nous constatons un déséquilibre de contribution des mâles (5.94 à 13.51%) et des femelles (9.73 à 38.31%) qui entraîne un déséquilibre de contribution entre les familles (0.37 à 6.61%). Les **interactions mâles – traitement et femelles - traitement sont significatives** ce qui induit **des interactions familles - traitement également significatives**. Ceci signifie que certains mâles et certaines femelles ou certaines familles ont plus de descendants à J22 dans une condition que dans l'autre. Par exemple, le mâle 90 génère, à lui seul, 17.35% des descendants à 20°C, alors qu'il ne génère que 9.8% de ces derniers à 26°C. Ce déséquilibre a des conséquences sur la contribution des familles entre les deux traitements (figure 8). En effet, la famille 32 (mâle 90 x femelle 164) génère, à elle seule, 11.01% de la population à 20°C mais 2.34% à 26°C.

Il est donc nécessaire de pondérer l'effectif observé des descendants (No) par le taux d'éclosion afin de corriger cet effectif et de comparer correctement l'effectif observé des descendants entre les mâles et entre les traitements. Il existe une différence entre l'effectif attendu de descendants et l'effectif observé de descendants pour chaque mâle dans les deux traitements (Figure 8).

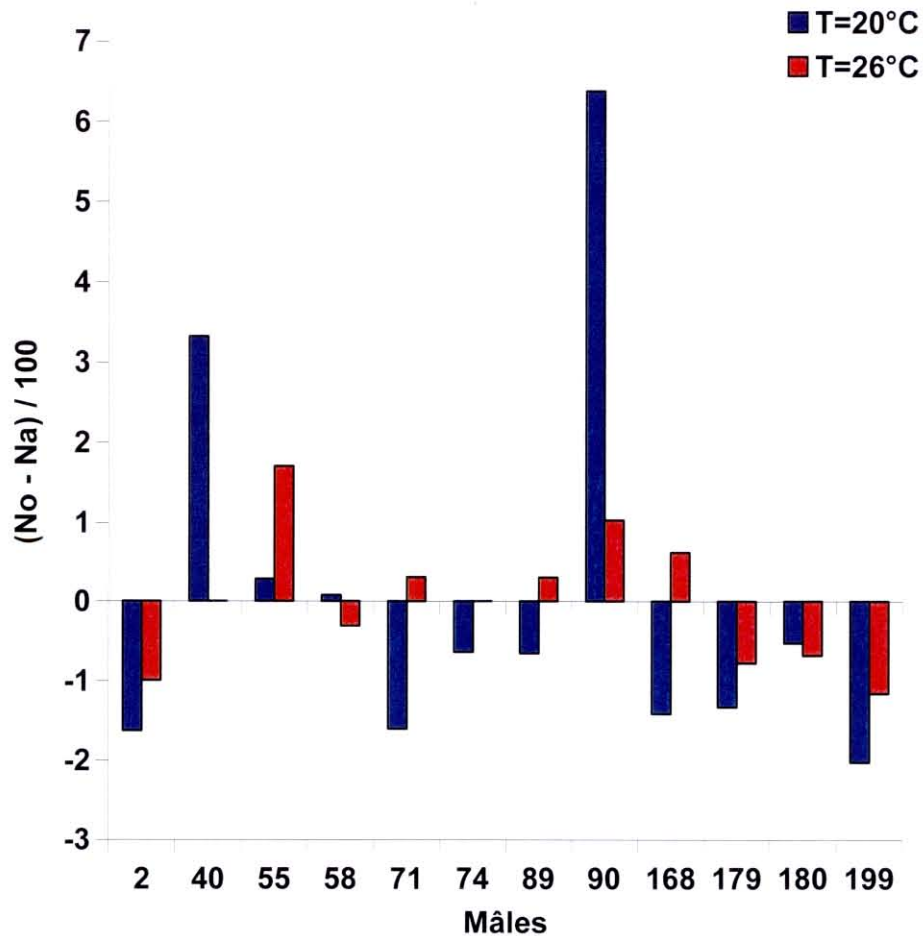


Figure 8: Représentation graphique de la différence entre la proportion attendue de descendants (N_a) et la proportion observée de descendants (N_o) pour les mâles, dans la composition de la population à J22.

Par exemple, pour le mâle 90, la proportion observée de ses descendants est supérieure à celle attendue pour les deux traitements. Par contre, pour le mâle 2, la proportion observée de ses descendants est inférieure à celle attendue pour les deux traitements.

IV. Discussion

DEROULEMENT DE L'ELEVAGE LARVAIRE

La première étape de cette étude était de mener un élevage larvaire sous deux conditions de température (20 et 26°C) afin d'induire des différences sur les caractères suivis (survie et croissance, figure 2). Suite au croisement factoriel entre 4 femelles et 12 mâles, le taux d'éclosion moyen a été relativement bon (69.5%) puisque supérieur à ceux habituellement observés au sein de l'écloserie de La Tremblade (moyenne de $59.2 \pm 3.2\%$ entre 1992 et 1996, Robert *et al.*, 1999). Dans notre étude, seule la femelle 160 a présenté un faible taux d'éclosion (27.8%). Ce résultat suggère une mauvaise qualité des gamètes produits par cette femelle plutôt qu'un effet génétique. En effet, le taux d'éclosion est essentiellement déterminé par la qualité et la quantité de réserves conditionnées pendant la période de maturation (Collet, 1998). En conséquence, le taux de fécondation moyen, relativement constant pour les mâles, varie fortement en fonction des femelles (figure 3).

Suite à cette reproduction, les croissances larvaires observées ont été plus lentes qu'attendues. Il est généralement admis que la phase larvaire dure entre 15 et 28 jours pour des températures comprises entre 20 et 26°C (Héral *et al.*, 1991). Par exemple, Collet *et al.* (1999) ont obtenu des fixations dès le 17^{ème} jour d'élevage à une température de 23°C. Lorsque les conditions sont moins favorables, cette phase larvaire peut atteindre 76 jours en écloserie pour une température de 14°C (Taris, N., com. pers.). Dans notre expérience, en dépit de la température élevée, les larves placées à 26°C ont fixé plus tard que ce qui était attendu. En effet, ce n'est qu'à partir du 23^{ème} jour d'élevage que ces larves ont commencé leur métamorphose. Le même constat a été effectué pour les larves placées à 20°C qui se sont fixées à partir du 34^{ème} jour. Cette métamorphose tardive n'a pas affecté la taille des larves à métamorphose (environ 300 à 380µm, Dégremont, 2003). Nous pouvons supposer que la ration alimentaire a peut être été limitante, ralentissant ainsi la vitesse de croissance des larves notamment à J7 et J19, qui correspondent aux changements de ration alimentaire (voir tableau 1). Cette hypothèse est renforcée par la différence significative de diamètre maximum des larves qui existe entre les deux conditions notamment à J8 et J20 ($P=0.0107$ et $P=0.002$). Ces dates correspondent à une nette reprise de la croissance des larves à 20 et 26°C suite au passage à la ration alimentaire supérieure. Malgré la ration alimentaire supposée limitante à certains instants de l'élevage, une nette différence de croissance et d'âge à la métamorphose a été observée entre les deux traitements, permettant d'étudier les interactions génotype – environnement dans ces deux environnements.

GENOTYPAGE ET ASSIGNATION DE PARENTE

Suite à l'échantillonnage de larves effectué au 22^{ème} jour d'élevage et l'extraction d'ADN, l'étape de génotypage à « haut débit » a été réalisée. Les génotypes obtenus, par analyse sous GENEMAPPER®, ont été corrigés manuellement car ils comportaient encore de nombreuses erreurs. Les sources d'erreurs possibles sont diverses, particulièrement pour des analyses sur des larves pour lesquelles l'ADN est extrait à partir de l'individu entier avec sa coquille. Tout d'abord, un ADN de mauvaise qualité est difficilement amplifiable par PCR, particulièrement en multiplexage. Parfois, l'ADN n'est pas accessible car l'étape d'écrasement de la coquille de la larve n'a pas été correctement effectuée (voir annexe 2). Ensuite, lors de la mesure des larves et de leur individualisation, une erreur de manipulation peut avoir pour conséquence l'absence de larve dans le tube donnant *a posteriori* un électrophérogramme vierge (Huvet *et al.*, 2002). Une autre cause possible est un mauvais alignement ou une absence de marqueur de taille sur l'électrophérogramme qui le rend illisible. De plus, certains profils électrophorétiques montraient trois allèles pour un même locus chez un individu hétérozygote : l'explication possible de ces résultats inhabituels est une contamination sporadique entre les extraits d'ADN ou produits de PCR lors de leur manipulation. L'allèle supplémentaire présent mais non transmis est alors défini comme « faux allèle ». Le phénomène de « faux allèles » est dû aux artéfacts de « slippage⁷ » générés durant les premiers cycles de PCR. En effet, si une erreur de réplication intervient dans les premiers cycles de PCR, le fragment néoformé peut être amplifié d'un facteur équivalent aux allèles ciblés (Taberlet *et al.*, 1996). Ensuite, certains profils électrophorétiques présentaient un signal faible pour un locus donné. En effet, la quantité d'ADN total contenu dans une larve d'huître est faible et se situe juste au dessus de la limite de détection des méthodes de quantification employées (dosage par spectrométrie). De plus, à l'issue du protocole d'extraction, l'ADN n'est pas pur mais en solution avec des inhibiteurs de PCR telles que les protéines. Cela constitue une difficulté supplémentaire lors de l'étape de génotypage. Il est alors difficile de catégoriser un allèle lorsque sa faible intensité est confondue avec le bruit de fond inhérent à l'électrophorèse. Les allèles nuls (non détectés en PCR par l'introduction d'une mutation dans la séquence homologue du primer) ont été rapportés comme relativement fréquents chez les huîtres (McGoldrick *et al.*, 2000 ; Huvet *et al.*, 2004). Les géniteurs utilisés pour le croisement, ont été choisis de manière à être le plus hétérozygote possible, les allèles nuls sont, *a priori*, peu présents dans la descendance étudiée (annexe 1).

⁷ Slippage : mutation introduite dans la séquence d'ADN suite à une erreur de réplication due au dérapage de la polymérase

Au final, ce sont 80% des larves qui ont été assignées à un seul couple de parents. C'est en définitive, un bon résultat comparé à ceux obtenu chez d'autres espèces animales (notamment chez les poissons : truites et saumons). Cependant, il n'est pas rare de rencontrer des pourcentages d'assignation plus élevés (tableau 7).

Espèces	Géniteurs (mâles x femelles)	Pourcentage d'assignation	Nb de Loci	Références bibliographiques
Rainbow trout - <i>Oncorhynchus mykiss</i>	2 x 48	93	15	(Fishback <i>et al.</i> , 1999)
red sea bream - <i>Pagrus major</i>	NC*	73	4	(Perez-Enriquez <i>et al.</i> , 1999)
Atlantic Salmon - <i>Salmo solar</i>	2 x 10	98	8	(Norris <i>et al.</i> , 2000)
chinook Salmon - <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	NC*	92	14	(Olsen <i>et al.</i> , 2001)
Pacific oyster - <i>Crassostrea gigas</i>	5 x 5	99.8	1	(Boudry <i>et al.</i> , 2002)
Atlantic halibut - <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	13 x 14	98	5	(Jackson <i>et al.</i> , 2003)
Common Carp - <i>Cyprinus carpio</i>	24 x 10	95,3	8	(Vandeputte <i>et al.</i> , 2004)
Kuruma shrimp - <i>Penaeus japonicus</i>	150 x 30	47	6	(Jerry <i>et al.</i> , 2004)

NC* : non communiqué

Tableau 7: Pourcentages d'assignation chez différents espèces d'intérêt aquacole.

POUVOIR RESOLUTIF DES TROIS LOCI MICROSATELLITES UTILISES

Afin d'optimiser le pourcentage d'assignation, l'utilisation d'un plus grand nombre de loci aurait pu être envisagé. Cependant, notre ensemble de trois marqueurs multiplexés possède un bon pouvoir résolutif pour les analyses de parenté par allocation catégorique. Ce pouvoir résolutif a été testé par l'intermédiaire du logiciel CERVUS (Marshall, 1998) qui simule son utilisation en population naturelle (annexe 2). Les fréquences alléliques de 88 huîtres, échantillonnées en population naturelle, ont été utilisées pour simuler des croisements entre 2 à 100 géniteurs. Selon ces simulations, 60% d'assignation peut être obtenue pour 16 géniteurs tirés au hasard au sein d'une population naturelle. D'autre part, dans un croisement factoriel de 3 femelles par 10 mâles, choisis de manière identique à la présente étude, cet ensemble de marqueurs multiplexés a permis, en théorie 100% d'assignation (Family Assignment Program software, J.B.Taggart, University of Stirling, unpublished) et en pratique, 93% d'assignation (voir annexe 2). Cela démontre que les trois marqueurs utilisés ont, *a priori*, un pouvoir résolutif élevé et que les 20% d'individus non assignés, sont essentiellement dus à des erreurs de manipulations et des incertitudes de génotypage. L'optimisation des différents étapes du protocole reste donc souhaitable, ce qui réduirait le risque de biais lié à l'absence du jeu de données analysées de 20% de la population. Cette optimisation paraît cependant difficile à réaliser sur des larves.

INTERACTION GENOTYPE – ENVIRONNEMENT SUR LA CROISSANCE

Par définition, une interaction génotype - environnement est caractérisée lorsqu'une condition du milieu affecte différenciellement un caractère chez des génotypes et donc que l'écart entre ces génotypes n'est pas le même selon les conditions du milieu. Dans notre expérience, nous observons ce type de phénomène pour les descendants de certains géniteurs notamment ceux du mâle n°74 ou de la femelle n°160. En effet, les larves de ces deux individus présentent des diamètres bien différents (30 à 40 μm) entre les deux traitements. Cependant, un tel écart de diamètre moyen n'est pas constaté pour tous les descendants des géniteurs. Il y a donc clairement une interaction génotype – environnement pour ce caractère. D'autre part, nous remarquons que les effets mâle et femelle sur la taille des larves ne sont pas significatifs à 20°C alors qu'ils le sont à 26°C. Nous pouvons supposer que la variance génétique observée à 26°C ne s'exprime donc pas en milieu naturel, ce qui permettrait plus facilement son maintien. Récemment, Ernande (2003) a proposé deux hypothèses explicatives au maintien d'une telle variabilité génétique pour les caractères précoces chez *C. gigas*. La première hypothèse suppose que des trade-offs⁸ entre caractères induisent le maintien d'un polymorphisme pour des caractères corrélés négativement, et la seconde suppose que le maintien du polymorphisme résulterait de stratégies plus ou moins favorisées sous différentes conditions (variable dans le temps ou dans l'espace). L'existence d'interaction génotype – environnement pour la croissance renforce cette seconde hypothèse. En effet, en milieu naturel, la large dispersion des larves dans différents environnements pourrait permettre le maintien d'un polymorphisme grâce à des interactions entre génotype et environnement. De plus, la très grande fécondité et la dispersion aléatoire des larves, caractérisant l'huître creuse *Crassostrea gigas*, peuvent être considérées comme une stratégie dont l'objectif est de maximiser la fitness* par un niveau de polymorphisme important permettant de « s'adapter » à différents environnements.

D'autre part, en écloséries, dans le but d'homogénéiser les lots, le tamisage des larves est une pratique courante induisant l'élimination des individus à croissance lente. La variabilité génétique pour la croissance larvaire s'exprimant à 26°C (température habituellement appliquée en éclosérie), nous pouvons en conclure que le tamisage peut représenter une pression de sélection significative. De plus, Taris *et al.* (En prep.) ont démontré que ces pratiques de tamisage diminuaient significativement la diversité génétique au sein des populations en élevage. Cette baisse de diversité peut donc s'interpréter comme une contre sélection des génotypes à croissance lente. Il pourrait être intéressant de comparer

⁸ Trade-off: Stratégie d'allocation d'énergie

la croissance larvaire de lots reproduits depuis plusieurs générations en éclosérie à celle d'huîtres « sauvages » afin de tester notre hypothèse de sélection pour la croissance larvaire en éclosérie.

INTERACTION GENOTYPE – ENVIRONNEMENT SUR LA SURVIE

Contrairement à la croissance, les déséquilibres d'effectifs de descendants (et donc leur survie) entre mâles, entre femelles et entre familles ont été constatés dans les deux environnements. De plus, les descendants de certains mâles (notamment le mâle 90) et certaines femelles (femelles 9 et 164) apparaissent plus adaptés à une condition environnementale plutôt qu'à une autre, montrant une interaction génotype – environnement pour la survie. La température de l'eau est donc une pression de sélection différentielle en milieu naturel (20°C) et en éclosérie (26°C).

Des échantillonnages ayant été réalisés, il sera intéressant d'étudier la composition de la population larvaire en début de fixation pour le lot élevé à 20°C (c'est-à-dire au 33^{ème} jour d'élevage) afin de comparer les contributions relatives des descendants des mâles, des femelles et des familles à ce même stade de développement à 20 et 26°C. Cela nous permettra de déterminer si le phénomène de sélection différentielle en fonction de la température s'est amplifié avec le temps.

Il est intéressant de noter que dans notre expérience, réalisée sans tamisage, les déséquilibres de contributions parentales sont plus importants à 20°C qu'à 26°C. Dans des conditions standards d'élevage (26°C et élimination par tamisage des plus petites larves), nous pouvons donc supposer que le tamisage représente une pression de sélection plus importante que la température. L'étude combinée de l'effet du tamisage et de la température pourrait permettre de confirmer cette hypothèse.

V. Conclusion générale

D'un point de vue technique, la PCR en multiplexage est un outil puissant pour l'assignation de parenté *via* les marqueurs microsatellites, mais à condition que les loci choisis soient très polymorphes. Cependant, même puissant, cet outil ne garantit pas des analyses de parenté aisées notamment du fait de la petite taille des larves et donc de la faible quantité et qualité d'ADN utilisable. De plus, la maîtrise des conditions environnementales durant l'élevage restent relativement difficile (cf. effet réplicat significatif sur la croissance).

Cependant, au terme de cette étude, nos résultats montrent qu'il existe une variance génétique pour la croissance et la survie au stade larvaire chez *Crassostrea gigas*, ce qui confirme les résultats obtenus par Ernande *et al.* (2003) en familles séparées. De plus, nous démontrons l'existence d'interactions génotypes - environnements pour la croissance et la survie en phase larvaire chez *C. gigas*. La température appliquée lors de l'élevage larvaire intensif permet l'expression de la variabilité génétique pour la croissance. Dès lors, les pratiques de tamisage représenteraient une pression de sélection significative favorisant les génotypes à croissance rapide. Dans un but de maximisation de la diversité génétique des lots issus d'écloseries, nous pourrions donc recommander des conditions d'élevage à 26°C sans tamisage.

Cette étude se poursuivra par l'analyse future de matériel échantillonné à des stades ultérieurs. Cela permettra, notamment, de réévaluer l'hypothèse, émise par Ernande *et al.* (2003), concernant les corrélations génétiques négatives entre taux de développement et survie post-larvaire, la métamorphose étant une phase critique du cycle de vie chez les bivalves.

BIBLIOGRAPHIE

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

Collet, B. (1998). Bases génétiques des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Paris- Grignon, Institut National Agronomique: 208p.

Collet, B., Boudry, P., Thebault, A., Heurtebise, S., Morand, B. et Gérard, A. (1999). "Relationship between pre- and post-metamorphic growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg)." Aquaculture 175: 216-225.

Dégremont, L. (2003). Etude des Bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*., Université de Caen - Basse Normandie: 333p.

Doyle, R. W. (1983). "An approach to the quantitative analysis of domestication selection in aquaculture." Aquaculture 33: 167-185.

Duchesne, P., Godbout, M.-H. et Bernatchez, L. (2002). "PAPA (package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation." Mol Ecol Notes 2(2): 191-193.

Ernande, B., Clobert, J., McCombie, H. et Boudry, P. (2003). "Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): a quantitative genetic study." Journal of Evolutionary Biology 16: 399-414.

Fishback, A. G., Danzmann, R. G., Sakamoto, T. et Ferguson, M. M. (1999). "Optimization of semi-automated microsatellite multiplex polymerase chain reaction systems for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquaculture 172: 247-254.

Grizel, H. et Héral, M. (1991). "Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*)." J. Cons. int. Explor. Mer 47: 399 - 403.

Hedgecock, D., Chow, V. et Waples, R. S. (1992). "Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies." Aquaculture 108(3-4): 215-232.

Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. et Vogt, P. H. (1997). "Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol." Biotechniques 23(3): 504-11.

Héral, M. et Deslous-paoli, J. M. (1991). Oyster culture in European countries. Estuarine and Marine bivalve mollusc culture. Menzel, W. Boca Raton, CRC Press: 153-190.

Herbinger, C. M., O'Reilly, P. T., Doyle, R. W., Wright, J. M. et O'Flynn, F. (1999). "Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks." Aquaculture 173(1-4): 105-116.

Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C. et Bonhomme, F. (2000). "Variable microsatellites in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species." Animal Genetics 31: 71-72.

- Huvet, A., Fabioux, C., McCombie, H., Lapègue, S. et Boudry, P. (2004). "Natural hybridation between genetically differentiated population of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus." Marine Ecology Progress Series 272: 141-152.
- Huvet, A., Soletchnik, P., Le Moine, O., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P. et Boudry, P. (2002). "A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids." Aquatic Living Resource 15: 243-250.
- Issaq, H. J., Xu, H., Chan, K. C. et Dean, M. C. (2000). "Effect of temperature on the separation of DNA fragments by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis: a comparative study." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 738(2): 243-248.
- Jablonski, D. (1986). "Larval ecology and macroevolution in marine invertebrates." Bulletin of Marine Science 39(2): 565-587.
- Jackson, T. R., Martin-Robichaud, D. J. et Reith, M. E. (2003). "Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock." Aquaculture 220(1-4): 245-259.
- Jerry, D. R., Preston, N. P., Crocos, P. J., Keys, S., Meadows, J. R. S. et Li, Y. (2004). "Parentage determination of Kumura shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate)." Aquaculture in Press.
- Jones, A. G. et Ardren, W. R. (2003). "Methods of parentage analysis in natural populations." Mol Ecol 12(10): 2511-2523.
- Langdon, C., Ford, E., Jacobson, D. et Blouin, M. S. (2002). "Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) improved after one generation of selection." Aquaculture 205: 1-18.
- Launey, S. et Hedgecock, D. (2001). "High Genetic Load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." Genetics 159: 255-265.
- Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V. et Hedgecock, D. (2003). "Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." Molecular Ecology Notes 3: 228-232.
- Littell, R. C., Stroup, W. W. et Freund, R. J. (2002). SAS for Linear Models, Fourth Edition, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Magoulas, A., Gjetvaj, B., Terzolou, V. et Zouros, E. (1998). "Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)." Animal Genetics 29: 69-70.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L., Pemberton, J. M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural population. Molecular Ecology 7(5): 639-655.

- McGoldrick, D. J., Hedgecock, D., English, L. J., Baoprasertkul, P. et Ward, R. D. (2000). "The Transmission of Microsatellite Alleles in Australian and North American stock of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Selection and null alleles." Journal of Shellfish Research 19: 779-788.
- Norris, A. T., Bradley, D. G. et Cunningham, E. P. (2000). "Parentage and Relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo solar*) using microsatellite markers." Aquaculture 182: 73-83.
- Olsen, J. B., Busack, C., Britt, J. et Bentzen, P. (2001). "The aunt and uncle effect: an empirical evaluation of the confounding influence of full sibs of parents on pedigree reconstruction." Journal of Heredity 92: 243-247.
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M. et Taniguchi, N. (1999). "Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite markers." Aquaculture 173: 413-423.
- Robert, R. et Gérard, A. (1999). "Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France." Aquatic Living Resource 12: 121-130.
- Sekino, M., Hamaguchi, M., Aranishi, F. et Okoshi, K. (2003). "Development of Novel Microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." Marine Biotechnology 5: 227-233.
- Selvamani, M. J., Degnan, S. M. et Degnan, B. M. (2001). "Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture." Mar Biotechnol (NY) 3(5): 478-85.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P. et Jean, B. (1996). "Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR." Nucleic Acids Research 24(16): 3189-3194.
- Utting, S. D. et Spencer, B. E. (1991). "The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles." Laboratory Leaflet - Ministry of Agriculture, fisheries and Food Directorate of Fisheries Research 68: 31p.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B. et Linhart, O. (2004). "Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.)." Aquaculture In Press, Corrected Proof.

LEXIQUE

ALLELE

L'une des séquences alternatives possible de l'ADN à un locus donné. Chaque forme allélique peut entraîner un phénotype particulier.

AMORCE

Oligonucléotide qui, hybridé à un brin d'ADN servant de modèle (matrice), permet sa propre élévation par l'ADN polymérase.

BOX PLOTS

Les box plot (ou boîtes à moustaches) mettent en évidence les quartiles d'une distribution. Ils donnent une bonne idée de la valeur centrale et de la dispersion d'une distribution. Ils permettent de repérer les différentes valeurs aberrantes et facilitent les comparaisons entre plusieurs distributions. La longueur de la boîte correspond à l'écart interquartile (Q3-Q1). L'étendue (max-min) de la distribution à chacune des extrémités est indiquée par deux lignes horizontales. La médiane M est indiquée par la verticale proche en générale du milieu.

FITNESS

Contribution génétique d'un individu à la génération suivante, généralement exprimée en termes du nombre de descendants produits par individu et capables de se reproduire à nouveau.

GENOTYPE

Ensemble de l'information génétique d'un virus, d'une cellule, d'un organisme, identifiable par l'analyse génétique.

LOCUS

Point précis du chromosome occupé par un gène donné.

MICROSATELLITE

Il existe, dispersées dans le génome, des régions constituées de courtes séquences répétées dont la longueur est hypervariable en raison des changements du nombre d'unités de répétition qui les constituent. Ces microsatellites, dont l'unité de répétition est de 1 à 5 paires de bases, ont une longueur totale souvent inférieure à 200 pb.

Annexes

Annexe 1

Génotype des géniteurs aux trois loci microsatellites utilisés.

Sexe	Numéro	Marqueurs microsatellites					
		CG 108		L10		CG49	
F	9	140	150	138	156	137	145
F	81	154	161	133	163	161	196
F	160	123	147	116	172	128	159
F	164	125	141	136	145	145	184
M	2	136	149	129	163	145	147
M	40	132	138	145	145	142	167
M	55	134	140	141	152	145	165
M	58	127	134	143	154	146	192
M	71	130	153	126	137	152	167
M	74	133	146	120	171	132	142
M	89	127	163	115	135	136	165
M	90	119	150	131	147	132	140
M	168	125	141	111	171	126	148
M	179	117	151	125	129	167	176
M	180	125	135	148	188	155	176
M	199	125	177	127	170	159	173

Annexe 2

Manuscrit soumis en tant que « Short communication » à Aquaculture Research.

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

Nicolas Taris ¹, Sophie Baron ², Timothy F. Sharbel ¹, Christopher Sauvage ¹ and Pierre Boudry ^{1*}.

¹ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17390 La Tremblade France

² Laboratoire d'analyses génétiques GENINDEXE, 17000 La Rochelle France

* Corresponding author: P. Boudry, IFREMER, LGP, 17390 La Tremblade. Tel: 33 5 46 36 76 18. Fax: 33 5 46 36 37 51. E-mail: pboudry@ifremer.fr

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

Abstract :

The analysis of parentage using microsatellite markers is of increasing importance, notably in aquaculture genetic research where communal rearing of mixed families can be used to reduce unwanted environmental variance. We present here an optimization of parental genotype assessment for larvae or adults of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, using a multiplex system of three microsatellite loci. In conjunction with a simple DNA extraction protocol, this method enables high throughput analyses of parentage in *C. gigas*. Using this method, we successfully determined the parentage of 93% (1224 out of 1318) of the progeny in a factorial cross between 3 females and 10 males. The inability to genotype the remaining 7% was due to DNA degradation of larvae rather than assignment uncertainty.

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

Considering the difficulty of larval DNA extraction due to their small size (from 70 to 300 μ m) and the presence of a hard closed shell, our DNA extraction protocol represents a potentially simple and inexpensive method for large scale studies. It is based on a Chelex-boiling extraction procedure (Estoup *et al.* 1996, Launey & Hedgecock 2001), but does not require Chelex resin. Individual larvae which had been preserved in 70% ethanol were collected by pipetting 3 μ l of ethanol into a 0.2 ml Eppendorf tube, crushed using the point of a clean needle under a dissection microscope, and then dried down in a vacuum centrifuge (Gyrovap, VA Howe) for 15min at 35°C or at ambient temperature, although this takes more time. Our initial trials using uncrushed larvae produced variable results, and hence the addition of the crushing step greatly increases the quality of the genotyping results. A 30 μ l volume of lysate buffer (670 mM Tris-HCl pH 8.8, 166 mM ammonium sulfate, 0.1 % Tween-20) and 5 μ l of proteinase K (1mg/ μ l) were added to each sample, followed by a short centrifugation step to ensure the larvae were at the bottom of the tube. The tubes were

incubated at 55°C for 1h in a PCR machine (Programmable Thermal Controller-100™ MJ Research, Inc.), centrifuged briefly and then heated again at 100°C for 20min. The samples were finally transferred from Eppendorf tubes to a 96-well microtiter plate, and stored at –20°C before the PCR procedure. DNA of adult oysters was extracted from a very small gill samples (~10µg) using the same protocol, but using a 150 µl volume of lysate buffer.

Optimal conditions for a PCR-multiplex reaction may differ markedly from those developed for uniplex reactions (Henegariu *et al.* 1997, Masi *et al.* 2003). Consequently, we tested a range of PCR-multiplex conditions by varying primer concentrations, annealing temperatures and reaction volumes (Table 1). Following our initial tests, we adopted the following protocol (reaction volume 15µl): dNTP (200µM), MgCl₂ (2mM), Taq DNA polymerase (New England Biolabs, 1.5 U/15µl) and template oyster DNA (100 ng of template DNA for adults and ~50 ng for larvae in volume of 1,2 µl). An annealing temperature of 55° C gave optimal resolution, although locus L10 could be amplified at 59° C.

The cycling conditions used for the PCR amplification were as follows: pre-denaturation (94°C-2 minutes), followed by 30 cycles of denaturation-annealing-extension (94°C-1 min; T_a [optimal annealing temperature for each pair of primers] =55°C-1 min; 72°C-1 min), and a final elongation step (72°C-30 min) in order to reduce the double peaks associated with “plus A” phenomenon (Ziegler *et al.* 1992). PCR products (1.0µl) were finally mixed with 12µL deionized formamide and 0.25µL GeneScan™ ROX™ size standard (Applied Biosystem), denatured for 5 min at 95°C and then flash-cooled in a water ice bath. All analyses were performed on a on ABI Prism® 3100 automated sequencer (Applied Biosystem) using the POP-4 polymer with the 36 cm capillary.

The extraction-multiplex procedure was performed on 1318 ethanol preserved larvae produced from a cross between 13 known adults (3 females fertilized by 10 males in a factorial design). We choose highly heterozygous parental genotypes from a possible 88

potential adults. To test the resolving power of our three loci in relation to the 13 chosen parental genotypes, we used the FAP (Family Assignment Program) software (J. B. Taggart, University of Stirling; unpublished). This program, based on exclusion principles, revealed that our three multiplexed loci provided 100% discrimination among the progeny of that cross (assuming no genotyping errors). In practise, we were able to unambiguously determine the parentage in 93% of the larvae (1224/1318). Dropouts in our genotyping procedure are likely to have been caused by DNA degradation of larvae preserved in ethanol or by human error during the initial larvae sampling, rather than assignment uncertainty.

Additionally, in order to test for the general resolving power of this three locus multiplex system, *i.e.* without any prior selection of the parental genotypes, we used the simulation program CERVUS (Marshall *et al.* 1998). This program uses allele frequencies of a population at given locus to estimate its resolving power. The allele frequencies of 88 adult oysters were used to run the simulations according to the following parameters: 10000 replication cycles, 100% of candidate parents sampled and genotyped. We tested a number of candidate parents ranging from 2 to 88 (fig 1). Assignment to the true parents was successful in 98.5 % of the cases when 2 parents were randomly chosen, and 57,9% when 88 parents were used. For 13 parents (*i.e.* our study case), the mean percentage of unambiguous parental assignment was 87 % (not 100%). This illustrates that, when feasible, the selection of highly heterozygous parents can strongly ease parentage analysis (*e.g.* Boudry *et al.* 2002).

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

Acknowledgements

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

References

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

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

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

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

Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C., Bonhomme F. (2000) Variable microsatellites in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and the other cupped oyster species. *Animal Genetics* **31**, 71-72.

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

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

Launey S., Hedgecock D. (2001) High Genetic Load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* **159**, 255-265.

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

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

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

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

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

Neff B.D., Fu P., Gross M.R. (2000) Microsatellite Multiplexing in Fish. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 584-593.

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

Ziegle J.S., Su Y., Corcoran K.P., Mayrand P.E., Hoff L.B., Mcbridge L.J., Kronich M.N. (1992) Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* **14**, 1026-31.

(A)

Final reaction volume (μ l)	Annealing temperature ($^{\circ}$ C)	
	55	58
25	++	+
20	++	+
15	++	+
10	+	-

(-) no amplification; (+) non-specific amplification; (++) scorable genotype.

(B)

	CG108(6-FAM)	L10 (HEX)	CG49 (NED)
0.5 μ M equimolar	o	o	o
0.2 μ M equimolar	+	+	+
0.15/0.3/0.15 μ M	++	++	++

(o) PCR products saturation; (+) scorable but uneven amplification; (++) scorable genotype.

Table 1. Test of variations in multiplex PCR conditions for (A) PCR reaction volume and annealing temperature and (B) primer concentration.

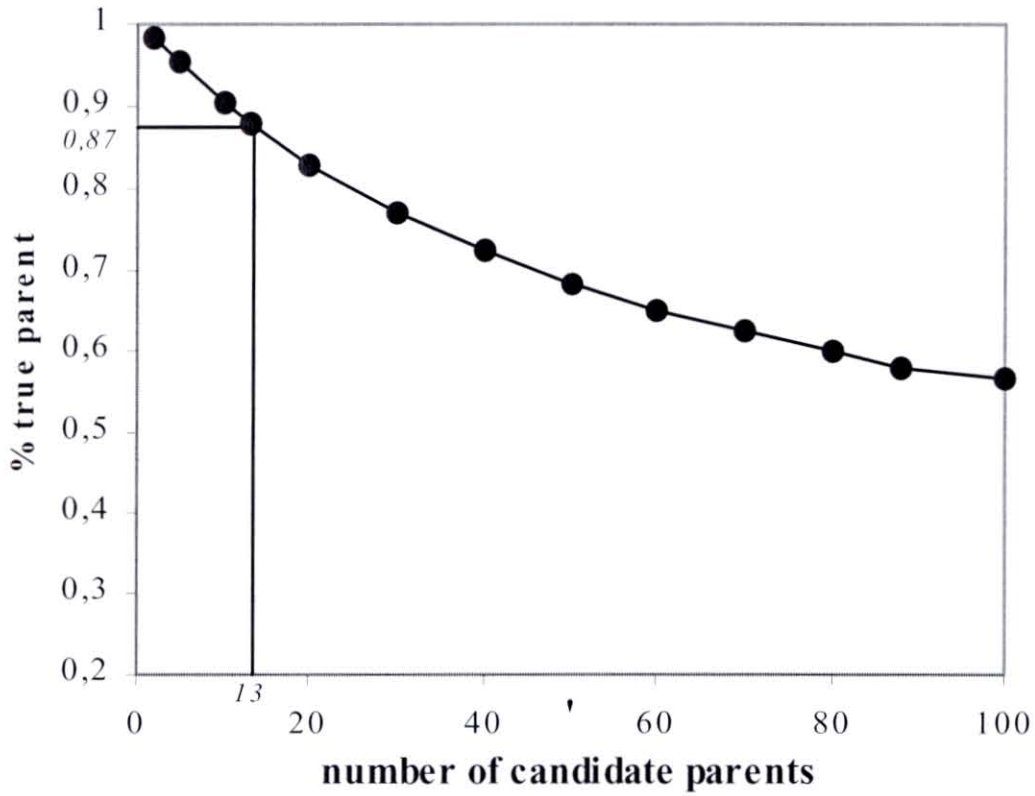


Figure 1. Assignment of offspring in parentage under a number of candidate parents from 2 to 88.