

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE – PARIS VI

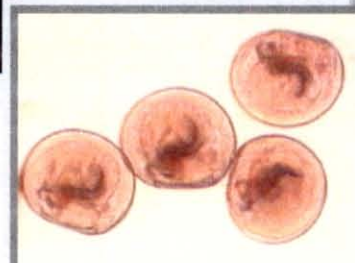
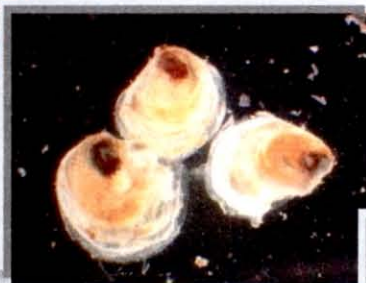
DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES (DESS) :
GESTION DE LA BIODIVERSITE, METHODOLOGIES ET VALORISATION DES
RESSOURCES GENETIQUES.



ANNEE 2001/2002

**DIVERSITE GENETIQUE ET DYNAMIQUE DU RECRUTEMENT
CHEZ L'HUITRE PLATE *OSTREA EDULIS* L.**

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE



NICOLAS TARIS

SOUS LA DIRECTION DE SYLVIE LAPEGUE, PIERRE BOUDRY
ET FRANÇOIS BONHOMME.

LABORATOIRE DE GENETIQUE ET PATHOLOGIE
IFREMER LA TREMBLADE

Ifremer

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION.....	1
II. MATERIEL ET METHODES.....	6
A. Espèce étudiée : <i>Ostrea edulis</i>.....	6
<i>Généralités</i>	
<i>Eléments de biologie</i>	
B. Echantillonnage	7
C. Outil moléculaire : microsatellites	8
<i>Présentation</i>	
<i>Modèles de mutation</i>	
<i>Application des microsatellites en génétique des populations</i>	
D. Analyses génétiques	10
<i>Extraction de l'ADN</i>	
<i>Génotypage</i>	
E. Analyses statistiques	11
<i>Mesure de la variabilité génétique</i>	
<i>Mesure de la différenciation génétique</i>	
<i>Analyses de paternité</i>	
<i>Détermination de l'effectif efficace</i>	
III. RESULTATS	15
A. Variabilité génétique	15
<i>Polymorphisme allélique</i>	
<i>Hétérozygotie</i>	
<i>Fréquences d'allèles nuls</i>	
B. Différenciation génétique	16
C. Contribution parentale sur un événement de reproduction	17
<i>Analyse de paternité</i>	
<i>Estimation de la taille efficace</i>	
IV. DISCUSSION	19
<i>- Intérêt des marqueurs microsatellites dans le cadre d'une étude de variabilité génétique intrapopulation</i>	
<i>- Implication de la notion de consanguinité pour la compréhension des relations hétérozygotie / valeur sélective et des déficits en hétérozygotes dans les populations naturelles de bivalves marins</i>	
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	21
BIBLIOGRAPHIE	23
ANNEXES	28

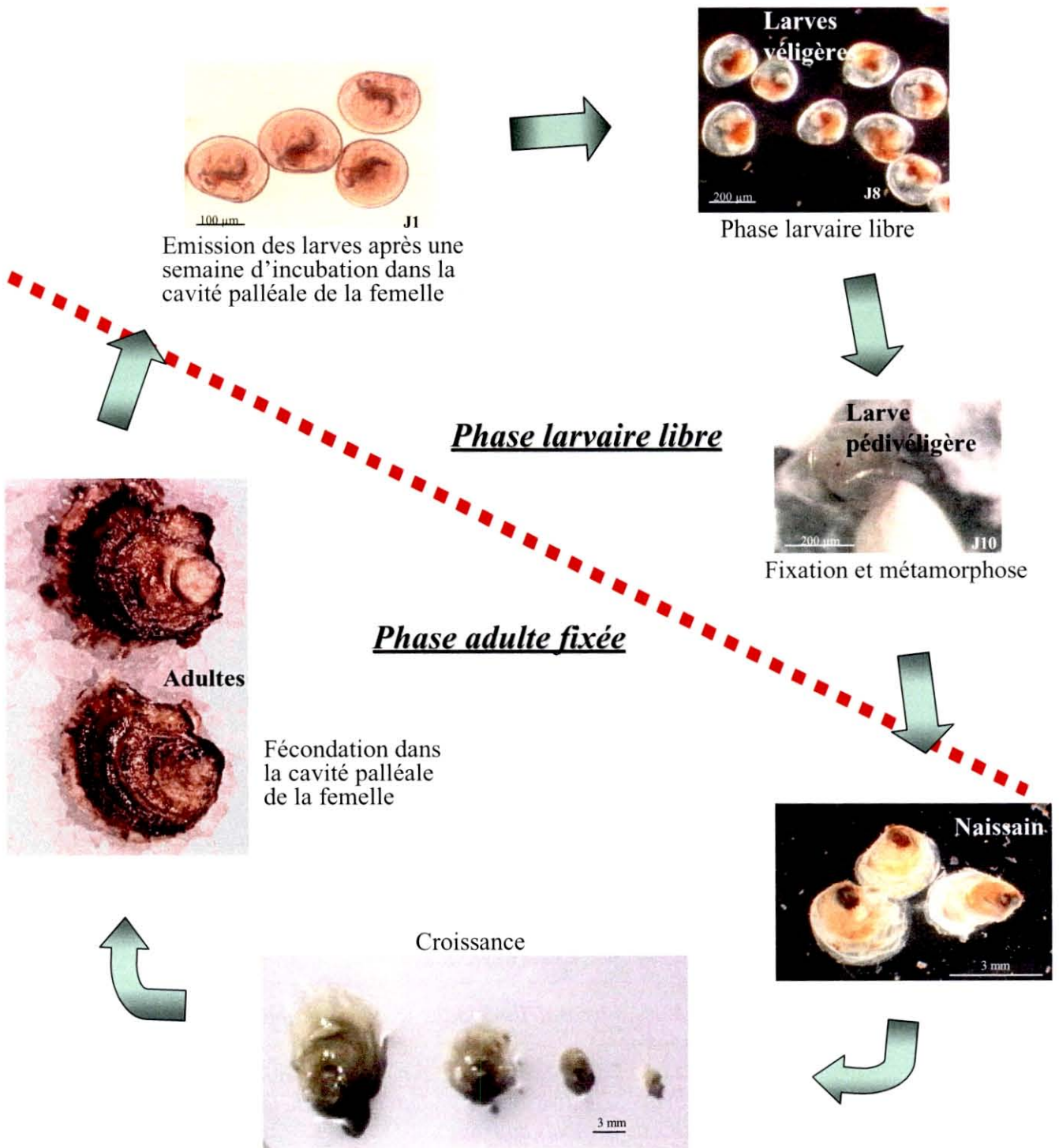


Figure 1 : Schéma du cycle biologique d '*Ostrea edulis* (D 'après LAUNEY 1998)

I. INTRODUCTION

Le milieu marin est un milieu difficile à appréhender car composé d'un ensemble d'organismes et d'écosystèmes caractérisés par des conditions de fonctionnement tout à fait originales et souvent difficiles d'accès.

Ces spécificités peuvent être attribuées à la structure spatiale du milieu marin, qui à bien des égards, diffère du milieu terrestre. En effet si les notions de barrières géographiques sont une réalité concrète pour les organismes terrestres, elles restent rarement identifiées en milieu marin (PALUMBI 1994). Dans un tel environnement, les organismes présentent des cycles de vie souvent mal connus, notamment ceux qui associent phase benthique et phase planctonique.

L'étude de la structure génétique des populations, dans un espace aussi ouvert aux échanges et aux flux migratoires permet de mieux comprendre l'histoire biologique d'une espèce. Il apparaît en effet qu'une description de la variabilité génétique des populations naturelles et de son organisation permet d'approfondir considérablement la connaissance de mécanismes directement liés à l'organisation et l'évolution des espèces (migration, mutation, sélection, dérive). D'autant qu'il est désormais possible de s'appuyer sur des marqueurs moléculaires neutres et hautement polymorphes comme les microsatellites. D'une manière plus globale, la caractérisation de cette variabilité intervient au sein même des problématiques de gestion des ressources génétiques concernant notamment les populations soumises à une exploitation économique.

Particularités génétiques des bivalves marins

Par l'originalité de leur cycle de développement, les bivalves marins représentent pour le généticien des populations un modèle unique. Ils font partie des organismes alternant deux phases distinctes : phase adulte benthique fixée puis phase larvaire libre planctonique (Figure 1, cycle de l'huître plate *Ostrea edulis*). La libération gamétique en pleine eau devrait pouvoir entraîner une fécondation intrapopulationnelle aléatoire assimilable au modèle panmictique. D'autre part, la phase larvaire planctonique s'accorde avec une dispersion à longue portée impliquant des flux géniques suffisamment importants pour maintenir une homogénéité génétique sur de grandes distances (FERAL 2002). Enfin, ces mollusques présentent des effectifs raisonnablement importants pour minimiser l'effet de dérive génétique (DAVID 1996, LAUNEY 1998).

Autant de caractéristiques qui, réunies, en font des candidats désignés pour adhérer au modèle théorique de HARDY-WEINBERG. Cependant de nombreuses études rapportent l'existence de deux phénomènes souvent conjoints, à savoir :

- (1) l'existence d'une relation positive, au niveau individuel, entre l'hétérozygotie aux marqueurs génétiques (en général enzymatiques) et des traits associés à la valeur sélective (survie ou croissance).
- (2) et l'existence de déficits d'hétérozygotie marquant un écart à l'équilibre de HARDY-WEINBERG.

○ (1) Si dans le passé de nombreuses corrélations ont été établies entre hétérozygotie et valeur sélective chez différents bivalves marins (KOEHN & SHUMWAY 1982 sur l'huître creuse, DIEHL & KOEHN 1985, GAFFNEY *et al.* 1990 sur la moule, POGSON & ZOUROS 1994 sur la coquille Saint-Jacques, DAVID 1996 sur la spisule, BIERNE *et al.* 1998 sur l'huître plate), la signification génétique en reste obscure. Les théories avancées pour expliquer les mécanismes du phénomène sont souvent controversées (SMOUSE 1986, POGSON & ZOUROS 1994, DAVID 1996).

Une première hypothèse définit un avantage sélectif des hétérozygotes aux locus considérés mettant directement en cause la neutralité des marqueurs (allozymes) (SMOUSE 1986, POGSON & ZOUROS 1994). On parle de superdominance "directe". Plus récemment, ces corrélations ont également été observées en utilisant des marqueurs non-codants (microsatellites) (BIERNE *et al.* 1998, 2000, POGSON & FEVOLDEN 1998). Ces derniers sont cependant considérés comme sélectivement neutres (BIERNE *et al.* 2000), ce qui laisse supposer une seconde hypothèse explicative.

Cette seconde hypothèse met en avant un mécanisme de superdominance "associative". Selon celle-ci, les marqueurs sont neutres mais en déséquilibre avec les gènes "agents" responsables de la corrélation (OHTA 1971). Dans ce cas, les modèles considèrent deux types possibles de corrélation : un premier caractérisé par une association non aléatoire des allèles du marqueur et de l'agent dans un même gamète (déséquilibre de liaison) et un second définissant une association non aléatoire entre les génotypes des deux locus dans un même zygote (déséquilibre d'identité) (DAVID 1996). Les sources d'apparition de ces déséquilibres sont différentes. Les déséquilibres de liaison peuvent se manifester dans des populations panmictiques par suite d'effets de dérive génétique dus à un effectif fini. Les déséquilibres d'identité ne sont présents que dans les populations partiellement consanguines

et restent peu sensibles à la liaison physique entre locus (WEIR & COCKERHAM 1973, DAVID 1996).

○ (2) l'observation d'un déficit en hétérozygotes (par rapport aux fréquences théoriques attendues sous l'hypothèse d'équilibre de HARDY-WEINBERG) est un phénomène fréquent chez les bivalves marins (BORSA 1990, DAVID *et al.* 1997, GAFFNEY 1990, GARDNER 1992, ZOUROS & FOLTZ 1984) et pour le moins inattendu puisque les bivalves présentent des caractéristiques de cycle de vie quasi idéales pour satisfaire à la réalisation de l'équilibre de HARDY-WEINBERG.

Les principales explications concernant ce déficit s'articulent autour de trois points (BORSA 1990, DAVID 1996) :

- effets populationnels : les individus considérés ne proviennent pas d'un pool unique de gamètes fécondés au hasard. Il est alors possible de considérer une réassociation non aléatoire des gamètes (consanguinité) ou bien qu'il existe un mélange de groupes différenciés à l'intérieur de l'échantillon (effet WAHLUND).
- effets sélectifs : la sélection élimine une partie des hétérozygotes au cours de la phase larvaire ou embryonnaire. En effet les larves peuvent être soumises à un régime de sélection largement différent de celui des adultes (HAAG & GARTON 1995). Quelques analyses portant sur des mortalités différentielles pendant ces stades montrent cependant que les homozygotes (et non les hétérozygotes) sont contre-sélectionnés (BIERNE *et al.* 1998, LAUNEY & HEDGECKOCK 2001). D'une manière générale, cette hypothèse sélective est adoptée par défaut, après élimination des autres possibilités (DAVID 1996).
- non-détection du polymorphisme introduisant une sous-estimation de l'hétérozygotie observée. On distingue différentes possibilités de non-détection :
 - ✓ existence d'allèles nuls (non visualisés) (FOLTZ 1986, GARDNER 1992)
 - ✓ aneuploïdie (THIRIOT-QUEVREUX *et al.* 1992)
 - ✓ ou même artefacts de lecture des gels.

*Etat des connaissances sur la génétique des populations de l'huître plate *Ostrea edulis**

L'huître plate européenne *Ostrea edulis* est un bivalve marin dont la structure génétique des populations a été largement étudiée au niveau de son aire de répartition

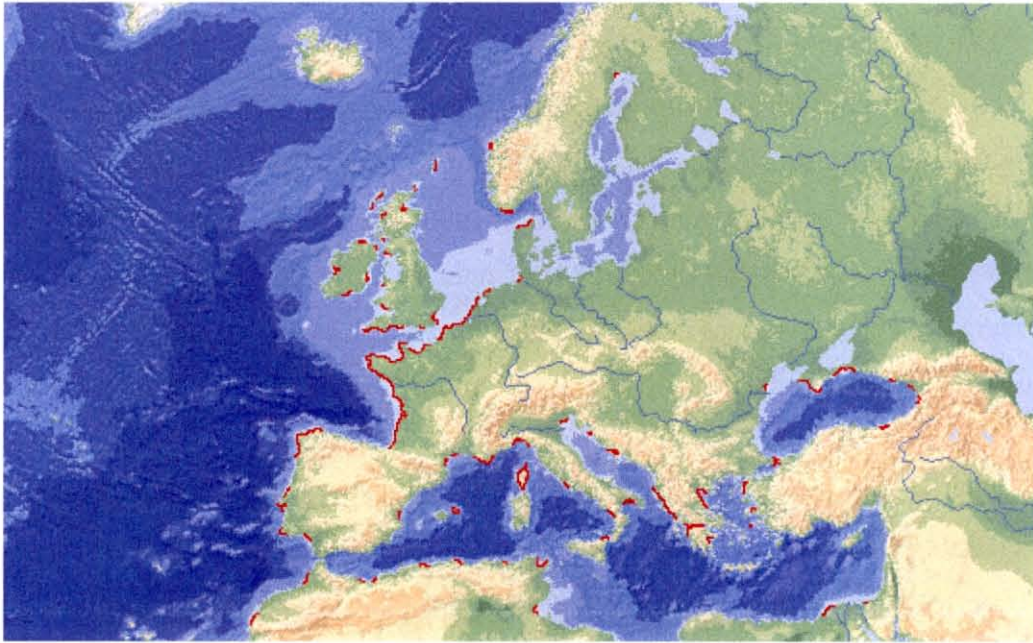


Figure 2 : Répartition géographique d'*Ostrea edulis* L. (liseré rouge) (D 'après JAZIRI 1985)

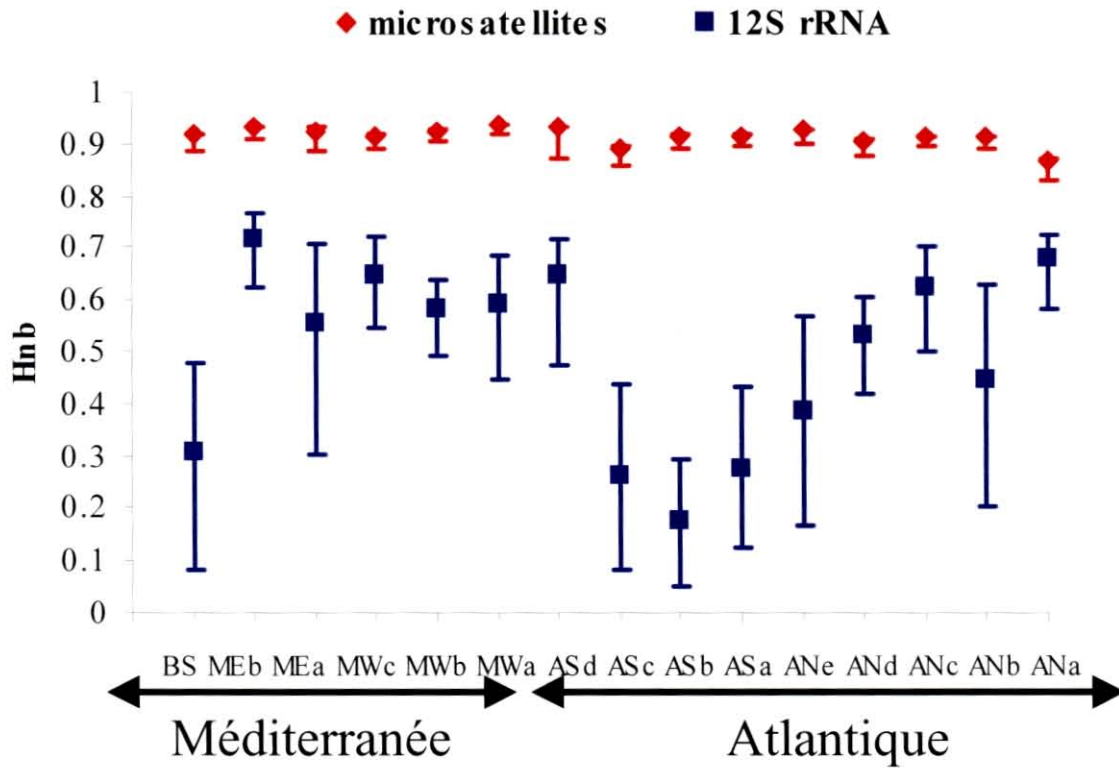


Figure 3 : Diversité de Nei calculée dans les populations sur la base des données microsatellites et mitochondriales.

naturelle, qui s'étend de la Norvège au Maroc dans un axe nord-sud et du Maroc à la Mer Noire dans un axe ouest-est (Figure 2). Les premières études génétiques (BLANC *et al.* 1986, JAZIRI *et al.* 1987, JOHANNESSON *et al.* 1989, LE PENNEC *et al.* 1985, SAAVEDRA *et al.* 1987, WILKINS & MATHERS 1973) avaient mis en évidence un faible polymorphisme intrapopulation et une faible différenciation interpopulation. Par la suite, des études allozymiques sur toute l'aire de répartition ont conclu à une divergence significative entre les populations méditerranéennes et atlantiques, et ce, malgré une faible différenciation globale (JAZIRI 1990, SAAVEDRA *et al.* 1993, 1995). JAZIRI (1990) a observé une plus faible variabilité dans les populations atlantiques et a suggéré que les populations atlantiques avaient pu provenir d'un refuge qu'aurait constitué la Méditerranée pendant les périodes glaciaires du pléistocène. SAAVEDRA *et al.* (1993, 1995) ont observé des clines de fréquences alléliques à certains locus de part et d'autre du détroit de Gibraltar et en ont conclu que ceci était dû à un contact secondaire entre les stocks méditerranéens et atlantiques après leur séparation pendant la période glaciaire. Plus récemment, deux études, toujours à l'échelle de l'aire de répartition (LAUNEY *et al.* sous presse, DIAZ-ALMELA *et al.*, en préparation), ont été réalisées respectivement avec des marqueurs microsatellites et mitochondrial. Elles mettent en évidence des schémas de variations similaires entre elles et avec les marqueurs allozymiques, qui correspondent à un modèle d'isolement par la distance. Cependant, au contraire des conclusions de SAAVEDRA *et al.* (1995), l'étude basée sur les microsatellites et une nouvelle analyse des données allozymiques n'ont pas permis de mettre en évidence une discontinuité génétique entre les populations d'huîtres atlantiques et méditerranéennes. Si l'on compare les données microsatellites et mitochondriales, une plus grande variabilité a été observée entre les populations en ce qui concerne la diversité mitochondriale (Figure 3). De plus, un facteur 10 a été mis en évidence entre la différenciation génétique calculée à partir du marqueur mitochondrial ($F_{st} = 0.224$) par rapport à la différenciation calculée à partir des microsatellites ($F_{st} = 0.019$). Les mitochondries possèdent un génome haploïde et sont transmises de façon maternelle. Les données mitochondriales fournissent des informations sur la structuration génétique via la transmission maternelle, alors que les microsatellites renseignent sur celle s'opérant par transmission biparentale. Ainsi, il semblerait que le succès reproducteur relatif entre mâles et femelles, ainsi que leur variabilité, joue un rôle important dans l'observation de la structure actuelle de la diversité génétique des différents génomes à l'échelle de l'aire de répartition.

Nous nous sommes intéressés à une échelle plus fine, celle de la population, et plus particulièrement à sa dynamique de reproduction afin de mieux comprendre les facteurs qui

peuvent participer à la mise en place d'une structuration génétique permettant d'observer les phénomènes précédemment cités de déficit en hétérozygotes et de relation hétérozygotie croissance. Nous avons voulu en particulier tester l'hypothèse d'une réassociation non aléatoire des gamètes (consanguinité) dans le cas du déficit en hétérozygotes, qui rejoint celle du déséquilibre d'identité (possible dans les populations partiellement consanguines) dans le cas de l'hypothèse d'une superdominance associative pour expliquer la relation hétérozygotie-croissance. Cette possible consanguinité à l'échelle locale est corroborée par l'observation d'une faible variabilité génétique (et donc d'effectifs efficaces locaux réduits) observée dans une cohorte recrutée en 1994 sur une courte période en Méditerranée (LAUNEY *et al.*, en préparation). De plus, une étude réalisée elle aussi en Méditerranée en 2001, a mis en évidence qu'un faible nombre de pères contribuait à une descendance femelle (MIRA 2001). En effet, la présence de consanguinité suppose plusieurs conditions : d'abord que des individus soient issus d'un nombre restreint de géniteurs (effectif efficace local réduit), ensuite que ces mêmes individus se soient fixés au substrat relativement près les uns des autres (implique une cohésion du nuage larvaire avant fixation), forment une cohorte et se reproduisent enfin entre eux (effet WAHLUND temporel ou spatial entraînant de la consanguinité à la génération suivante).

Afin de savoir si de tels cas peuvent être rencontrés, nous avons réalisé une étude plus large (échantillonnage sur davantage de cohortes et de descendances femelles) à l'échelle d'une population naturelle d'huîtres plates (en Méditerranée et en Bretagne) et ce, à trois stades de développement : larves, juvéniles (naissain) et adultes. Nous nous sommes attachés à définir :

- la variance des fréquences alléliques au cours d'une saison de recrutement (période estivale 2001) en comparant la variabilité observée dans quatre cohortes recrutées à celle observée chez les adultes,
- les contributions paternelles en réalisant des échantillonnages de larves encore non émises de femelles incubantes,
- l'effectif efficace.

Nous tâcherons d'infirmer ou confirmer les observations précédentes, l'objectif principal de ces analyses étant de mieux comprendre comment la diversité génétique des populations se constitue au gré des aléas du recrutement.

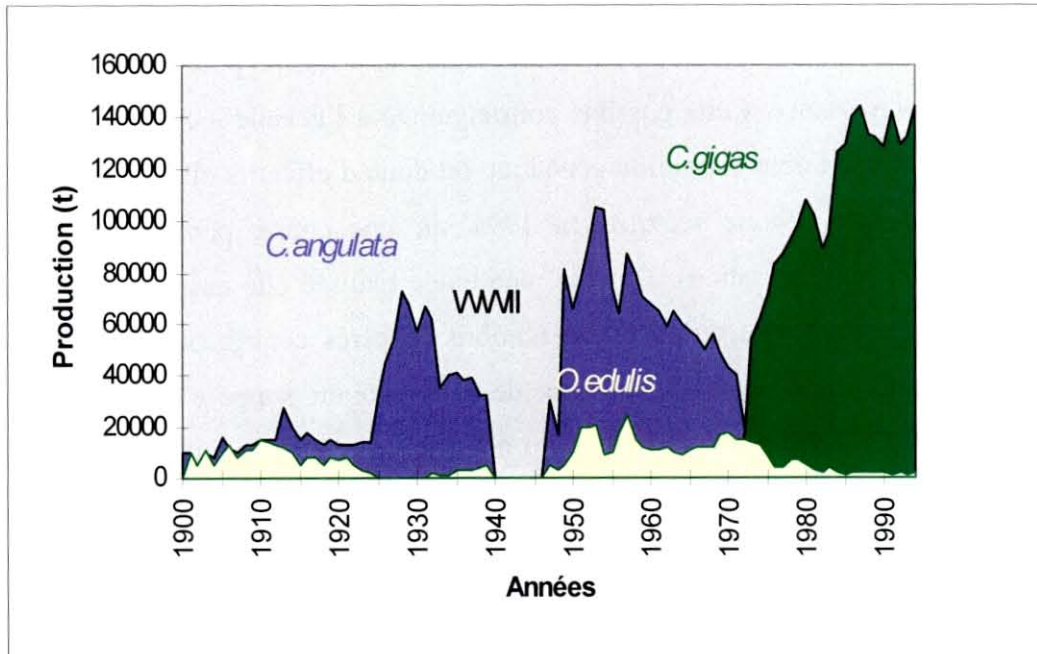


Figure 4 : Production ostréicole en France depuis le début du siècle (D 'après GOULLETQUER & HERAL1997)

II. MATERIEL ET METHODES

A. Espèce étudiée : *Ostrea edulis*

Généralités

Consommée depuis le début de notre ère, il faut attendre le XVII^{ème} siècle pour voir se développer la première culture d'huîtres plates dans les réservoirs des marais salants de la côte atlantique puis dans des bassins spécialement aménagés. L'ostréiculture moderne naît au XIX^{ème} siècle dès que le captage des larves devient possible (HERAL 1986). Egalement au cours du XIX^{ème} siècle et pour faire face à la pénurie des gisements naturels subissant une surexploitation, l'huître creuse portugaise (*Crassostrea angulata*), d'abord introduite de façon accidentelle est ensuite développée sur les côtes françaises. Jusqu'au début du XX^{ème} siècle, la production ostréicole s'équilibre entre les deux espèces. L'huître plate subit entre 1920 et 1922 une mortalité massive dont les raisons ne sont pas expliquées (HERAL 1986). L'huître portugaise subit à son tour un important déclin avant de disparaître en 1972 suite à la généralisation de la maladie dite "de la branchie" (iridovirus). Parallèlement, *Ostrea edulis* dont la production n'excède pas 20 000 tonnes par an jusqu'à la fin des années 60 connaît une importante diminution dans les années 1970 suite à deux événements successifs d'attaque parasitaire : *Marteilia refringens* protozoaire du système digestif et *Bonamia ostreae* protozoaire intrahémocytaire (GRIZEL 1985).

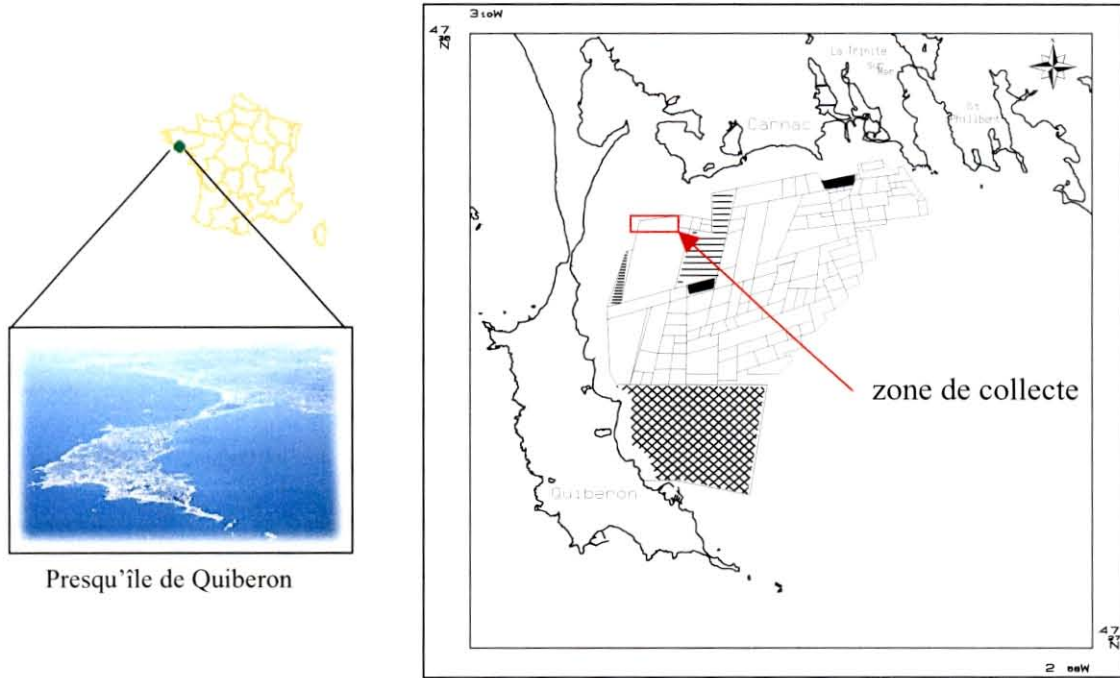
Aujourd'hui la production est estimée aux alentours de 1 000-2 000 tonnes annuelles. L'huître *Crassostrea gigas* originaire du Pacifique (implantée en 1972) assure désormais la quasi-totalité de la production française (Figure 4).

Eléments de Biologie

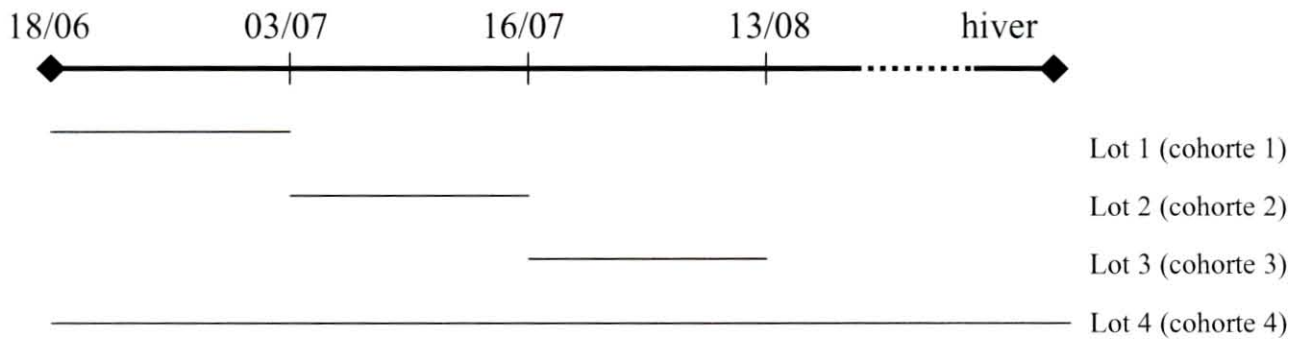
L'huître plate est une espèce hermaphrodite asynchrone à sexualité consécutive rythmique. Elle est généralement protandre mais peut changer de sexe plusieurs fois dans une même saison de ponte. C'est un mollusque larvipare dont la fécondation des ovules par les spermatozoïdes, contrairement à l'huître creuse, s'effectue dans la cavité palléale (période de reproduction : été et automne). Les larves sont incubées pendant 8 à 10 jours. Le nombre de larves émis à chaque ponte est de 500 000 à 1 500 000. Blanchâtre lors de la fécondation, ces mêmes larves deviennent progressivement grises et sont lâchées dans le milieu environnant. La phase planctonique s'échelonne sur une durée de 5 à 14 jours, au terme de

Encadré : Site et dates d'échantillonnage

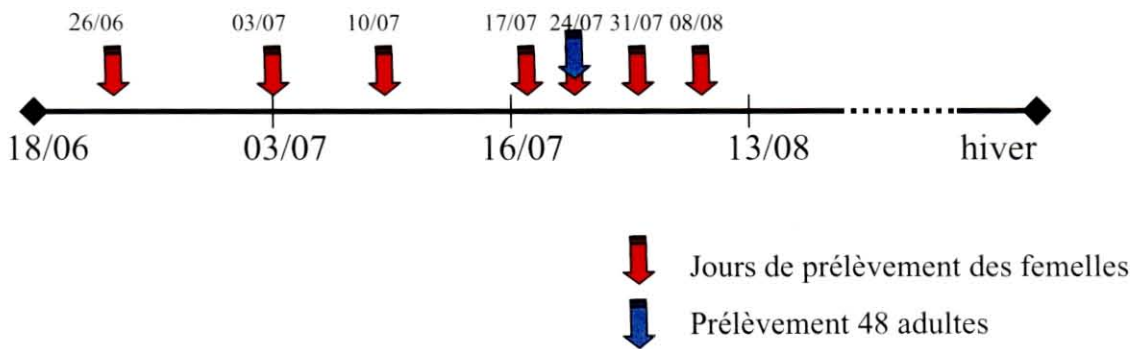
○ Figure 5 : Site d'étude : zone de recrutement naturel (baie de Quiberon)




○ Figure 6: Périodes de collecte des cohortes



○ Figure 7 : Dates de prélèvement des adultes



laquelle les larves se fixent sur un substrat dur. Les juvéniles fixés sont capables de se reproduire dès le premier été et les individus peuvent vivre 5 à 10 ans (QUERO & VAYNE 1998) (résumé du cycle en Figure 1).

SYSTEMATIQUE	
✓ Embranchement : Mollusques	
✓ Classe : Bivalves	
✓ Ordre : Filibranches	
✓ Famille : Ostréidés	
✓ Genre : <i>Ostrea</i>	
✓ Espèce : <i>edulis</i>	

B. Echantillonnage (encadré)

Des lots de collecteurs (filets remplis de coquilles de moules, maintenus dans des cages métalliques) ont été placés sur une zone de recrutement naturel située en baie de Quiberon durant plusieurs périodes distinctes (Encadré-Figure 5) :

- du 18 juin au 3 juillet 2001
- du 3 juillet au 16 juillet 2001
- du 16 juillet au 13 août 2001

A ces trois périodes de collectes correspondent respectivement les cohortes 1, 2 et 3. Un quatrième lot de collecteurs a été installé et laissé durant toute la période d'expérimentation, et jusqu'au début de l'hiver où les collecteurs ont été retirés (Encadré-Figure 6). Ces animaux fixés correspondent à la cohorte 4.

Les lots de collecteurs ont été mis en claires pour être ensuite transférés au laboratoire de La Tremblade et placés dans 2 bacs de 800 litres dans lesquels les huîtres ont poursuivi leur croissance.

En février et mars 2002, les cohortes ont été échantillonnées. Un fragment de branchie de tous les animaux sur les coques de moules a été prélevé. Ont été récupérés :

- cohorte 1 : 167 individus
- cohorte 2 : 198 individus
- cohorte 3 : 115 individus
- cohorte 4 : 192 individus

Par ailleurs, sur le même site de recrutement ont été échantillonnées des branchies de femelles "ardoisées" (nommées ainsi à cause de la présence de larves elles-mêmes de couleur ardoisée) ainsi que leurs larves contenues dans la cavité palléale :

- le 26/06 : 2 femelles : FA1 et FA2
- le 03/07 : 1 femelle : FA3
- le 10/07 : 5 femelles : FA4, FA5, FA6, FA7, FA8
- le 17/07 : 2 femelles : FA9, FA10
- le 24/07 : 3 femelles : FA11, FA12, FA13
- le 31/07 : 5 femelles : FA14, FA15, FA16, FA17, FA18
- le 08/08 : 3 femelles : FA 19, FA20, FA21

Au total, 21 femelles et leurs larves ont été échantillonnées. De plus, le 24/07 les branchies de 47 adultes de la zone d'étude ont été récoltées, portant à 68 le nombre d'adultes (géniteurs potentiels) (Encadré-Figure 7).

Il n'a malheureusement pas été possible d'obtenir du naissain fixé en Méditerranée, rendant impossible les comparaisons avec les observations précédemment faites dans ce même site.

C. Outil moléculaire : microsatellites

Présentation

Les microsatellites sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétition est comprise entre 1 et 6 paires de bases. Ils ont été trouvés dans la plupart des espèces eucaryotes et procaryotes étudiées (FIELD & WILLS 1996, TÓTH *et al.* 2000). Leur répartition le long du génome reste aléatoire malgré une sous-représentation dans les régions télomériques et centromériques des chromosomes (WINTERØ *et al.* 1992). Cette caractéristique les différencie des minisatellites (l'ensemble minisatellites et microsatellites est nommé Variable Number Tandem Repeats ou VNTR). Ces derniers, correspondant à des segments d'ADN répétées en tandem d'au moins 20 pb, sont localisés de façon prédominante dans les régions subtélomériques (ROYLE *et al.* 1988).

Les locus microsatellites présentent un haut degré de polymorphisme dû à la variation du nombre de répétition du motif de base (ZHU *et al.* 2000, JARNE & LAGODA 1996). Ce polymorphisme permet l'accès à une quantité importante d'informations basées sur les fréquences alléliques. C'est la PCR (polymerase chain reaction, SAIKI *et al.* 1988) qui permet de les révéler "individuellement", fournissant ainsi des marqueurs spécifiques de

locus, codominants et polymorphes. Si un microsatellite n'est pas spécifique d'un locus, les régions qui les encadrent (dites flanquantes), par contre, le sont. Une paire d'amorces spécifique de ces régions flanquantes amplifiera donc ce seul microsatellite, dont le polymorphisme sera révélé par électrophorèse en gel d'acrylamide.

Les marqueurs microsatellites semblent posséder les caractéristiques attendues de bons marqueurs en génétique des populations, à savoir : transmission mendélienne, codominance, polymorphisme et neutralité.

En revanche, le développement et la caractérisation de ce type de marqueurs reste une étape assez longue et délicate puisque faisant intervenir des étapes de clonage et de séquençage (QUELLER *et al.* 1993).

Modèles de mutation

Il a rapidement été établi que les microsatellites étaient soumis à des taux de mutation très élevés expliquant leur grande variabilité. Afin de ne pas fausser l'interprétation des données populationnelles (ex. : homoplasie, apparition trompeuse d' " identité d'état " par suite de mutations parallèles, JARNE & LAGODA 1996), de nombreux modèles mutationnels propres à ces marqueurs ont été proposés.

Les observations moléculaires suggèrent que les mécanismes de mutation se produisent essentiellement lors de crossing-over inégaux (WOLFF *et al.* 1989) ou bien au cours de la réplication de l'ADN par phénomène de glissement de la polymérase suivi d'une absence de réparation (" Slipped Strand Mispairing " ou SSM, LEVINSON & GUTMAN 1987). Les taux de mutation estimés par différentes méthodes (estimation directe par comptage des mutations de pedigrees connus, estimation indirecte à partir du nombre d'allèles conservés dans une population en équilibre mutation-dérive) fournissent des valeurs de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-2} (AMOS *et al.* 1996, JARNE & LAGODA 1996). Concernant les modèles probabilistes de mutation, les théories restent discutées. Au modèle classique en nombre infini d'allèles (IAM) basé sur l'idée que chaque mutation introduit un allèle entièrement nouveau, s'opposent généralement le modèle de type pas-à-pas (ou SMM " stepwise mutation model " VALDES *et al.* 1993) et le modèle à deux phases (ou TPM " two phase model " DI RIENZO *et al.* 1994). Le modèle SMM suppose que chaque mutation ajoute ou retranche une unité de répétitions. Le modèle TPM incorpore le processus mutationnel du SMM, mais tient compte des mutations de plus d'une unité.

Application des microsatellites en génétique des populations

Dans le cadre d'études de structure des populations, les microsatellites s'avèrent aujourd'hui être un outil de choix. Hautement polymorphes, ils sont également codominants donnant ainsi accès aux analyses de parenté. De surcroît, ils correspondent à des séquences d'ADN non transcrites pour lesquelles l'hypothèse de neutralité est plus robuste que pour le produit de gènes comme c'est le cas des allozymes. De nombreuses études témoignent de leur utilisation dans le règne animal, depuis les populations humaines jusqu'aux poissons (salmonidés) en passant par les insectes sociaux (cf synthèse LAUNEY 1998). Seule contrainte à leur application, la possible présence d'allèles "nuls" (non visualisés). Ces derniers peuvent poser des problèmes dans l'identification de génotypes hétérozygotes et par conséquent fausser les estimations de taux d'hétérozygotie dans une population. L'existence de ces allèles nuls semble se justifier soit par des mutations dans les régions flanquantes (CALLEN *et al.* 1993), soit par des artefacts d'amplification dans le cas d'hétérozygote ayant des allèles de tailles très différentes (LAUNEY 1998).

Les marqueurs microsatellites (*Oedu* U2, *Oedu* T5, *Oedu* J12, *Oedu* H15, voir Annexe Tableau A) utilisés dans ce travail ont été identifiés et mis au point par LAUNEY (1998).

D. Analyses génétiques

Protocoles Extraction d'ADN

○ **Adultes et juvéniles**

Méthode Phénol-Chloroforme

Ce procédé classique d'extraction s'applique aux tissus conservés dans l'éthanol absolu. Il implique l'utilisation de solutions de phénol et de chloroforme. Il débute par une étape de lyse cellulaire. Un fragment de branchie (2mm²) est récupéré et soumis à l'action de la protéinase K (10µl/mg), le tout plongé dans 400µl de tampon d'extraction (NaCl 5M, Tris 1M pH 8, EDTA 0,5M pH 8, SDS 10%). Cette étape de digestion se poursuit une nuit au bain-marie à 55°C. Est ajouté ensuite le phénol (saturé pH 8), agent dénaturant des protéines qui permet de séparer efficacement les protéines des acides nucléiques. Le phénol est ensuite éliminé du mélange réactionnel. Au surnageant prélevé est alors ajouté le chloroforme (non miscible avec l'eau). La séparation des phases aqueuse et organique se fait par centrifugation. La phase aqueuse contient les acides nucléiques. Les acides nucléiques

peuvent être finalement récupérés sous forme solide à la suite de précipitation par l'alcool éthylique. Les culots d'ADN sont repris dans 50µl de TE (10:1) et sont conservés à -20°C.

○ Larves

La méthode précédemment décrite peut difficilement s'appliquer à l'extraction sur des organismes dont la taille n'excède 300µm. C'est pourquoi nous avons eu recours à une technique utilisant un tampon d'extraction composé de buffer X10, de détergent Tween 20 et d'eau distillée. A chaque larve individualisée et préalablement broyée est ajouté 50µl du tampon précité ainsi que 5µl de protéinase K (10µl/mg). Les larves sont ensuite mises à incuber 60 minutes à 55°C puis 20 minutes à 100°C.

Génotypage

La réaction de PCR se fait dans un volume final de 10µl contenant 5 µl de solution d'ADN et 5µl de mélange réactionnel (dNTP (2 mM), MgCl₂ (50mM), Taq polymérase, tampon (1X), amorces (1pM) voir Annexe, Tableau B). Le programme d'amplification se compose des étapes suivantes : 5 minutes à 95°C pour une dénaturation initiale, 30 cycles successifs (20 secondes à 95°C pour la dénaturation, 20 secondes à 53 ou 50°C selon les locus microsatellites pour la phase d'appariement et 30 secondes à 72°C pour l'élongation) puis une dernière étape de 3 minutes à 72°C pour l'élongation finale (annexe Tableau C).

La migration des produits amplifiés se fait sur un gel d'acrylamide (20 ml gel matrix 6,5%, 15 µl TEMED *sigma*, 150 µl APS (10%) à l'aide d'un séquenceur de type LICOR®. La solution tampon d'électrophorèse est du TBE 1X (Tris (89mM), Acide Borique (89mM), EDTA 2mM), ddH₂O). La lecture des génotypes est ensuite réalisée par l'intermédiaire du logiciel GENE PROFILER 4.0.

E. Analyses statistiques

Mesure de la variabilité génétique

Plusieurs paramètres ont été mesurés afin d'estimer la variabilité génétique au sein des différents groupes d'individus :

- le nombre d'allèles par locus et par échantillon,
- l'hétérozygotie observée (H_o) représentant la fréquence des individus hétérozygotes à chaque locus,

- l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de l'équilibre de HARDY-WEINBERG (Hn.b.). Ce dernier paramètre correspond à un estimateur d'hétérozygotie non biaisé (Nei 1987) tel que :

$$Hn.b. = [2n/(2n-1)].[(1-\sum x_i^2)]$$

avec x_i la fréquence du $i^{i\text{ème}}$ allèle, n étant la taille de l'échantillon. Le rapport $2n/(2n-1)$ permet de prendre en compte le biais d'échantillonnage.

Le calcul de ces paramètres a été réalisé par locus et pour tous les locus des populations considérées à l'aide du logiciel GENETIX (BELKHIR *et al.* 1996).

Afin de comparer la variabilité génétique entre les échantillons au travers de ces paramètres, nous avons utilisé une méthode qui reconstitue l'urne d'EWENS (considère une population à l'équilibre mutation/dérive telle que prédite par la théorie de l'échantillonnage d'EWENS (1972)) dont pourrait être issu l'échantillon observé et qui rééchantillonne des pseudo-échantillons dans cette urne. Pour que les résultats soient comparables d'un groupe à l'autre, la taille de sous-échantillonnage correspond à la taille du groupe le plus petit (population adulte composée de 68 individus). Ces résultats sont ensuite testés pour l'hypothèse nulle d'égalité des moyennes (cas d'échantillons de grande taille de variances inégales) (SOKAL & ROHLF 1995).

Enfin, nous avons calculé la fréquence des allèles nuls selon deux méthodes :

- méthode de CHAKRABORTY (CHAKRABORTY *et al.* 1992) reposant sur le déficit en hétérozygotes apparent, donnant une estimation de la fréquence des allèles nuls (r) à partir des valeurs d'hétérozygotie observée et attendue telle que :

$$r = (Hn.b. - Ho)/(Hn.b.+Ho)$$

- méthode de BROOKFIELD (BROOKFIELD 1996) qui, contrairement à la précédente, prend en compte l'existence des individus non amplifiés, considérés comme homozygotes pour l'allèle nul. Cette méthode définit l'estimateur (r) tel que :

$$r = \frac{A + \sqrt{A^2 + B}}{2(1 + Hn.b.)} \quad \text{où } A = Hn.b.(1+N) - Ho \text{ et } B = 4N(1 - Hn.b.^2)$$

Ces deux formules définissent des estimations respectivement minimales et maximales pour la fréquence des allèles nuls.

Mesure de la différenciation génétique

Deux indices sont calculés pour caractériser la différenciation génétique :

- l'indice de fixation de WRIGHT F_{is} qui mesure les écarts à l'équilibre de HARDY-WEINBERG à l'intérieur de chaque population (estimé selon WEIR & COCKERHAM 1984),
- l'indice de WRIGHT F_{st} qui mesure la différenciation génétique entre populations (également estimé selon WEIR & COCKERHAM 1984).

Ces calculs ont nécessité l'utilisation du logiciel GENETIX (<http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm>). Pour tester l'hypothèse nulle $F_{is}=0$, on effectue une permutation des allèles à l'intérieur des populations : pour chaque locus, une urne gamétique est construite à partir des allèles des individus de la population. Le tirage aléatoire dans cette urne permet de reconstruire les génotypes monolocus en simulant la panmixie. Pour tester l'hypothèse nulle $F_{st}=0$, on effectue des permutations des individus sur l'ensemble des échantillons. Les génotypes sont conservés, ce qui permet de s'affranchir de la non-dépendance des allèles à l'intérieur des individus quand le F_{is} est différent de 0. La valeur observée sur les données réelles est ensuite comparée à la distribution obtenue, et permet d'avoir une estimation de la probabilité d'obtenir une valeur supérieure ou égale à la valeur observée sous H_0 . Les tests ont été effectués avec 1000 permutations.

Analyse de paternité

Afin de déterminer le nombre de pères potentiels intervenant dans un événement de reproduction, une procédure de calcul sous logiciel PARENTAGE (EMERY *et al.* 2001) a été utilisée (<http://www.maths.abdn.ac.uk/~ijw>). Ce logiciel s'appuie sur le paradigme Bayésien dont les modèles probabilistes sont associés à des données définissant une distribution "à priori". Cette méthode consiste à attribuer avant toute connaissance sur la paternité différentes valeurs "a priori". Connaissant les génotypes de l'huître femelle et d'un certain nombre de ses larves, cette probabilité "à priori" peut être réestimée en probabilité "à posteriori".

Il s'agit d'ailleurs de l'intérêt majeur du logiciel qui, contrairement à d'autres méthodes plus classiques (détermination de paternité par vraisemblance MARSHALL *et al.* 1998), ne nécessite la connaissance que d'un seul des génotypes des parents potentiels (génotype de la mère dans notre cas).

Estimation de la taille efficace

L'effectif efficace N_e est un paramètre important pour décrire l'évolution d'une population naturelle et appréhender les problématiques de biologie de la conservation car il influence le rythme de consanguinité ainsi que la perte de variabilité génétique (LUIKART & CORNUET 1999). Une dérive génétique importante dans des populations de faible taille efficace peut conduire ainsi à une diminution de la diversité génétique.

Au sens large du terme, N_e est défini par le nombre d'individus participant au processus reproductif à un moment donné dans une population. Ce nombre est toujours inférieur au nombre total d'individus (N).

L'estimation de N_e pose cependant quelques difficultés dans les populations naturelles (WAPLES 1989) d'autant qu'il est lié au modèle de mutation considéré. Aucune méthode ne permet véritablement d'établir une estimation consensuelle. Cependant, N_e peut être calculé à partir de données démographiques ou génétiques (HARRIS & ALLENDORF 1989). Les méthodes démographiques nécessitent la connaissance d'informations préalables telles que la variance du succès reproducteur parfois délicat à obtenir pour de nombreuses espèces (LUIKART & CORNUET 1999). Les procédés génétiques sont plus traditionnellement utilisés et distinguent quatre grandes méthodes :

- perte d'hétérozygotie (HARRIS & ALLENDORF 1989),
- changement temporel des fréquences alléliques (WAPLES 1989),
- déséquilibre de liaison (HILL 1981),
- et plus récemment la méthode d'excès d'hétérozygotie (PUDOVKIN *et al.* 1996).

Nous nous sommes appuyés sur la méthode dite " temporelle " utilisant les changements temporels des fréquences alléliques dans des générations successives.

Cette méthode repose sur le concept suivant (LAUNEY 1998) : le changement des fréquences alléliques au cours du temps sous l'effet de la dérive permet d'estimer la taille efficace d'une population, à partir de l'observation des variances temporelles pour des locus sélectivement neutres. Le logiciel EPS (source : D. HEDGECKOCK et V. CHOW, Bodega Marine Laboratory, UC Davis, USA) a été utilisé pour calculer les N_e selon cette méthode. Ce logiciel donne une estimation de la taille efficace en se basant sur un nombre maximum de 15 allèles.

Cette estimation a été réalisée entre les adultes présents en 2001 et les juvéniles de la cohorte 4 recrutés en 2001.

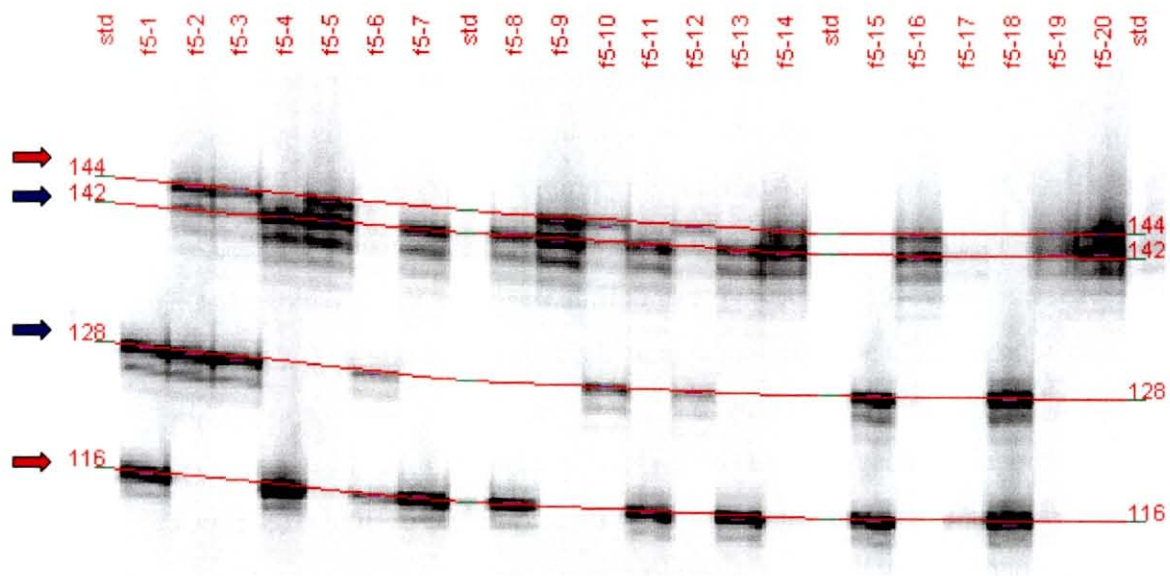


Figure 8 : Exemple de génotypage de larves pour le locus microsatellite J12
 - flèches bleues : allèles de la femelle F5 (hétérozygote)
 - flèches rouges : allèles "paternels"

III. RESULTATS

Au total, 672 individus juvéniles, 68 adultes et 320 larves ont été analysés. A partir de témoins dont on connaît la taille du microsatellite, les allèles aux différents locus ont été déterminés. La figure 8 montre en exemple le résultat d'une migration pour le locus J12 dans le cas de larves de la femelles F5.

A. Variabilité génétique

Le détail des fréquences alléliques par locus et par groupe d'individus est donné en annexe (Tableau D). Le Tableau 1 récapitule l'ensemble des paramètres généraux de l'analyse de variabilité.

Polymorphisme allélique

Le nombre d'allèles par locus est élevé quel que soit le locus envisagé, s'échelonnant de 21 à 31. Seul le locus H15 présente des nombres d'allèles sensiblement plus faibles (14 à 19).

La population adulte dont l'effectif échantillonné est le plus petit semble montrer un plus faible nombre d'allèles que les quatre cohortes qui entre elles ne semblent pas dépareiller. Ce résultat est observable à tous les locus ainsi qu'à l'analyse multilocus (le nombre moyen d'allèles est de 20,5 pour les adultes contre de 23,2 à 26 pour les cohortes).

Afin de pouvoir comparer rigoureusement les groupes d'individus sur la base du nombre d'allèles et de l'hétérozygotie attendue, nous avons procédé à un rééchantillonnage dont la taille correspond au groupe le plus petit (population adulte composée de 68 individus). Rééchantillonnage qui dans le cas présent correspond donc à un sous-échantillonnage (Tableaux 2 et 3).

La comparaison du nombre d'allèles rééchantillonnés (Tableau 2) ne montre aucune différence significative entre groupe d'individus. En effet, nous n'observons aucune différence entre adultes et cohorte de captage (quelle que soit la cohorte), pas plus qu'entre cohortes elles-mêmes.

Hétérozygotie

Concernant les valeurs de Hn.b., celles-ci varient de 0,909 à 0,944 aux locus T5, J12 et U2 et de 0,816 à 0,886 au locus H15.

Tableau 1 :

Paramètres généraux de l'analyse de variabilité génétique des cohortes et des adultes.

		adultes	cohorte1	cohorte 2	cohorte 3	cohorte 4
Nb _{individus}	Nombre d'individus analysés					
Nb _{allèles}	Nombre d'allèles dans l'échantillon					
H _{obs}	Hétérozygotie observée					
H _{exp}	Hétérozygotie attendue sous l'hypothèse d'équilibre d'Hardy-Weinberg					
H _{n.b.}	Hexp corrigée pour le biais de l'échantillonnage					
F _{is}	Indice de fixation estimé selon Weir et Cockerham (1984)					
	N	68	167	198	115	192
<hr/>						
T5	Nb _{individus}	64	162	192	108	174
	Nb _{allèles}	22	30	26	26	25
	H _{obs}	0.859	0.864	0.859	0.889	0.885
	H _{n.b.}	0.916	0.925	0.911	0.923	0.909
	F _{is}	0.062	0.066	0.056	0.037	0.026
		ns	*	**	ns	ns
<hr/>						
J12	Nb _{individus}	62	164	191	107	176
	Nb _{allèles}	21	24	28	25	26
	H _{obs}	0.807	0.878	0.848	0.897	0.869
	H _{n.b.}	0.919	0.911	0.928	0.928	0.931
	F _{is}	0.123	0.036	0.086	0.033	0.066
		**	ns	**	ns	**
<hr/>						
H15	Nb _{individus}	64	155	184	106	168
	Nb _{allèles}	14	17	19	15	17
	H _{obs}	0.641	0.677	0.728	0.698	0.696
	H _{n.b.}	0.816	0.858	0.886	0.868	0.861
	F _{is}	0.216	0.211	0.178	0.196	0.192
		**	**	**	**	**
<hr/>						
U2	Nb _{individus}	67	158	190	109	179
	Nb _{allèles}	25	28	31	27	30
	H _{obs}	0.836	0.892	0.926	0.908	0.844
	H _{n.b.}	0.937	0.932	0.934	0.940	0.944
	F _{is}	0.109	0.043	0.008	0.033	0.106
		**	*	ns	ns	**
<hr/>						
Multilocus	Nb _{allèles}	20.5	24.75	26	23.25	24.5
	H _{obs}	0.786	0.828	0.841	0.848	0.824
	H _{n.b.}	0.897	0.907	0.914	0.915	0.911
	F _{is}	0.125	0.087	0.081	0.073	0.096
		**	**	**	**	**

Les indices Fis sont suivis d'un test de significativité en effectuant un certain nombre de permutations (1000) sur le fichier de données. L'idée sous-jacente est d'obtenir la distribution de l'estimateur sous l'hypothèse nulle Ho. La valeur observée sur les données réelles est ensuite comparée à la distribution obtenue, et permet d'obtenir une estimation de la probabilité d'obtenir une valeur > ou = à la valeur observée sous Ho ; (ns) correspond à des valeurs non significatives de p, * de p<0,05 et ** p<0,001 après correction de Bonferroni sur les locus.

Sur l'analyse du tableau 1, la population adulte semble présenter une hétérozygotie observée inférieure aux quatre cohortes. Cette différence paraît sensiblement plus marquée sur les locus J12, H15 et U2 (analyse multilocus comprise) que sur le locus T5.

Le tableau 3 visant à comparer les groupes d'individus sur la base de l'hétérozygotie attendue ne montrent cependant aucune différence significative. De la même façon que pour les nombres d'allèles, nous n'observons aucune différence entre adultes et cohorte de captage (quel que soit la cohorte), pas plus qu'entre cohortes elles-mêmes.

Visant à mettre en évidence la notion de déficit en hétérozygotes, les valeurs de Fis (estimées selon WEIR & COCKERHAM, 1984) sont proposées. Celles-ci sont suivies d'un test statistique permettant de savoir si elles sont significativement différentes de 0. Sur l'ensemble des locus, tous les groupes d'individus observent un déficit. Ce déficit en hétérozygote est largement significatif pour le locus H15 et l'analyse multilocus et ce sur tous les groupes échantillonnés. Si nous nous intéressons maintenant aux groupes d'individus, il est difficile de déterminer une tendance puisque chaque groupe montre un Fis non significatif pour au moins un locus.

Fréquences d'allèles nuls

Le tableau E en annexe présente les fréquences des allèles nuls pour les locus T5, J12, H15 et U2. Les deux méthodes de calcul proposées définissent des estimations respectivement minimales et maximales de ces fréquences. Aux locus T5, J12 et U2, les valeurs de (r) s'échelonnent entre 0 et 7% selon la méthode de CHAKRABORTY *et al.* (1992) et entre 5 et 13% selon la méthode de BROOKFIELD (1996). Les fréquences au locus H15 sont relativement plus élevées, avec une moyenne de 11 % selon CHAKRABORTY et de 17% selon BROOKFIELD.

B. Différenciation génétique

Les valeurs de Fst par paire de groupes d'individus n'indiquent aucune différenciation entre cohortes ou même entre adultes et cohortes. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes de 0.

Tableau 2 :

Nombre d'allèles rééchantillonné par locus et par groupe d'individus et intervalle de confiance (entre crochet) estimés par bootstraps d'une urne d'Ewens. Le nombre d'allèles est corrigé sur la base de la taille d'échantillon la plus petite (68).

Nombre d'allèles					
	T5	J12	H15	U2	ML
N individus	68	68	68	68	68
adultes	21.68 [17;27]	21.33 [17;26]	14.13 [12;18]	26.23 [22;31]	20.84 [19;22,75]
cohorte1	25.60 [22;31]	21.76 [18;27]	14.82 [12;18]	23.23 [20;27]	21.35 [19,75;23,25]
cohorte 2	21.20 [18;25]	24.25 [21;29]	15.88 [14;19]	26.16 [22;30]	21.87 [20,5;23,5]
cohorte 3	22.84 [19;29]	23.71 [20;28]	15.36 [13;18]	25.24 [21;29]	21.78 [19,75;23,75]
cohorte 4	21.85 [18;26]	23.37 [20;27]	15.80 [13;19]	24.31 [21;28]	21.33 [19,5;23]

Tableau 3 :

Hétérozygotie (H n.b.) rééchantillonnée par locus et par groupe d'individus et intervalle de confiance (entre crochet) estimés par bootstraps d'une urne d'Ewens. Le nombre d'allèles est corrigé sur la base de la taille d'échantillon la plus petite (68).

Hétérozygotie					
	T5	J12	H15	U2	ML
N individus	68	68	68	68	68
adultes	0.900 [0,87 ; 0,92]	0.903 [0,87 ; 0,93]	0.812 [0,72 ; 0,87]	0.922 [0,88 ; 0,94]	0.884 [0,86 ; 0,90]
cohorte1	0.917 [0,90 ; 0,94]	0.902 [0,87 ; 0,93]	0.839 [0,79 ; 0,87]	0.922 [0,90 ; 0,94]	0.895 [0,88 ; 0,91]
cohorte 2	0.899 [0,88 ; 0,92]	0.918 [0,89 ; 0,94]	0.876 [0,85 ; 0,90]	0.924 [0,89 ; 0,94]	0.904 [0,89 ; 0,91]
cohorte 3	0.913 [0,89 ; 0,93]	0.914 [0,89 ; 0,93]	0.861 [0,82 ; 0,89]	0.929 [0,91 ; 0,94]	0.904 [0,89 ; 0,92]
cohorte 4	0.895 [0,86 ; 0,92]	0.915 [0,88 ; 0,94]	0.856 [0,81 ; 0,89]	0.931 [0,92 ; 0,94]	0.899 [0,89 ; 0,91]

C. Contribution parentale sur un événement de reproduction

Analyse de paternité

Le typage des larves de femelles incubantes initialement échantillonnées n'a pu donner de résultats satisfaisants. Certainement dû à un problème de conservation, le typage n'a abouti qu'à de trop rares et faibles signaux d'une présence d'ADN. D'autres femelles incubantes "ardoisées" ont alors été prélevées au mois de juillet 2002 sur le même site d'étude en baie de Quiberon. Malgré un protocole identique d'échantillonnage, le génotypage des larves s'est cette fois-ci révélé concluant. Il semblerait donc que ce soit le mode de conservation des tissus qui soit en cause. Ainsi 4 femelles (F1, F3, F5 et F7) accompagnées de 80 de leurs larves ont pu être analysées et ce pour 3 locus microsatellites (J12, H15 et U2).

Le nombre d'allèles trouvé chez les larves de ces 4 femelles est résumé dans le tableau ci-dessous.

	<i>J12</i>	<i>U2</i>	<i>H15</i>
<i>Larves de F1</i>	18	18	10
<i>Larves de F3</i>	5	7	6
<i>Larves de F5</i>	7	9	5
<i>Larves de F7</i>	5	4	4

Tableau 4 : Nombre d'allèles des larves de femelles incubantes aux 3 locus considérés.

Ce nombre d'allèles est variable d'une femelle à l'autre. Les larves de la femelle F1 présentent un nombre d'allèles compris entre 10 et 18 selon le locus envisagé, contre 4 à 9 allèles pour les larves des trois autres femelles. L'utilisation du logiciel PARENTAGE a permis de définir une estimation du nombre de pères potentiels pouvant intervenir dans un événement reproductif pour chacune des 4 femelles (Tableau 5).

	<i>Nombre de pères potentiels</i>
<i>Larves de F1</i>	10
<i>Larves de F3</i>	7-8
<i>Larves de F5</i>	4-7
<i>Larves de F7</i>	2

Tableau 5 : Nombre de pères impliqués dans un événement reproductif.

Conformément aux nombres d'allèles, les résultats affichés par le logiciel sont variables d'une femelle à l'autre mais attestent pour l'ensemble d'un nombre relativement faible de pères puisque n'excédant pas (pour la femelle F1) le nombre de 10. Pour la femelle F7 au contraire, l'existence de 4 à 5 allèles ne s'accorde qu'avec la présence de deux pères. Pour les deux autres femelles, le résultat n'est pas aussi tranché et n'offre qu'un intervalle établi entre 7 et 8 pères pour les larves de F3 et entre 4 et 7 pères pour les larves de F5.

Estimation de la taille efficace

Nous avons estimé la taille efficace de la population selon la méthode de WAPLES (1989). Le logiciel EPS prenant en compte un maximum de 15 allèles et dans la mesure où pour chaque allèle le nombre d'allèle observé dépasse 15, nous avons "poolé" certains de ces allèles. Nous avons ainsi choisi d'estimer la taille efficace en considérant les 15 allèles les plus fréquents. Les estimations de N_e sont données dans le tableau 6. La valeur multilocus est suivie d'intervalle de confiance à 95%. Une valeur négative est interprétée comme infinie.

J12	76.15
U2	74.20
H15	157.49
T5	-299.76

α multilocus : **$N_e=135.03$** [44.14 ; -924.38]

Tableau 6 : Estimations de N_e pour chaque locus et l'ensemble des locus.

IV. DISCUSSION

Intérêt des marqueurs microsatellites dans le cadre d'une étude de variabilité génétique intrapopulation

Déjà souligné par VIARD *et al.* (1996) pour de nombreuses espèces, l'intérêt de l'utilisation des marqueurs microsatellites dans la caractérisation de la variabilité génétique intrapopulation est particulièrement grand. En effet, ce type de marqueurs révèle une variabilité plus importante que les locus enzymatiques classiquement utilisés. Pour preuve, JAZIRI *et al.* (1987) ont mis en évidence sur la base d'une étude de 10 populations d'*Ostrea edulis* avec 10 locus enzymatiques un polymorphisme de 3 allèles par locus en moyenne. Plus récemment, SAAVEDRA *et al.* (1995) ont trouvé un nombre moyen d'allèles compris entre 1,8 et 2,8 pour des locus allozymes chez cette même espèce. Au cours de notre étude, nous avons révélé un nombre moyen de 23,7 allèles par locus microsatellites et par population. Résultat dont l'ordre de grandeur confirme les données déjà recueillies par LAUNEY (1998) et MIRA (2001). Parallèlement, les taux d'hétérozygotie (Hn.b.) sont également plus élevés pour les marqueurs microsatellites.

Les marqueurs microsatellites possèdent par conséquent les caractéristiques attendues de "bons" marqueurs en génétique des populations. Ils cumulent en effet différentes propriétés : transmission mendélienne, codominance et neutralité mais auxquelles s'ajoute la détection d'un fort polymorphisme. Grâce à ce polymorphisme, les microsatellites sont un outil puissant pour l'identification des individus et par conséquent pour les analyses de parenté.

Implication de la notion de consanguinité pour la compréhension des relations hétérozygotie / valeur sélective et des déficits en hétérozygotes dans les populations naturelles de bivalves marins

Cette étude, appliquée à une problématique de génétique des populations a pour objectif de compléter la connaissance des mécanismes biologiques (reproductifs) dans les populations de bivalves marins et plus spécifiquement dans les populations d'huîtres plates.

Elle fait suite à des travaux effectués en 2001 par MIRA sur une population issue de Méditerranée dont les objectifs étaient déjà d'observer et de comprendre l'implication du phénomène de consanguinité. Consanguinité souvent énoncée (au moins de façon hypothétique) dans les processus décrivant l'existence d'un déficit d'hétérozygotie et d'une relation positive entre hétérozygotie et valeur sélective.

Dans le cas d'espèces à sexes séparés, une consanguinité partielle peut être produite par croisement d'individus apparentés (HEDRICK & COCKERHAM 1986). Une conséquence directe de ce régime particulier de reproduction est l'apparition d'un déficit d'hétérozygotie et une augmentation de l'homozygotie pour des allèles délétères récessifs. Ceci conduit à une relation positive entre hétérozygotie individuelle et valeur sélective (fitness). En résumé, l'homozygotie provoquée par la consanguinité entraîne celle d'un certain nombre de gènes délétères récessifs offrant un désavantage sélectif aux homozygotes (LAUNEY 1998).

Les caractéristiques de la reproduction des espèces de bivalves marins (huîtres plates comprises) ne semblent pas, à priori, favoriser la présence de consanguinité (en population naturelle).

Or les études menées par LAUNEY (LAUNEY *et al.*, sous presse) et MIRA (2001) sur une population méditerranéenne ont montré, de part l'implication d'un faible nombre de géniteurs efficaces à la base d'un événement de reproduction des conditions favorables à la présence de consanguinité offrant ainsi un appui à la notion de superdominance associative.

L'étude de la variabilité intrapopulation ne nous a pas permis de déceler une perte de diversité chez les cohortes recrutées durant l'été 2001 par rapport à l'échantillon d'adultes de référence (contrairement à l'observation de LAUNEY sur une population de 1994). Cette diversité, que ce soit au niveau du nombre d'allèles que de l'hétérozygotie (Hn.b.) n'est pas significativement différente d'un groupe d'échantillonnage à l'autre (pas d'effet WAHLUND temporel visible). Nous aurions pu nous attendre à ce que la cohorte correspondant à la période totale de captage ait une plus grande variabilité génétique que chacune des autres cohortes, or ce n'est pas le cas.

Aucune structuration temporelle n'est également apparue. Les valeurs de F_{st} calculées par paire de groupe d'individus sont négligeables. Autant de paramètres qui n'indiquent pas un faible nombre de géniteurs à l'origine d'une cohorte de recrutement.

Même si le N_e estimé de 135 est relativement important, il est difficile de conclure car l'intervalle de confiance estimé est très grand (de 44 à l'infini !). Dans une publication de 2001, LAUNEY *et al.* ont estimé un N_e de 464 entre deux populations adultes de 1989 et 1993 issues du même site en baie de Quiberon. Comparé à ce N_e de 464, le N_e de 135 de notre étude offre une estimation supposée sous-estimée dans la mesure où il n'est pas

possible entre adultes et descendants directs de prendre en compte la notion de génération chevauchante et le fait que des individus peuvent se reproduire plusieurs fois.

Il apparaît intéressant de discuter de la validité de cet estimateur. En effet, cette méthode reposant sur les changements temporels des fréquences alléliques dans des générations successives ne s'applique que dans la mesure où la population est isolée, ne subissant pas de migration (WAPLES 1989). Enfin, ce type de méthode ne tient pas compte de situations comme les cas de générations chevauchantes. Récemment, de nouvelles analyses incorporant les nombreuses informations fournies par les microsattellites permettent d'estimer conjointement la taille efficace d'une population et le rythme de migration (BEERLI & FELSENSTEIN 1999, VITALIS & COUVET 2001). Ce type d'analyse basée sur le maximum de vraisemblance pourrait être appliqué dans une prochaine étude afin de mieux apprécier l'estimation de la taille efficace.

Enfin, il est intéressant de constater que l'analyse de paternité définit un nombre restreint de mâles susceptibles de féconder une même femelle (ce nombre est comparable à celui de la population méditerranéenne (MIRA 2001) où 3 femelles ont été étudiées). Il ne s'agit ici que d'une analyse portant sur 4 femelles. La représentativité de celles-ci peut donc être mise en cause, d'autant qu'il s'agit de femelles incubantes prélevées au cours de la saison de reproduction 2002, saison au cours de laquelle l'impact de la reproduction peut avoir été différent sur le naissain recruté en 2002 par rapport à 2001. Ce résultat reste donc à confirmer. Il suggère que la dispersion des gamètes mâles peut être limitée sur la distance ou bien, que les mâles participent à la fécondation de façon asynchrone dans le temps. Il est aussi possible que cette faible dispersion gamétique soit compensée par une dispersion larvaire importante.

Excepté sur la base de l'analyse de paternité, la notion de consanguinité évoquée est difficilement identifiable chez les groupes adultes et juvéniles de cette étude. L'hypothèse d'un effet WAHLUND temporel est également réfutée (valeurs de F_{st} inter-cohortes trop faibles). Les résultats obtenus sur la population d'huîtres plates méditerranéennes (1994) semblent revêtir un caractère exceptionnel. Il est également probable qu'il ne s'agisse que d'un effet très local. Quoi qu'il en soit, d'autres explications aux déficits d'hétérozygotes observés peuvent être évoquées. Notamment comme l'ont déjà souligné LAUNEY (1998) et MIRA (2001) la présence d'allèles nuls. Nous avons ici déterminé des fréquences élevées pour ces allèles et particulièrement pour le locus H15 (11 à 17% suivant les populations).

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude d'une population naturelle d'huître plate à trois stades de développement a permis au cours de cette étude d'aborder une problématique de génétique des populations liant diversité génétique et dynamique de recrutement. Les bivalves marins constituent un modèle unique de biologie. L'outil moléculaire (les microsatellites) permet d'approfondir considérablement les connaissances à ce sujet. L'hypothèse de croisements consanguins à l'origine d'une relation positive entre hétérozygotie et valeur sélective ou encore de déficits en hétérozygotes n'a pu ici trouver les mêmes appuis qu'au cours de l'étude précédente sur une population méditerranéenne. Il est difficile de généraliser l'une ou l'autre des études. Il ressort cependant que la dispersion gamétique (mâle) reste limitée, et dans le cas où cette dernière n'est pas contre-balançée par une forte dispersion larvaire, les conditions de consanguinité semblent renforcées.

Afin d'approfondir ces résultats, il serait souhaitable de retravailler sur ces populations avec un effort particulier sur les stades larvaires. L'objectif étant de confirmer le nombre de mâles intervenant dans un événement reproductif.

Egalement envisageable, l'intégration d'une expérience visant à montrer l'existence d'une corrélation positive entre hétérozygotie et valeur sélective (croissance). Enfin, il pourrait être intéressant de suivre les mécanismes reproductifs d'une population en laboratoire (écloserie) et de les comparer aux populations naturelles. Il est en effet possible en écloserie de maîtriser certains paramètres, notamment le génotype des géniteurs potentiels. Ceci permettrait à double titre : de déterminer combien de parents contribuent à un événement reproductif, et de diminuer les efforts de typage en optimisant le nombre d'allèles différents dans la population.

BIBLIOGRAPHIE

AMOS W., SAWCER S.J., FEAKES R.W., RUBINZTEIN D.C. : Microsatellites shows directional bias and heterozygote instability. *Nature Genetics*, 13, pp. 390-391, **1996**.

BELKHIR K., BORSA P., GOUDET J., CHIKI L., BONHOMME F. : Genetix, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations, **1996**.

BEERLI P., FELSENSTEIN : Maximum likelihood estimation of migration rates and population numbers of two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152, pp. 763-773, **1999**.

BIERNE N., LAUNEY S., NACIRI-GRAVEN Y., BONHOMME F. : Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, 148, pp. 1893-1906, **1998**.

BIERNE N., BEUZART I., VONEAU V., BONHOMME F., BÉDIER E., AQUACOP. : Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 184, pp. 203-219, **2000**.

BLANC F., JAZIRI H., DURAND P. : Isolement génétique et taxonomie des huîtres plates dans une lagune du sud de la Méditerranée occidentale. *C. R. Acad. Sci. Paris III*, 303, pp. 207-210, **1986**.

BORSA P. : Génétique des populations en milieu lagunaire : la palourde dans l'étang de Thau (Méditerranée) . *Université Paris VI*, **1990**.

BROOKFIELD J.F.Y. : A simple new method for estimating null alleles frequency from heterozygote deficiency. *Molecular ecology*, 5, pp. 453-455, **1996**.

CALLEN D.F., THOMPSON A.D., SHEN Y., PHILLIPS H.A., RICHARDS R.I., MULLEY J.C., SUTHERLAND G.R. : Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.*, 52, pp. 922-927, **1993**.

CHAKRABORTY R., DE ANDRADE M., DAIGER S.P., BUDOWLE B. : Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, 56, pp. 45-57, **1992**.

DAVID P. : Structures génétiques et relation génotype-phénotype en milieu marin : le cas du bivalve *Spisula ovalis*. *Mémoire de Thèse de Doctorat*, **1996**.

DIAZ-ALMELA E., BOUDRY P., LAUNEY S., BONHOMME F., LAPEGUE S. : Comparison of Mitochondrial DNA and microsatellites variation along the range of the European flat oyster *Ostrea edulis*, en préparation.

DIEHL W.J., KOEHN R.K. : Multiple locus heterozygosity, mortality and growth in a cohort of *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 88, pp. 265-371, **1985**.

DI RIENZO A., PETERSON A.C., GARZA J.C., VALDES A.M., SLATKIN M., FREIMER N.B. : Mutation processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 91, pp. 3166-3170, **1994**.

EMERY A.M., WILSON I.J., CRAIG S., BOYLE P.R., NOBLE L.R. : Assignment of paternity groups without access to parental genotype : multiple mating and developmental plasticity in squid. *Molecular Ecology*, 10, pp. 1265-1278, **2001**.

EWENS W.J. : Sampling theory of selectively neutral alleles. *Theory Population Biology*, 3, pp. 87-112, **1972**.

FÉRAL J.P. : How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity ? *J. Exp. Mar. Bio. Eco.*, 268, pp. 121-145, **2002**.

FIELD D., WILLS C. : Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 263, pp. 209-215, **1996**.

FOLTZ D.W. : Null alleles as possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution*, 40(4), pp. 869-870, **1986**.

GAFFNEY P.M., SCOTT T.M., KOEHN R.K., DIEHL W.J. : Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot Clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 124, pp. 687-699, **1990**.

GARDNER J.P.A. : Null Alleles and Heterozygosity Deficiencies among Musseles (*Mytilus edulis* and *M.galloprovincialis*) of two sympatric Populations. *Malacologia*, 34, pp. 99-106, **1992**.

GOULLETQUER P., HERAL M. : Marine molluscan production trends in France : from fisheries to aquaculture. *U.S. Dep. Commer., NMFS*, pp. 137-164, **1997**.

GRIZEL H. : Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné, et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse d'état. *Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II*, **1985**.

HAAG W.R., GARTON D.W. : Variation in genotype frequencies during the life history of the bivalve, *Dreissena polymorpha*. *Evolution*, 49(6), pp. 1284-1288, **1995**.

HARRIS R.B., ALLENDORF F.W. : Genetically effective population size of large mammals : an assessment of estimators. *Conserv. Biol.*, 3, pp. 181-191, **1989**.

HEDRICK P., COCKERHAM C.C. : Partial inbreeding : equilibrium heterozygosity and the heterozygosity paradox. *Evolution*, 40, pp. 856-861, **1986**.

HERAL M. : L'ostréiculture française traditionnelle. In *Aquaculture*, (G. Barnabé, ed.), Techniques et documentation (Lavoisier) Paris, **1986**.

HILL W.G. : Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity*, 33, pp. 229-239, **1981**.

JARNE P., LAGODA P.J.L. : Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, pp. 424-429, **1996**.

JAZIRI H. : Biogéographie et polymorphisme enzymatique chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. Mémoire de DEA., USTL, **1985**.

JAZIRI H., DURAND P., BLANC F. : Genetic diversity between and within population of the European oyster, *Ostrea edulis*. *World symposium on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture*, Bordeaux 27-30 may, pp.177-187, **1987**.

JAZIRI H. : Variations génétiques et structuration biogéographique chez un bivalve marin : l'huître plate *Ostrea edulis* (L.) (PhD dissertation), *Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc*, **1990**.

JOHANNESSON K., RODSTROM E.M., AASE H. : Low genetic variation in Scandinavian populations of *Ostrea edulis* L. - possible causes and implications. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 128, pp. 177-190, **1989**.

KOEHN R.K., SHUMWAY S.E. : A genetic/physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Marine Biology Letters*, 3, pp. 35-42, **1982**.

LAUNEY S. : 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. *Institut National Agronomique Paris Grignon, Mémoire de Thèse de Doctorat*, 108 p., **1998**.

LAUNEY S., HEDGECOCK D. : High genetic load in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 159, pp. 255-262, **2001**.

LAUNEY S., BARRE M., GERARD A., NACIRI-GRAVEN Y. : Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populatins of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genet. Res. Camb.*, 78, pp. 259-270, **2001**.

LAUNEY S., LEDU C., BOUDRY P., BONHOMME F., NACIRI-GRAVEN Y. : Geographic structure in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L, as revealed by microsatellite polymorphism. *J. Hered.*, in press.

LE PENNEC M., MORAGA D., BLANC F., PICHOT P., THIRIOT-QUIEVREUX C. : Recherches de différences morphogénétiques, biochimiques et cytogénétiques entre *Ostrea edulis* sensu stricto et *Ostrea edulis* "pied de cheval". *Vie Marine*, 7, pp. 29-39, **1985**.

LEVINSON G., GUTMAN A.G. : Slipped-Strand Mispairing : A major Mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4, pp. 203-221, **1987**.

LUIKART G., CORNUET J.M. : Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics*, 151, pp. 1211-1216, **1999**.

MARSHALL T.C., SLATE J., KRUK L.E.B., PEMBERTON J.M. : Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, pp. 575-584, **1998**.

MIRA DA SILVA S.M. : La variabilité génétique chez l'huître plate : *Ostrea edulis* (L.1758) : Inférence du nombre de géniteurs instantané d'une population. *Mémoire de DEA*, Université Montpellier II, **2001**.

OHTA T. : Associative overdominance caused by linked decriminal mutations. *Genetical Research*, 18, pp. 277-286, **1971**.

PALUMBI S.R. : Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25, pp. 547-572, **1994**.

POGSON G.H., FEVOLDEN S.E. : DNA heterozygosity and growth rate in the Atlantic cod *Gadus morhua* (Linné). *Evolution*, 52, pp. 915-920, **1998**.

POGSON G.H., ZOUROS E. : Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in scallop *Placopecten magellanicus* : a test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics*, 137, pp. 221-231, **1994**.

PUDOVKIN A.I., ZAYKIN D.V., HEDGECOCK D. : On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics*, 144, pp. 383-387, **1996**.

QUELLER D.C., STRASSMANN J.E., HUGHES C.R. : Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, pp. 285-288, **1993**.

QUERO J.C., VAYNE J.J. : Les fruits de la Mer et plantes marines des pêches françaises. *Les encyclopédies du naturaliste*, Ed. Delachaux Niestlé, **1998**.

ROYLE N.J., CLEARKSON R.E., WONG Z., JEFFREYS A.J. : Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics*, 3, pp. 352-360, **1988**.

SAAVEDRA C., ZAPATA C., GUERRA A., ALVAREZ G. : Genetic structure of populations of flat oyster (*Ostrea edulis* [Linné, 1758]) from the NW of the Iberian Peninsula. *Investigation Pesq*, 51, pp. 225-241, **1987**.

SAAVEDRA C., ZAPATA C., GUERRA A., ALVAREZ G. : Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.*, 115, pp. 85-95, **1993**.

SAAVEDRA C., ZAPATA C., ALVAREZ G. : Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 122, pp. 95-104, **1995**.

SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARD S.J., HIGUCHI R., HORN G.T. MULLIS K.B., ERLICH H.A. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, pp. 487-491, **1988**.

SOKAL R.R., ROHLF F.J. : Biometry, Third Edition, 40, pp. 402-403, **1995**.

SMOUSE P.E. : The fitness consequences of multiple-locus heterozygosity under the multiplicative overdominance and inbreeding depression models. *Evolution*, 40, pp. 946-957, **1986**.

THIRIOT-QUIÉVREUX C., POGSON G.H., ZOUROS E. : Genetics of growth rate variation in bivalves : aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome*, 35, pp. 39-45, **1992**.

TÓTH G., GÁSPÁRI Z., JURKA J. : Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes : Survey and Analysis. *Genome Research*, 10, pp. 967-981, **2000**.

VALDES A.M., SLATKIN M., FREIMER N.B. : Alleles frequencies at microsatellite loci : the Stepwise Mutation Model revisited. *Genetics*, 133, pp. 737-749, **1993**.

VIARD F, BREMOND P., LABBO R., JUSTY F., DELAY B., JARNE P. : Microsatellites and the Genetics of Highly Selfing Populations in the Freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Genetics*, 142, pp. 1237-71247, **1996**.

VITALIS R., COUVET D. : Estimation of effective population size and migration rate from one- and two-locus identity measures. *Genetics*, 157, pp. 911-925, **2001**.

WAPLES R.S. : A Generalised Approach for Estimating Effective Population Size from Temporal Changes in Allele Frequency. *Genetics*, 121, pp. 379-391, **1989**.

WEIR B.S., COCKERHAM C.C. : Mixed self and random mating at two loci. *Genetical research*, 21, pp. 247-262, **1973**.

WEIR B.S., COCKERHAM C.C. : Estimating F-statistics for analysis of population structure. *Evolution*, 38, pp. 1358-1370, **1984**.

WILKINS N.P., MATHERS N.F. : Enzyme polymorphisms in the European oyster, *Ostrea edulis* L. *Anim Blood Groups Biochem Genet*, 4, pp. 41-47, **1973**.

WINTERØ A.K., FREDHOLM M., THOMPSEN P.D. : Variable (dG-dT)_n – (dC-dA)_n in the porcine genome. *Genomics*, 12, pp. 281-288, **1992**.

WOLFF R.K., PLAETKE R., JEFFREYS A.J., BLANC R. : Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics*, 5 (2), pp. 382-384, **1989**.

ZHU Y., STRASSMANN J.E., QUELLER D.C. : Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genet. Res., Camb*, 76, pp. 227-236, **2000**.

ZOUROS E., FOLTZ D.W. : Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalv molluscs. *Malacologia*, 25, pp. 583-591, **1984**.

ANNEXES

Tableau A : Caractéristiques des motifs microsatellites utilisés.

Locus	Motif	Gamme de taille des allèles (pb)	Température appariement
Oedu J12	(GT) ₁₄	116-172	50°C
Oedu H15	(ATCT) _n	165-237	50°C
Oedu U2	(CA) ₂₁ (GA) ₁₇	146-210	50°C
Oedu T5	(CA) ₁₅	102-172	53°C

Tableau B : Mélange réactionnel PCR.

Produit	Volume (µl) pour 1 individu (locus T5)		Volume (µl) pour 1 individu (locus H15, U2)		Volume (µl) pour 1 individu (locus J12)	
	<i>Adulte</i>	<i>Larve</i>	<i>Adulte</i>	<i>Larve</i>	<i>Adulte</i>	<i>Larve</i>
MgCl₂ (50 mM)	1	-	1	1,1	1	1,1
Buffer	1	-	1	1,1	1	1,1
Amorce 1 (1 pM)	1	-	0,5	0,7	0,3	0,4
Amorce 2 (1 pM)	1	-	0,5	0,7	0,3	0,4
Taq	0,2	-	0,2	0,4	0,2	0,3
dNTP (2 mM)	0,5	-	0,5	0,7	0,5	0,7
H₂O	0,3	-	1,3	0	1,7	0
AND	5	-	5	5,3	5	6
TOTAL	10	-	10	10	10	10

Tableau C : Programme d'amplification

	Températures (C°)	Durée
1	95	5 minutes
2	95	20 secondes
3	T° appariement	20 secondes
4	72	30 secondes
5	72	3 minutes

} 30 cycles

Tableau D : Fréquences alléliques par locus et par groupe d'individus

Locus	Allèles	Cohorte1	Cohorte2	Cohorte3	Adultes	Cohorte4
<i>Oedu T5</i>						
	102	0.0031	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	106	0.1512	0.1354	0.1065	0.1250	0.1638
	112	0.0154	0.0078	0.0139	0.0156	0.0374
	114	0.0000	0.0026	0.0000	0.0000	0.0000
	116	0.0000	0.0000	0.0046	0.0000	0.0000
	118	0.0864	0.0807	0.0741	0.0859	0.0891
	120	0.0062	0.0026	0.0046	0.0000	0.0057
	122	0.0093	0.0130	0.0046	0.0078	0.0086
	124	0.1358	0.1719	0.1759	0.1719	0.1810
	126	0.0309	0.0208	0.0139	0.0234	0.0172
	128	0.0401	0.0443	0.0370	0.0234	0.0374
	130	0.0154	0.0156	0.0093	0.0234	0.0144
	132	0.0401	0.0495	0.0509	0.0391	0.0603
	134	0.1080	0.1276	0.1019	0.1094	0.0920
	136	0.0340	0.0339	0.0602	0.0156	0.0316
	138	0.0772	0.0964	0.0741	0.1250	0.0776
	140	0.0401	0.0547	0.0509	0.0391	0.0230
	142	0.0340	0.0234	0.0463	0.0313	0.0316
	144	0.0123	0.0156	0.0370	0.0391	0.0259
	146	0.0185	0.0156	0.0463	0.0391	0.0287
	148	0.0278	0.0156	0.0185	0.0156	0.0086
	150	0.0247	0.0208	0.0185	0.0000	0.0115
	152	0.0216	0.0234	0.0185	0.0391	0.0172
	154	0.0093	0.0104	0.0046	0.0078	0.0172
	156	0.0062	0.0078	0.0093	0.0000	0.0086

158	0.0123	0.0000	0.0093	0.0000	0.0057
160	0.0154	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
162	0.0062	0.0026	0.0046	0.0078	0.0029
164	0.0031	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
166	0.0062	0.0052	0.0046	0.0000	0.0000
168	0.0031	0.0000	0.0000	0.0078	0.0029
170	0.0000	0.0026	0.0000	0.0078	0.0000
172	0.0062	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Oedu J12

116	0.0701	0.0681	0.0935	0.1210	0.0511
118	0.0030	0.0052	0.0000	0.0000	0.0199
120	0.0000	0.0052	0.0093	0.0000	0.0028
122	0.0000	0.0079	0.0047	0.0000	0.0114
124	0.2256	0.1963	0.1869	0.1935	0.1847
126	0.0183	0.0183	0.0187	0.0000	0.0313
128	0.0274	0.0366	0.0421	0.0242	0.0369
130	0.0061	0.0236	0.0327	0.0081	0.0142
132	0.0549	0.0654	0.0794	0.0242	0.0625
134	0.0488	0.0471	0.0654	0.0161	0.0568
136	0.0305	0.0262	0.0467	0.0565	0.0284
138	0.0213	0.0236	0.0280	0.0403	0.0256
140	0.0366	0.0445	0.0140	0.0242	0.0426
142	0.1037	0.0681	0.0467	0.0806	0.0682
144	0.0732	0.0602	0.0514	0.0968	0.0795
146	0.0610	0.0524	0.0374	0.0565	0.0568
148	0.0274	0.0602	0.0561	0.0403	0.0455
150	0.0457	0.0366	0.0327	0.0403	0.0483
152	0.0244	0.0288	0.0561	0.0403	0.0284
154	0.0396	0.0262	0.0280	0.0645	0.0313
156	0.0213	0.0314	0.0280	0.0242	0.0256
158	0.0244	0.0236	0.0140	0.0081	0.0142
160	0.0244	0.0105	0.0093	0.0242	0.0114
162	0.0030	0.0183	0.0093	0.0081	0.0085
164	0.0061	0.0052	0.0047	0.0000	0.0114
166	0.0000	0.0026	0.0000	0.0000	0.0000
168	0.0000	0.0026	0.0000	0.0000	0.0000
170	0.0030	0.0052	0.0000	0.0000	0.0000
172	0.0000	0.0000	0.0047	0.0081	0.0028

Oedu H15

165	0.0032	0.0054	0.0000	0.0000	0.0000
169	0.0000	0.0054	0.0000	0.0078	0.0089
173	0.2806	0.2283	0.2547	0.3828	0.2946
177	0.0258	0.0245	0.0236	0.0000	0.0208
181	0.0161	0.0027	0.0189	0.0078	0.0119
185	0.0258	0.0462	0.0189	0.0391	0.0179
189	0.0484	0.0707	0.0708	0.0781	0.0625
193	0.0290	0.0326	0.0330	0.0625	0.0387

197	0.0194	0.0190	0.0236	0.0156	0.0357
201	0.1452	0.0951	0.0991	0.0781	0.0804
205	0.0484	0.0571	0.0377	0.0391	0.0506
209	0.0161	0.0299	0.0377	0.0234	0.0238
213	0.1484	0.1304	0.1887	0.0859	0.1310
217	0.0677	0.0543	0.0283	0.0547	0.0714
221	0.1032	0.1440	0.1132	0.1172	0.1220
225	0.0097	0.0380	0.0425	0.0000	0.0208
229	0.0097	0.0054	0.0094	0.0078	0.0060
233	0.0032	0.0082	0.0000	0.0000	0.0030
237	0.0000	0.0027	0.0000	0.0000	0.0000

Oedu U2

146	0.0032	0.0000	0.0000	0.0075	0.0000
148	0.0032	0.0000	0.0046	0.0000	0.0028
150	0.0000	0.0079	0.0138	0.0000	0.0000
152	0.0032	0.0053	0.0183	0.0000	0.0084
154	0.0158	0.0053	0.0183	0.0597	0.0168
156	0.1677	0.1789	0.1651	0.1866	0.1341
158	0.0854	0.0579	0.0413	0.0448	0.0782
160	0.0791	0.0711	0.0688	0.0373	0.0587
162	0.0443	0.0658	0.0688	0.0448	0.0447
164	0.0443	0.0342	0.0321	0.0224	0.0419
166	0.0348	0.0500	0.0367	0.0373	0.0196
168	0.0285	0.0368	0.0596	0.0522	0.0391
170	0.0316	0.0579	0.0642	0.0373	0.0615
172	0.0475	0.0395	0.0505	0.0672	0.0531
174	0.0443	0.0447	0.0505	0.0522	0.0810
176	0.0633	0.0395	0.0367	0.0373	0.0559
178	0.0570	0.0421	0.0459	0.0597	0.0335
180	0.0791	0.0684	0.0459	0.0597	0.0419
182	0.0316	0.0316	0.0367	0.0224	0.0475
184	0.0348	0.0342	0.0367	0.0299	0.0140
186	0.0190	0.0105	0.0229	0.0299	0.0223
188	0.0032	0.0158	0.0183	0.0224	0.0363
190	0.0222	0.0105	0.0046	0.0299	0.0223
192	0.0158	0.0158	0.0092	0.0149	0.0168
194	0.0000	0.0105	0.0000	0.0224	0.0112
196	0.0222	0.0132	0.0092	0.0000	0.0279
198	0.0000	0.0105	0.0321	0.0000	0.0000
200	0.0032	0.0132	0.0046	0.0000	0.0084
202	0.0095	0.0079	0.0046	0.0075	0.0056
204	0.0032	0.0079	0.0000	0.0075	0.0056
206	0.0000	0.0026	0.0000	0.0075	0.0028
208	0.0000	0.0053	0.0000	0.0000	0.0000
210	0.0032	0.0053	0.0000	0.0000	0.0028
212	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0056

Tableau E : Estimation des fréquences d'allèles nuls aux 4 locus en fonction des taux d'hétérozygotie observée (Ho), attendue (Hn.b.) et de la fréquence des individus n'ayant pas été amplifiés (N) ; selon BROOKFIELD (1996) et CHAKRABORTY (1992)

T5	Hn.b.	Ho	N	rC	rB
Adultes	0,92	0,86	0,06	0,03	0,09
cohorte 1	0,93	0,86	0,03	0,03	0,06
cohorte 2	0,91	0,86	0,03	0,03	0,06
cohorte 3	0,92	0,89	0,06	0,02	0,08
cohorte 4	0,91	0,89	0,09	0,01	0,10

J12	Hn.b.	Ho	N	rC	rB
Adultes	0,92	0,81	0,09	0,07	0,13
cohorte 1	0,91	0,88	0,02	0,02	0,05
cohorte 2	0,93	0,85	0,04	0,05	0,08
cohorte 3	0,93	0,90	0,07	0,02	0,08
cohorte 4	0,93	0,87	0,08	0,03	0,10

H15	Hn.b.	Ho	N	rC	rB
Adultes	0,82	0,64	0,06	0,12	0,16
cohorte 1	0,86	0,68	0,07	0,12	0,16
cohorte 2	0,89	0,73	0,07	0,10	0,15
cohorte 3	0,87	0,70	0,08	0,11	0,16
cohorte 4	0,86	0,70	0,13	0,11	0,19

U2	Hn.b.	Ho	N	rC	rB
Adultes	0,94	0,84	0,02	0,06	0,07
cohorte 1	0,93	0,89	0,05	0,02	0,07
cohorte 2	0,93	0,93	0,04	0,00	0,05
cohorte 3	0,94	0,91	0,05	0,02	0,07
cohorte 4	0,94	0,84	0,07	0,06	0,10