

Contrat de projets Etat-Région Poitou-Charentes 2007 – 2013

Convention n° 08/RPC-A-29 du 19 mai 2008

Laboratoire Génétique et Pathologie

Projet

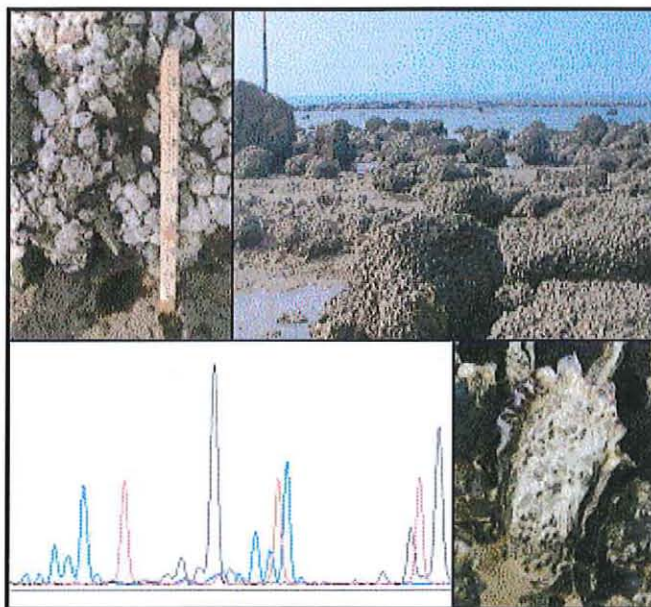
« Développement durable des Pertuis charentais »

Rapport d'avancement des travaux 2011

ifremer

Variabilité génétique des stocks d'huîtres dans les Pertuis charentais

Florence CORNETTE et Sylvie LAPEGUE



Octobre 2011

REMERCIEMENTS

Les travaux scientifiques présentés dans ce rapport ont été réalisés avec un soutien financier de la Région Poitou-Charentes et du Feder.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION.....	4
II. MATERIEL ET METHODES	4
1. Matériel biologique	4
2. Extraction d'ADN.....	7
3. PCR des marqueurs microsatellites.....	7
4. Génotypage	8
5. Analyse des données de génotypage.....	9
III. RESULTATS ET DISCUSSION	11
1. Diversité génétique	11
2. La différenciation génétique entre les sites	15
IV. CONCLUSION.....	18
Annexe 1.....	19
Annexe 2.....	25
Références bibliographiques	32

I. Introduction

Afin de fiabiliser l'approvisionnement en juvéniles de bivalves dans les Pertuis charentais, une information importante à prendre en compte est l'origine des naissains captés. Ainsi, afin de tenter de déterminer la provenance du naissain capté dans chaque zone des Pertuis charentais, l'objectif de l'action Vargenet « Variabilité génétique des stocks d'huîtres dans les Pertuis charentais » est de déterminer si l'outil génétique peut être envisagé en complément des données de suivi de stocks et de modélisation. Pour cela, il est nécessaire de savoir si les stocks sauvages présents dans ces zones peuvent être différenciés génétiquement. Si c'est le cas, les cohortes de naissain captées pourraient alors être assignées à un stock parental, ce qui permettrait d'aider à la gestion des zones de captage.

Ce rapport synthétise les résultats obtenus lors de la caractérisation génétique de stocks sauvages échantillonnés dans les Pertuis charentais pendant la période 2010-2011.

II. Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

Le matériel biologique est issu de l'échantillonnage réalisé, entre le 13 et le 19 avril 2010, dans le cadre de l'action : « Spatialisation de la contamination des gisements naturels d'huîtres creuses dans les Pertuis charentais par le virus herpes OsHV-1 μ var ».

Les stocks d'huîtres sauvages ont été échantillonnés sur 20 sites des Pertuis charentais, sélectionnés sur les surfaces de substrats rocheux. Dans le bassin de Marennes Oléron, un modèle hydrodynamique Mars2D a été mis en place depuis quelques années (Stanisière et al., 2006) qui permet de spatialiser certaines variables hydrobiologiques. Dans le cadre de cette étude, une variable de dépendance hydrodynamique est calculée pour rendre compte de la distance hydrodynamique des stocks d'élevages et sauvages les uns par rapport aux autres.

Cette variable est calculée comme la somme des traceurs $[(\log(\text{nombre particules}) / \text{maille de calcul})]$, à 20 jours, en provenance de toutes les autres populations des Pertuis stocks sauvages et d'élevage).

Dans la figure 1 ci-dessous, la variable est caractérisée par des codes couleur, l'isolement le plus fort étant représenté en bleu, et le plus faible en vert.



Sites échantillonnés



10
Kilomètres

Légende

Dépendance hydrodynamique

Valeur

Elevé
Faible

Figure 1. Carte représentant les sites en fonction de la dépendance hydrodynamique

L'effort d'analyse est porté prioritairement sur les sites pour lesquels la variable d'isolement est forte (n=3), moyenne (n=3) et faible (n=2), tout en représentant l'ensemble des trois classes, ce qui porte le nombre de sites étudiés à 8 (Tableaux 1 et 2).

Tableau 1. Classement des sites selon la Variable d'isolement des Stocks et l'effort d'analyse en génétique

Variable d'isolement des stocks	Sites échantillonnés (en gras pour cette analyse génétique)									
	forte	8	10	18	20					
moyenne	7	9	11	13	15					
faible	1	2	3	4	5	6	12	14	16	19

Tableau 2. Caractéristiques des sites échantillonnés.

Code des sites sur la carte	Localité	Nombre d'individus
1	JULIARD	48
4	LA FUMEE	48
7	AYTRE	48
9	ESNANDES	48
10	LA TRANCHE SUR MER	48
15	SAINT CLEMENT DES BALEINES	48
18	SAINT PIERRE D'OLERON	48
20	VAUX SUR MER	48

Dans les huit sites sélectionnés, un échantillon de tissus branchiaux a été prélevé sur chacun des individus entiers, congelés pour les analyses génétiques. Ce fragment de tissu a été conservé individuellement dans de l'éthanol à 70°. Le nombre d'échantillons est de 48 par site soit un total de 384 échantillons.

2. Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN ont été réalisées avec le kit Proméga Wizard® à partir d'un fragment de tissu branchial conservé dans l'éthanol. Chaque fragment a été séché pour retirer l'éthanol puis lysé. La lyse s'effectue dans un tampon d'extraction CTAB et protéinase K (à 10mg/mL) à 65°C, pendant 3h sur un thermo agitateur à 1050 rpm. Cette étape permet la lyse des cellules et la libération de l'ADN. Une série de deux lavages au chloroforme et de centrifugations permet de récupérer le surnageant qui est purifié avec le kit Proméga Wizard®. L'ADN est élué dans 50µL de TE (Annexe 1).

Les densités optiques des extraits d'ADN sont mesurées au spectromètre (Nanodrop®) sur plusieurs longueurs d'onde. Ces mesures permettent de qualifier le degré de pureté, la concentration des échantillons. Elles permettent de standardiser les concentrations de chaque échantillon avant leur utilisation à 10ng/µL.

3. Amplification par PCR des marqueurs microsatellites

La PCR (Polymérase Chain Reaction) est une technique de réplication ciblée de l'ADN. C'est une succession de réactions d'amplification dénommées cycles. Un cycle de PCR comporte trois étapes : une dénaturation pour séparer les deux brins d'ADN, une hybridation des amorces (séquence de synthèse complémentaire à celle du brin à amplifier) et l'extension par une ADN polymérase. Ces étapes se réalisent sous l'action de la chaleur. A la fin de chaque cycle, deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues. L'ensemble des PCR est réalisé dans un thermocycleur (Applied Biosystems, Gene Amp® PCR System 2700).

Les marqueurs microsatellites sont des régions de l'ADN constitués de répétitions en tandem de petite taille (1 à 5 pb) pour une taille totale en générale inférieure à 200 pb. Ils sont répartis de manière aléatoire sur le génome. Les loci microsatellites présentent un haut degré de polymorphisme dû à la variation du nombre de répétitions du motif de base. Ce polymorphisme permet l'accès à une quantité importante d'informations basées sur les fréquences alléliques. Pour les obtenir par PCR, des séquences d'oligonucléotides sont utilisées. Les amorces fonctionnent par paire : une est positionnée dans un sens (F : Forward) et la seconde est anti-sens (R : Reverse).

Les échantillons ont été analysés à l'aide de quatre jeux d'amorces, dont trois sont utilisés en multiplex (Taris et al., 2005) et un jeu en simplex (Sellos et al., 2003). Ainsi les loci L10, CG49, CG108, AMY ont été caractérisés (Tableau 3).

Les milieux réactionnels sont différents. Pour les multiplex, le milieu réactionnel est constitué de 1µL d'ADN à 10ng/µl, du Type-it Microsatellite PCR kit – QIAGEN® (solution Q, d'un Master Mix et d'eau) et le mélange des 3 paires d'amorces. Un oligonucléotide de chaque paire d'amorce est marqué par un fluorochrome différent dans le cas de ce multiplex.

Pour la PCR en simplex le milieu réactionnel est constitué de 1µL d'ADN à 10 ng/µl, du tampon (5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer Proméga), du MgCl₂ (solution de Chlorure de Magnésium, le cation Mg²⁺ étant co-facteur de l'enzyme), des dNTP (désoxyribonucléotides :

ils permettent la complémentarité de l'ADN simple brin), une amorce F marquée d'un fluorochrome, une amorce R, de la Taq Polymérase (GoTaq® Flexi DNA polymerase Promega). Pour obtenir le volume final, la solution est complétée par de l'eau.

Tableau 3. Caractéristiques des 4 marqueurs microsatellites utilisés.

Locus	Motif répété	Séquence de l'amorce (5'-3')	Ta (°C)	Taille du fragment (bp)	Concentration dans le mix PCR (µM)	Numéro d'accès GenBank
CG 49	(GT)35	NED- F :CATCAGGGGTAAATTAAGTAAGC R :CCACAGACGATTTTCATATATCCTG	55	142-182	0.2	Y12085
CG 108	(GT)15	FAM-F : ATATGTAATGATTACGAAACT R:ATATGTAATGATTACGAAACT	55	128-166	0.4	Y12087
L 10	(AG)26	HEX- F:GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC R :CATGTTTTCCCTTGACTGATCC	55	136	0.2	AF170850
AMY	(TC)37	HEX- F:ACCGGTATTGCCCGAGTTACAA R AGTTAGGCATCCCCATTGTTC	54	199-369	0.2	Y08370

4. Génotypage

Les fragments d'ADN amplifiés (marqués par un fluorochrome) ont été génotypés à l'aide d'un séquenceur (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer®) utilisé en tant que génotypeur (Figure 2). Le génotypage vise à déterminer la taille des allèles pour chaque locus (zone spécifique du génome) pour un individu.

Le séquenceur utilisé est composé de 16 capillaires, d'un système d'électrophorèse, d'un laser et d'une caméra. Les capillaires sont remplis avec un polymère (Polymère POP7 APPLIED®) constituant un tamis moléculaire. Les fragments d'ADN migrent dans les capillaires sous l'effet d'un voltage de forte intensité. Ainsi, ils sont séparés en fonction de leur poids moléculaire (les plus courts vont migrer le plus loin). Lorsque les fragments passent devant le laser, les fluorochromes sont excités et émettent un rayonnement. Ce rayonnement est saisi par la caméra puis converti en données numériques. La collecte des données est automatisée grâce au logiciel Run 3130xl Data Collection v3.0 (Applied Biosystems®).

Les produits de PCR de chaque échantillon 1,2µL, sont dénaturés. La dénaturation consiste à obtenir de l'ADN simple brin. On utilise un mélange réactionnel constitué par 10 µl de formamide (dénaturant de l'ADN) et de 0,25 µl de marqueur de taille Rox Size Standard GS500 APPLIED®. Les échantillons sont dénaturés à 96 °C pendant 5 minutes, puis immédiatement refroidis dans la glace afin d'empêcher la ré-hybridation des brins d'ADN. Ils sont ensuite introduits dans le séquenceur.



Figure 2. Séquenceur (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer®) utilisé en tant que génotypeur pour obtenir les tailles des allèles.

5. Analyse des données de génotypage

Les données numériques sont transformées en données analogiques lues à l'aide du logiciel GeneMapper v3.7 Applied Biosystem®.

L'analyse des électrophorèses est composée de deux étapes :

- la première est la vérification de la migration du marqueur de taille et la bonne annotation des poids moléculaire de références (Figure 3). Le marqueur de taille est constitué de fragments de plasmide. Il permet de calibrer la taille des allèles.

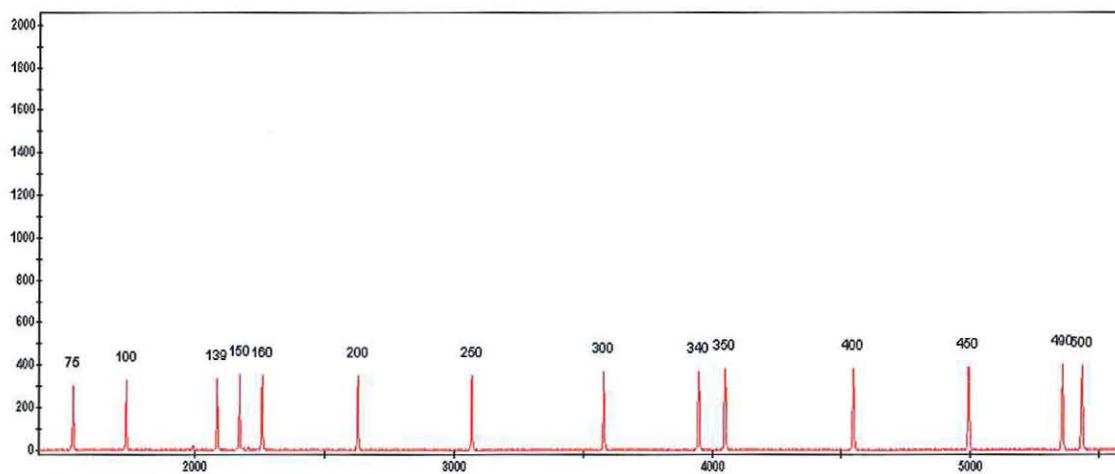


Figure 3. Marqueur de taille Rox Size Standard 500 APPLIED®. En abscisse, la distance de migration en paire de bases et en ordonnée, l'intensité des pics en fluorescence.

- la deuxième étape est l'annotation des allèles (Figure 4). Cette opération a été automatisée en créant un panel pour chaque locus. Il est cependant nécessaire de la vérifier pour qu'elle ne prenne pas en compte des artefacts de migration. Les données sont exportées et pré-traitées sous tableur pour obtenir les fichiers d'entrée pour le traitement statistique.

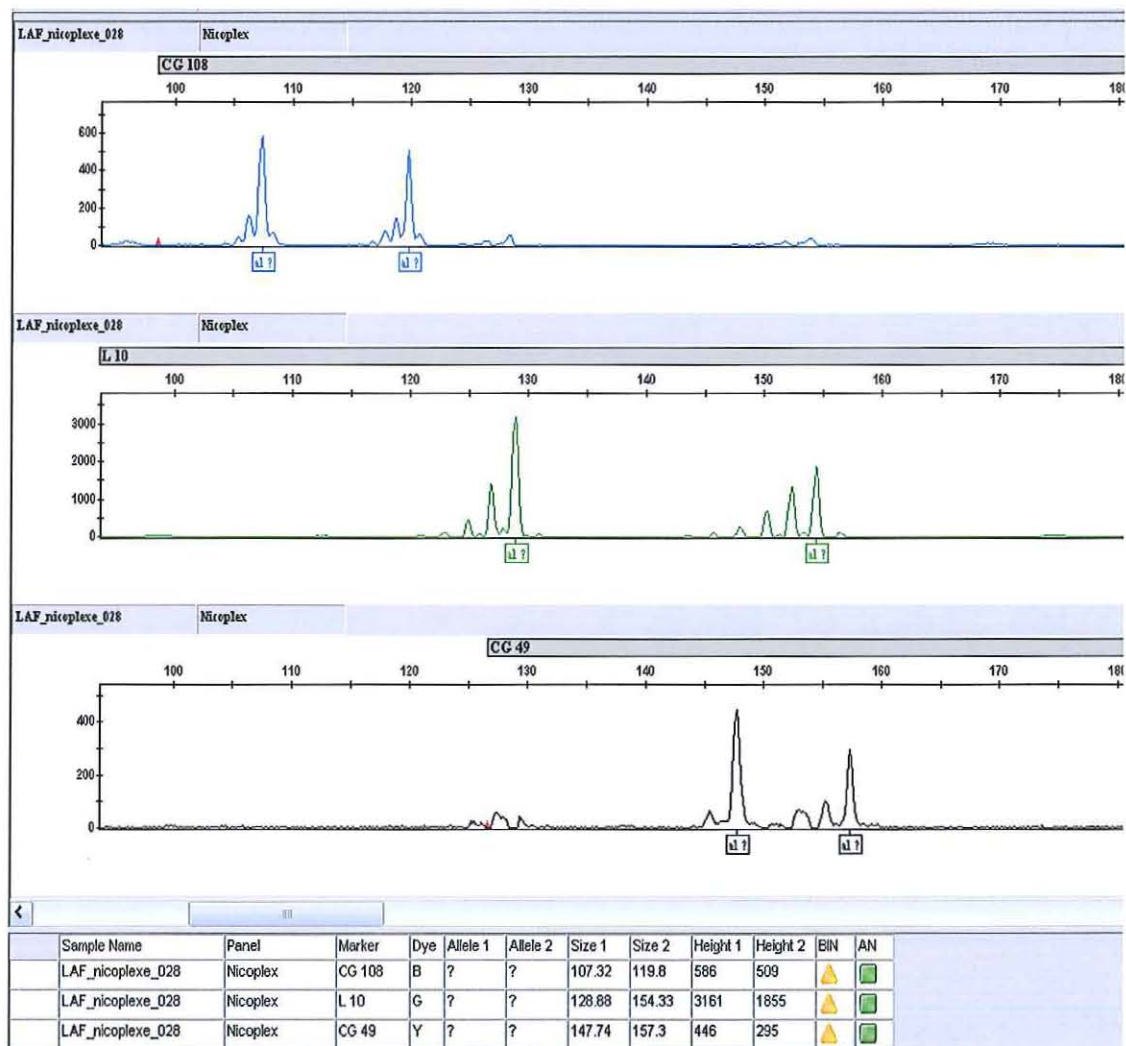


Figure 4. Capture d'écran de l'automatisation du logiciel Genemapper ® permettant de visualiser l'électrophorèse des 3 marqueurs microsatellites en multiplex pour l'individu 28 du site La Fumée. Elle permet aussi d'exporter les données contenues dans la table pour chaque marqueur (le marqueur CG108 correspond aux pics bleus, le marqueur L10 aux pics verts et le marqueur CG49 aux pics noirs).

Les résultats des lectures des électrophorégrammes (tailles des différents allèles pour chaque locus) sont compilés afin d'obtenir un tableau dans lequel sont classés les sites, les individus et les allèles pour chaque locus microsatellite, l'ensemble de ces données brutes est en annexe 2.

Les résultats des analyses réalisées sur les 4 loci microsatellites des 8 sites des Pertuis charentais permettent de calculer des estimateurs à partir des fréquences alléliques.

Les analyses statistiques ont été réalisées sur l'ensemble des données obtenues des 384 individus des 8 sites constituant l'échantillonnage. Elles ont été réalisées à l'aide des logiciels GENETIX® 4.02 (Belkiri et al 2004), FSTAT ® (Goudet 2001), PHYLIP ® et TREE View ®. Ces données sont comparées aux données existantes concernant d'autres sites analysés dans le cadre d'autres projets (Rohfritsch et al., en préparation) afin d'illustrer au mieux les propos.

III. Résultats et discussion

1. Diversité génétique

Le nombre d'allèles par locus est important et est compris entre 25 pour CG49 et 34 pour L10 (Figure 5).

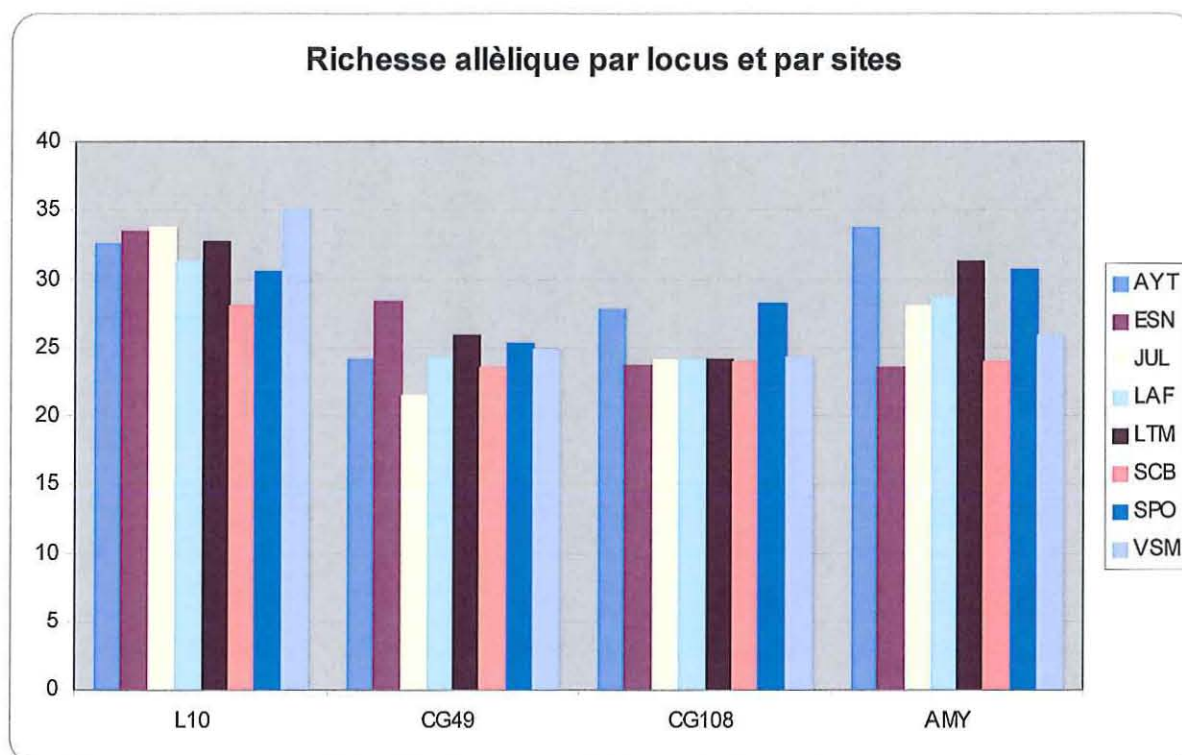


Figure 5. Richesse allélique par locus dans les 8 sites analysés.

Ce nombre important d'allèles est une caractéristique classiquement rencontrée chez cette espèce très polymorphe (Huvet et al., 2004 ; Sauvage et al., 2007).

La richesse allélique est un paramètre caractérisant le nombre moyen d'allèles par locus, cette fois-ci par site et en tenant compte de l'effectif échantillonné dans chaque site. Ceci nous permet de comparer la diversité génétique rencontrée dans les sites analysés. Tous sites confondus la moyenne de la richesse allélique est comprise entre 21,27 et 24,58.

Le taux d'hétérozygotie est calculé par site pour chaque marqueur grâce à l'indice de Nei (1987). Les résultats sont donnés par l'indice Hnb, qui est un estimateur de l'hétérozygotie attendue, dans les conditions de Hardy Weinberg, corrigé pour le biais d'échantillonnage. Il est compris entre 0,953 et 0,964, il est homogène pour les 8 sites étudiés.

Tableau 4. Caractérisation de la diversité génétique des sites analysés.

Site	Effectif	Hétérozygotie Hnb	Richesse allélique par locus				Moyenne de la richesse allélique sur les 4 loci
			L10	CG49	CG108	AMY	
La Tranche sur mer	48	0,962	26,43	22,02	20,96	25,99	23,85
Esnandes	48	0,957	27,29	23,70	20,19	20,16	22,84
Aytré	48	0,964	26,79	20,65	23,43	27,43	24,58
Saint Clément des Baleines	48	0,953	23,29	20,04	20,90	20,85	21,27
La Fumée	48	0,957	25,75	20,91	20,15	23,74	22,64
Juliard	48	0,954	26,30	18,60	20,84	23,30	22,26
Saint Pierre d'Oléron	48	0,963	25,82	21,89	23,62	24,75	24,02
Vaux sur mer	48	0,955	28,36	21,13	20,98	22,09	23,14

Ces deux paramètres mettent en évidence la grande diversité génétique présente dans les sites échantillonnés. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus dans le cadre d'autres projets de recherche (ANR HiFlo,...), pour lesquels d'autres sites français mais aussi d'Europe du Nord et du Japon ont été échantillonnés. Les sites de l'étude sont représentés en bleu foncé avec d'autres sites français en bleu clair. Les sites nord européens sont représentés en orange et les sites japonais en vert (Figures 6 et 7).

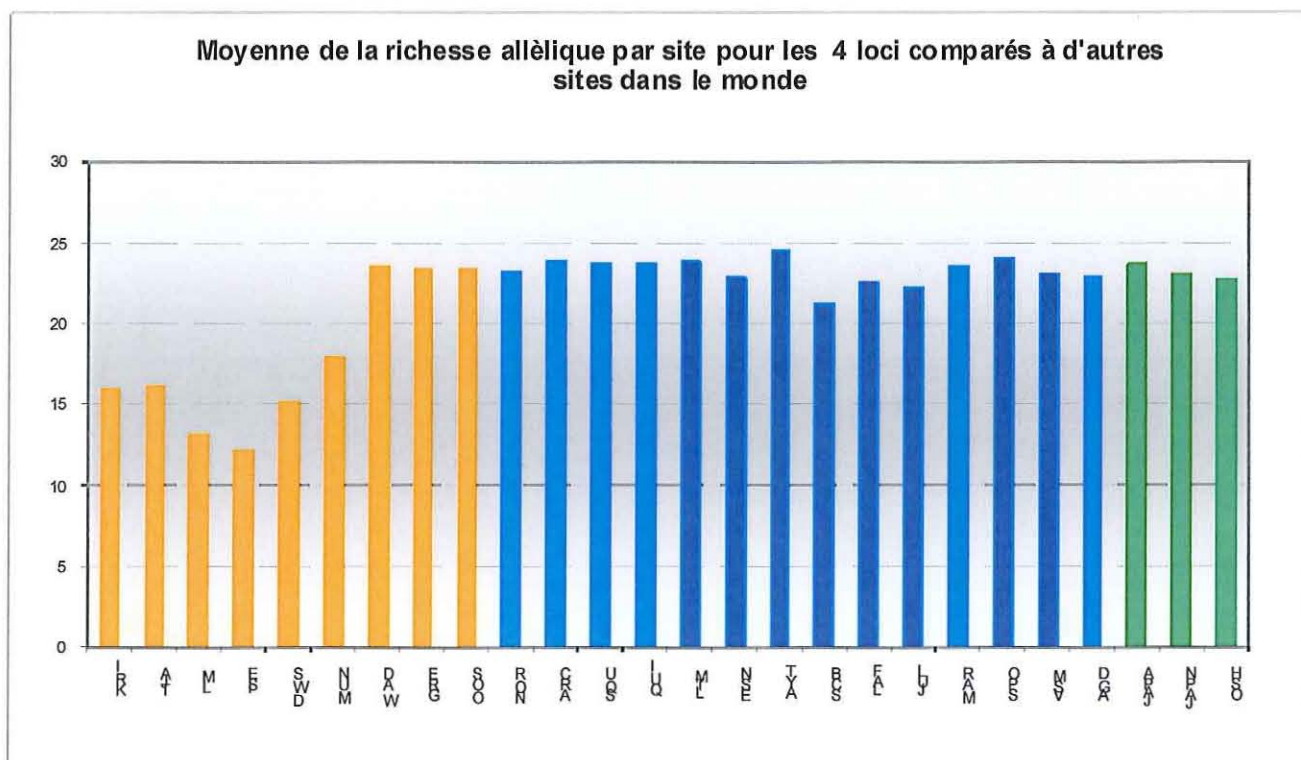


Figure 6. Richesse allélique dans différents sites français, européens et japonais.

Ce graphique montre que les 8 sites étudiés dans les Pertuis charentais présentent une richesse allélique élevée et comparable à celle des autres sites français. Cette richesse allélique moyenne se situe entre 20 et 25, comme pour les sites japonais et certains sites du Nord de l'Europe. Par contre, on peut observer une baisse de la richesse allélique dans d'autres sites du Nord de l'Europe avec des valeurs systématiquement inférieures à 20.

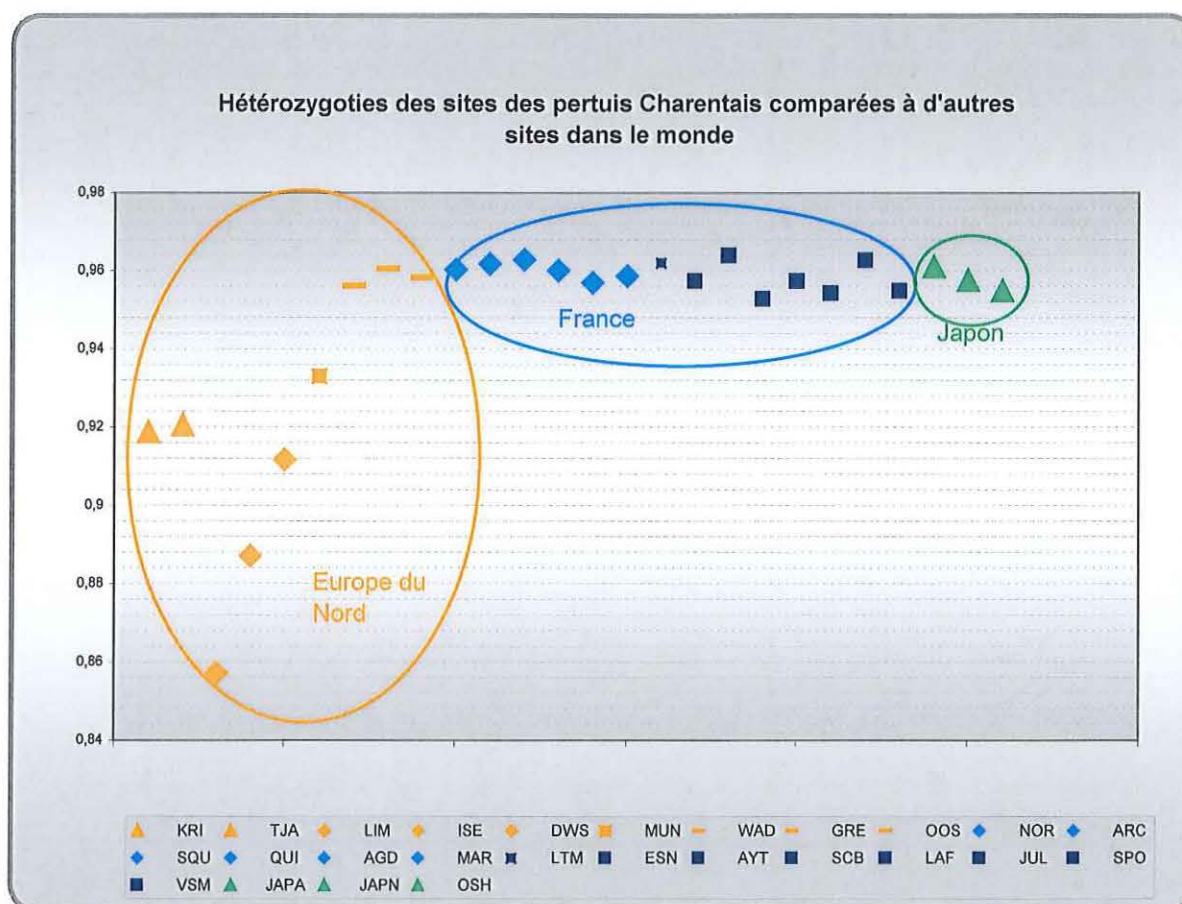


Figure 7. Hétérozygoties estimées dans différents sites français, nord-européens et japonais.

De même que pour la richesse allélique, l'hétérozygotie des 8 sites étudiés est comparable entre eux et est élevée. On distingue de la même manière un groupe avec une hétérozygotie élevée (supérieure à 0.95) en France, Japon et certains sites Nord européens, et une hétérozygotie plus faible (0.86 à 0.93) dans les autres sites nord européens.

Les indicateurs de richesse allélique et d'hétérozygotie pour les sites des Pertuis charentais sont ainsi comparables à ceux de sites du Japon, zone d'origine de l'espèce *Crassostrea gigas*.

2. La différenciation génétique entre les sites

Le Fst est un paramètre permettant de caractériser le niveau de différenciation génétique entre des populations. Il correspond à la part de variabilité (exprimée ici en pourcentage) qui se trouve entre les sites, par rapport à la variabilité totale estimée. Le Fst est compris entre 0 et 1. Plus la valeur est élevée, plus les sites sont dits différenciés entre eux.

Le Fst est ici estimé selon la méthode de Weir et Cockerham (1984) sur 17 sites français et japonais sur les 4 loci étudiés, avec un nombre de permutations de 500 pour réaliser le test statistique.

Tableau 5. Fst estimés par paires de sites pour les sites des Pertuis charentais, et d'autres sites français et japonais. La demi matrice supérieure représente les valeurs de Fst, la seconde demi matrice représente les probabilités respectives du test par rapport à la valeur 0, en rouge les valeurs supérieures 95%. Sont en gras les valeurs de Fst significativement différentes de 0 au seuil de 5%

	NOR	ARC	SQU	QUI	LTM	ESN	AYT	SCB	LAF	JUL	MAR	SPO	VSM	AGD	JAPA	JAPN	OSH
NOR		-0,15	0,065	0,015	0,115	0,103	-0,13	0,283	-0,14	-0,01	0,005	-0,01	0,077	0,05	-0,07	-0,22	0,439
ARC	19.00		-0,18	0,045	-0,11	-0,22	-0,15	0,273	-0,19	-0,11	-0,22	-0,29	0,07	-0,06	0,175	-0,01	0,156
SQU	64.40	12.20		0,117	-0,17	-0,07	-0,25	0,203	-0,01	-0,17	-0,08	-0,1	0,003	-0,19	-0,16	-0,02	0,042
QUI	55.00	61.00	75.40		0,132	0,184	0,091	0,392	-0,15	0,307	-0,14	0,284	0,41	0,302	-0,02	0,175	0,329
LTM	75.60	29.60	15.00	80.20		-0,03	0	0,244	-0,1	-0,35	-0,24	-0,2	-0,05	-0,11	-0,21	-0,22	-0,19
ESN	70.00	12.00	36.00	83.20	47.80		-0,03	0,034	0,041	0,054	0,094	-0,02	-0,16	0,067	0,118	0,288	0,368
AYT	26.40	20.40	6.00	70.00	54.60	43.00		0,29	0,044	0,085	-0,18	0,04	-0,02	-0,08	0,073	-0,26	0,181
SCB	92.00	92.80	86.60	97.80	91.20	63.80	94.80		0,384	0,46	0,249	0,017	-0,06	0,068	0,011	0,41	0,675
LAF	26.80	14.00	52.00	23.60	27.20	59.80	62.60	96.80		-0,14	-0,08	-0,17	0,22	0,034	-0,08	-0,11	0,222
JUL	50.20	28.60	19.20	91.20	3.40	61.60	69.20	98.60	25.00		-0	-0,1	0,083	-0,09	0,133	-0,08	-0,18
MAR	51.20	9.80	30.80	21.60	7.60	69.60	18.80	89.20	32.60	46.20		-0,09	0,243	-0,33	-0,08	-0,03	-0,06
SPO	48.60	5.20	29.00	94.00	15.20	49.40	62.80	54.00	15.40	34.40	32.20		0,008	-0,32	-0,14	-0,01	0,206
VSM	71.80	66.80	51.20	98.80	43.80	19.60	47.60	37.60	87.20	71.80	90.20	54.60		-0,03	0,343	0,383	0,434
AGD	57.00	38.60	14.00	93.60	32.00	68.40	33.40	65.00	58.60	34.60	3.20	4.40	44.20		0,01	0,047	0,01
JAPA	36.00	86.00	20.60	47.40	11.00	76.80	69.40	55.60	32.60	74.60	38.60	21.80	95.40	50.40		-0,1	0,217
JAPN	13.00	50.00	46.80	82.40	13.20	92.60	11.60	97.20	29.00	40.00	48.40	49.60	96.40	63.80	30.00		0,119
OSH	98.40	81.00	59.80	95.20	15.60	95.60	83.20	99.80	87.60	21.60	41.80	87.40	98.00	51.00	86.20	74.40	

D'une manière générale, la différenciation entre les sites est très faible (inférieure à 1%) et quasiment systématiquement non significativement différente de zéro.

Certaines valeurs apparaissent significativement différentes de zéro au seuil du test de 5% et une seule au seuil du test de 1%. Sur l'ensemble des sites des Pertuis charentais on dénombre 3 sites montrant des différences légèrement significatives: SCB comparée à LAF avec une valeur de Fst de 0,384 et à JUL avec 0,46. Le site de VSM est différent comparé à un des autres sites français QUI avec une valeur de Fst de 0,41. Les sites des Pertuis charentais qui ont des valeurs de Fst significatives avec le site OSH du Japon sont: ESN (0,368), VSM(0,434), et SCB(0,675), cette dernière valeur étant la seule significativement différente de zéro au seuil de test de 1%. On note que VSM et SCB montrent des valeurs de Fst légèrement significativement différentes de zéro aussi avec les autres sites du Japon.

Ces résultats semblent cohérents avec la variable caractérisant un plus grand isolement des sites de Saint Clément des Baleines à l'extrême ouest de l'île de Ré et de Vaux-sur-mer dans l'embouchure de la Gironde. Ce n'est cependant pas observable pour les sites de La Tranche-sur-mer ou Saint-Pierre d'Oléron et reste à la limite de la détection.

Ces résultats mettent en évidence la grande homogénéité génétique existant entre les sites des Pertuis charentais et les autres sites français et japonais, que l'on peut représenter dans un cadre plus large, en réintroduisant les sites nord européens moins variables, dans l'arbre phylogénétique ci-dessous (Figure 8). Cet arbre se base sur les fréquences alléliques pour estimer des distances génétiques.

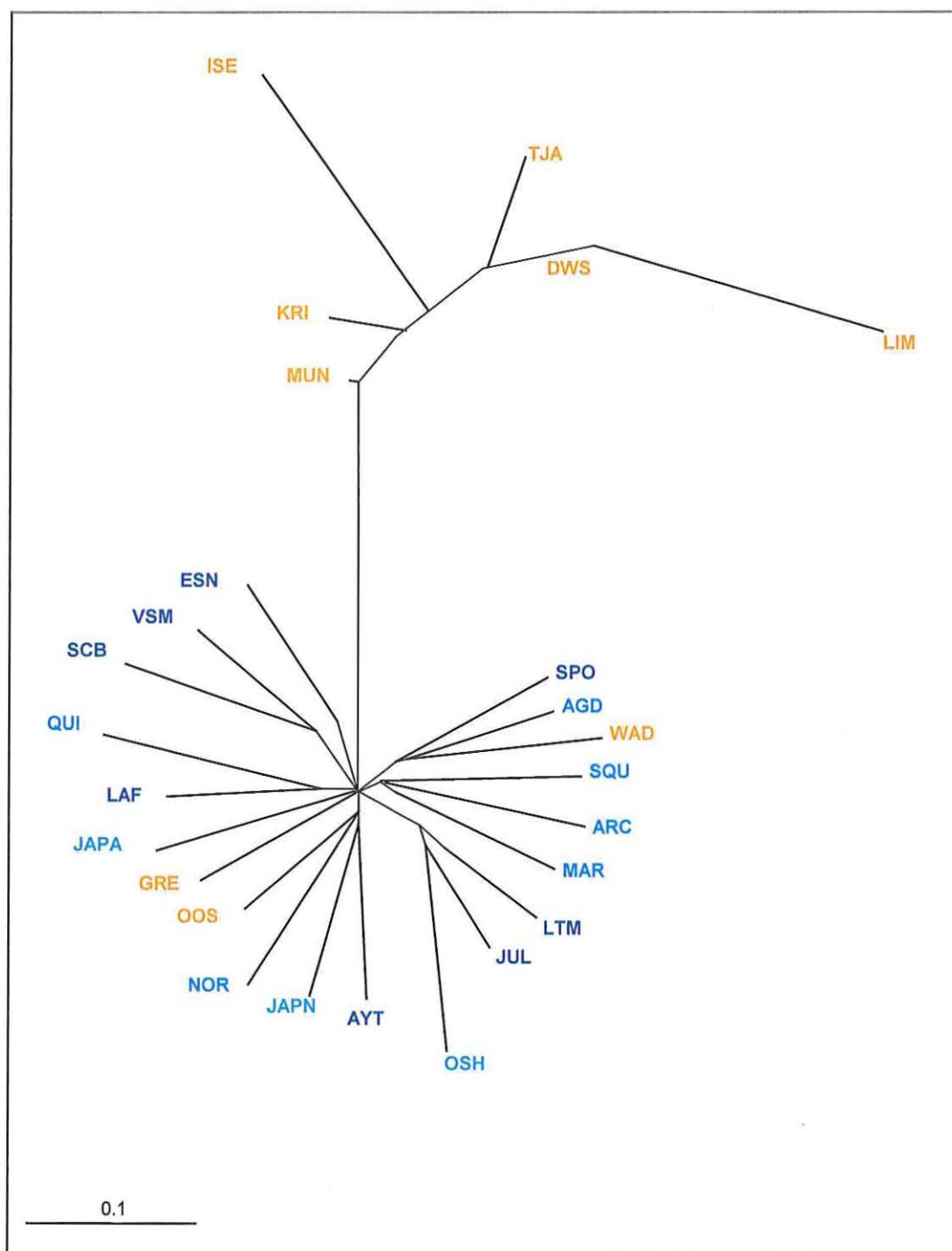


Figure 8. Arbre phylogénétique des différents sites de l'étude comparés à d'autres sites dans le monde.

On observe ainsi à nouveau deux groupes composés des sites français, japonais et certains sites nord européens face autres sites nord européens. Les sites de ce premier groupe ne sont pour la plupart pas différenciés génétiquement entre eux ce qui ne permet pas d'utiliser l'outil génétique pour déterminer l'origine des naissains captés.

IV. Conclusion

Il apparaît tout d'abord que les huit sites échantillonnés dans les Pertuis charentais présentent une **très grande variabilité génétique**. Cependant cette variabilité se répartit de façon très homogène entre les sites. **Autrement dit, il n'apparaît pas de différence génétique clairement significative entre les sites échantillonnés**. Ce résultat s'intègre tout à fait au sein d'observations similaires réalisées à une échelle plus importante. Ainsi, des études complémentaires mettent en évidence une grande variabilité génétique de l'ensemble des sites sauvages français (dont ceux de cette étude), équivalente à celle observée dans la zone d'origine au Japon. Cette grande variabilité se répartit de façon très homogène à l'intérieur et entre les bassins de production, ce qui est dû à la fois aux caractéristiques biologiques de l'espèce et aux transferts très importants d'huîtres en élevage entre les différents bassins, permettant des flux de gènes importants. Seuls des sites du nord de l'Europe se distinguent en particulier par une réduction de la diversité génétique, représentant un sous-ensemble du pool génétique présent en France. Ceci est très certainement dû à des flux de gènes à la fois naturels et anthropogéniques plus restreints dans cette zone de l'Europe colonisée plus récemment.

Les données obtenues dans cette étude n'apparaissent pas corrélées avec la variable de dépendance hydrodynamique sur laquelle notre échantillonnage a été basé. Ainsi, les données obtenues permettent de répondre de façon négative à la question posée, ce qui implique que l'outil génétique utilisé ne permet pas de différencier les stocks sauvages des Pertuis charentais et, par conséquent, l'origine du captage réalisé dans ces zones. Cependant, ces résultats confirment la richesse génétique présente dans les stocks sauvages d'huîtres creuses dans les Pertuis charentais en particulier.

Annexe 1

Extraction d'ADN avec le Kit Promega®

I. Environnement

1. Le matériel

Laboratoire de génétique	Laboratoire de pathologie
Hotte aspirante sur paillasse	Thermo mixer eppendorf
La « chenille » surnom de vacuum Manifold Promega ⁽¹⁾ ,	
La pompe à vide	
Bain marie	
Centrifugeuse sous hotte	
Vortex	
Centrifugeuse de paillasse	

⁽¹⁾ elle peut gérer 20 échantillons simultanément.

Tableau n°1 : Localisation du matériel.

2. Consommables

Tubes :

- 3 ou 4 (si 2 éluions) séries de tubes numérotés de 1,5 ml
 - a. 1 série de tubes numérotés de 2 ml
 - b. 1 série de tubes non numérotés sans bouchon
 - c. 1 série de colonnes numérotées
- Papier absorbant
- Ciseaux
- Pincés
- Seringues pour la chenille
- Colonne de purification
- Seringues pour pipette distributeur 1ml, 5ml, 25ml.

3. Produits

- Wizard® DNA Clean-Up System Promega (ref A 7280)
- Tampon d'extraction 2% CTAB à fabriquer

- Protéinase K (10mg/mL) (stock biomol dans le congélateur en salle de culture cellulaire)
- Chloroforme (Ready red chloroform (Isoamylalcohol), MP ref RYRED001) : Réfrigérateur, laboratoire de génétique
- TE 1X à fabriquer
- Isopropanol 80%, sur paillasse (stock en salle des balances : Isopropylalcohol, MP (ref I 9030)

4. Préparation des solutions de réactifs

TE 1X

4mL TrisHCl 1M pH=8.0
800µL EDTA 0.5M pH=8.0
q.s.p 400mL eau distillée.

Tampon d'extraction 2% CTAB

20mL TrisHCl 1M pH=8.0
16.36g NaCl
8mL EDTA 0.5M pH=8.0
4g CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide)
q.s.p 200mL eau distillée.

II. Protocole

1. Récupération des chairs

1.1 Quantité de tissus

Environ 20mg de tissus humide doit être prévu soit l'équivalent d'un fragment de tissus de 5mm sur 5 mm.

1.2 Préparation du tissus

les tissus conservés en éthanol une fois découpé doivent être asséchés sur du papier absorbant en changeant d'endroit pour chaque individu.

Le fragment est déposé dans un tube eppendorf 1.5ml bouchon ouvert ce qui permet à l'éthanol de s'évaporer.

2. Digestion/lyse des tissus

On ajoute dans le tube contenant le fragment de tissus, 400 µl de tampon d'extraction CTAB à la pipette distributeur avec une seringue de 5ml et 10 µl de protéinase K à 10 mg/ml de la même façon avec une seringue de . Veiller à ce que le fragment soit bien au fond du tube.

On place les échantillons sur le thermo mixer, on programme la température à 65°C et l'agitation à 1350 rpm pendant 1h30.

3. Préparation du TE 1X

Ce tampon doit utiliser à une température de 65°C donc le mettre au bain marie à 65°C avant de commencer les différentes phases de l'extraction.

4. Préparation de la pompe à vide


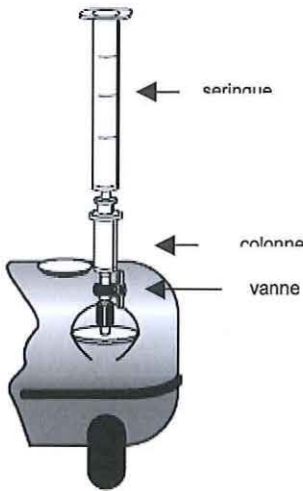
Vacuum Manifold Promega vue d'ensemble	Vacuum Manifold Promega Gros plan sur le dispositif
	

Tableau n°2 : dispositif de filtration pour la purification vue d'ensemble et gros plan.

Les colonnes sont numérotées et montées sur le corps de la pompe en dessous, de la seringue fournie dans le kit.

Les vannes sont fermées.

5. Extraction

Suite à la digestion et lyse des tissus, l'extraction de l'ADN va être mise en œuvre pour cela on utilise le chloroforme.

- Sous la hotte 400µl de chloroforme sont ajoutés au lysat de cellules des échantillons.

Vérifier que les tubes soient bien fermés, les disposer sur le thermo mixer en l'utilisant à température ambiante pendant 2 min, à la vitesse de 1350rpm.

Les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à la vitesse de 13600 rpm.

- Sous la hotte, le surnageant est prélevé à la pipette P200, délicatement (ne pas pipeter trop rapidement afin de ne pas faire décoller le culot pour cela régler la pipette sur 170µl.
- Sur le surnageant est placé dans un tube de 1.5ml neuf.
- On répète les opérations d'extraction précédentes (chloroforme, mixer, centrifugation)

- Sur le surnageant _environ 90µl 2 fois_ est déposé, dans la série de tube de 2ml

6. Purification

Au surnageant, on ajoute 1ml de résine, l'ensemble doit être homogénéisé avant d'être déposé sur les colonnes Cf schéma tableau n°2.

On installe la chenille sous la hotte, on connecte le flexible entre la pompe à vide et la chenille. On dépose ce mélange dans chaque seringue positionnée sur une colonne numérotée. On met sous tension la pompe à vide. On ouvre les vannes, lorsque le mélange est aspiré, on referme toutes les vannes.

A la pipette distributeur avec une seringue de 25ml on distribue 2ml d'isopropanol à 80% pour chaque échantillon

7. Elution des produits d'extraction

Les colonnes sont transférées dans la série de tubes décrite en 2c et centrifugées à 13500 rpm pendant 2 min pour éliminer le reste d'isopropanol.

Les colonnes sont de nouveau transférées dans la série de tubes décrite en 2a, sur lesquelles on ajoute 50 µl de TE 1X à 65°C, après 1 min d'incubation, elles sont centrifugées à 13500 rpm pendant 20s maximum.

III. Produits toxiques

1. Mises en garde

Se reporter au tableau affiché dans le laboratoire d'histologie pour le type de gants à utiliser.

Les fiches toxicologiques sont réunies dans le dossier RRH001 dans le laboratoire d'histologie.

<p>Ethanol</p> <p>Il est recommandé de lire la fiche toxicologique n° 48 de l'Institut National de Recherche et Sécurité (INRS) qui précise les caractéristiques, les risques et les recommandations pour l'utilisation de l'éthanol.</p> <p>Pour résumer, l'éthanol est un liquide facilement inflammable, (point d'éclair = 16°C) et toxique par ingestion ou inhalation.</p>	<p>Ethanol</p> <p>R11 Facilement inflammable S7 Conserver le récipient bien fermé S16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer</p>
---	---

Kit de purification Proméga ®

Chloroforme

Il est recommandé de lire la fiche toxicologique n° **82** de l'Institut National de Recherche et Sécurité (INRS) qui précise les caractéristiques, les risques et les recommandations pour l'utilisation du chloroforme.

Phénol

Il est recommandé de lire la fiche toxicologique n° **15** de l'Institut National de Recherche et Sécurité (INRS) qui précise les caractéristiques, les risques et les recommandations pour l'utilisation de phénol.

Kit de purification Proméga ®

classé comme irritant

Chloroforme

R22- Nocif en cas d' ingestion

R38_ irritant pour la peau.

R40_ Effet cancérigène suspecté_ Preuves insuffisantes.

R48/20/22_ Nocif : risques d' effets graves pour la santé en cas d' exposition prolongée par inhalation et par ingestion.

S36/37_ Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

200-663-8 Etiquetage CE.

Phénol

H341- susceptible d' induire des anomalies génétiques

H331-toxique par inhalation.

H311- Toxique par contact cutané.

H301- Toxique en cas d' ingestion.

H373- Risque présumé d' effets graves pour les organes à la suite d' exposition prolongée.

H314- Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.

Nota les conseils de prudence P sont sélectionnés selon les critères de l' annexe 1 du règlement CE n°1272/2008.

2. Déchets

Sous la hotte de la salle biomol génétique, les résidus (cônes, pointes, seringues,...) ayant été en contact avec des produits toxiques (chloroforme, isopropanol) sont à jeter dans la poubelle (poche) rouge. Les résidus liquides de chloroforme vont dans le bidon « chloroforme » et les résidus liquides se trouvant dans la pompe à vide vont dans le bidon « isopropanol ».

Annexe 2

Résultats des lectures des électrophorèses

Site	Individu	L10	CG49	CG108	AMY
AYT	1	096111	142142	000000	216220
AYT	2	096096	000000	000000	218238
AYT	3	171182	134169	129131	000000
AYT	4	146155	161161	105127	240264
AYT	5	144161	134134	129129	212233
AYT	6	131133	145165	111159	264281
AYT	7	131167	134134	101141	233250
AYT	8	113119	147147	125131	000000
AYT	9	174176	132145	135145	254334
AYT	10	117117	140140	121151	203220
AYT	11	129142	151173	131135	240244
AYT	12	155159	138200	000000	240285
AYT	13	133167	163165	099137	231244
AYT	14	119125	132136	133137	231235
AYT	15	161186	130161	135175	224227
AYT	16	131153	136145	127137	216244
AYT	17	144163	134153	125135	201250
AYT	18	127157	151157	137157	000000
AYT	19	119135	138175	103137	220258
AYT	20	113127	134145	129159	218227
AYT	21	148212	149149	143149	231242
AYT	22	139182	157157	139141	212244
AYT	23	142161	140177	141143	218220
AYT	24	096172	145145	127133	256314
AYT	25	119146	132155	147151	229242
AYT	26	155206	128142	139139	242248
AYT	27	146155	130149	141141	212214
AYT	28	146157	145145	133151	216229
AYT	29	131133	147149	121179	246250
AYT	30	129139	149159	153153	224233
AYT	31	096159	132132	153153	220244
AYT	32	129153	000000	000000	000000
AYT	33	119142	132149	115155	224250
AYT	34	125157	132142	119135	000000
AYT	35	117144	136142	129145	246266
AYT	36	153157	140145	125125	209252
AYT	37	135167	128149	143151	201207
AYT	38	144172	145155	105121	199248
AYT	39	137218	167167	141141	205235
AYT	40	153204	000000	123123	000000
AYT	41	133139	142151	155155	218235
AYT	42	159172	132132	103103	227240
AYT	43	133157	149165	123127	214235
AYT	44	129135	142175	123159	231246
AYT	45	163172	138145	135139	256266
AYT	46	102131	128136	131137	222224
AYT	47	117144	159159	141141	227231
AYT	48	000000	000000	000000	233238
ESN	1	131148	145161	131135	222248
ESN	2	144178	149159	119149	207222

ESN	3	157188	140179	111157	222240
ESN	4	150169	145145	131137	235235
ESN	5	135153	000000	131145	218252
ESN	6	137139	000000	000000	224235
ESN	7	115127	136153	129137	229233
ESN	8	131133	171171	131155	209220
ESN	9	111206	140142	125137	212235
ESN	10	127184	145163	125127	222222
ESN	11	125146	182182	135135	242264
ESN	12	127133	000000	141141	222250
ESN	13	133176	134173	137149	233233
ESN	14	131139	000000	131157	231238
ESN	15	153153	140157	133143	224248
ESN	16	127172	138138	111139	203252
ESN	17	121125	134169	111123	224229
ESN	18	131146	147147	113125	240260
ESN	19	113121	134145	125131	229229
ESN	20	137144	147163	121131	229250
ESN	21	123144	153161	151153	218224
ESN	22	125125	126165	123157	209235
ESN	23	127161	132132	139143	209248
ESN	24	111190	142165	137137	227235
ESN	25	115150	161161	129135	224252
ESN	26	157159	138157	129151	220252
ESN	27	131131	147175	129151	218227
ESN	28	129198	132180	141145	222248
ESN	29	125196	169169	135149	203203
ESN	30	144157	000000	105135	218222
ESN	31	115200	132179	119145	248248
ESN	32	155159	130149	135141	203222
ESN	33	148178	145157	151151	220220
ESN	34	142146	132147	125125	218238
ESN	35	135172	000000	131131	220220
ESN	36	137161	142171	107143	205209
ESN	37	123129	136145	131131	222240
ESN	38	144157	145167	129141	246254
ESN	39	111142	136177	133139	214240
ESN	40	127133	140163	147159	224227
ESN	41	000000	000000	000000	000000
ESN	42	135142	138151	145145	212227
ESN	43	131137	155155	131131	224235
ESN	44	123150	157157	139151	229231
ESN	45	135218	130132	107145	203229
ESN	46	115123	140149	111153	224233
ESN	47	139167	132190	123139	224260
ESN	48	184184	145157	141141	222250
JUL	1	127165	134147	143145	229238
JUL	2	150167	145159	151153	222238
JUL	3	121133	130145	109145	235260
JUL	4	109144	000000	000000	224224
JUL	5	000000	000000	000000	000000
JUL	6	000000	000000	000000	224227
JUL	7	113127	132132	119121	231254
JUL	8	131131	136136	105131	214218
JUL	9	137150	147161	117117	000000
JUL	10	123135	136136	129145	222229
JUL	11	129131	134134	123131	235258
JUL	12	139167	130159	139149	242246

JUL	13	127139	128161	127129	242242
JUL	14	127129	145145	123139	212248
JUL	15	127148	134134	133153	250252
JUL	16	139148	145149	135161	000000
JUL	17	139169	142147	121143	218262
JUL	18	123180	157179	111155	000000
JUL	19	142150	134153	131164	231233
JUL	20	133137	134140	133135	227233
JUL	21	123139	000000	000000	218222
JUL	22	123127	149163	127131	214216
JUL	23	125172	140147	103135	231238
JUL	24	174188	149155	131143	209209
JUL	25	167182	000000	121155	224224
JUL	26	161171	142142	121121	224242
JUL	27	123123	145157	133133	212218
JUL	28	127165	136157	135135	235266
JUL	29	137157	157165	123159	238244
JUL	30	148153	145153	123133	238250
JUL	31	119163	132186	123143	224233
JUL	32	125159	000000	121157	233233
JUL	33	115208	145145	117139	229235
JUL	34	131133	138142	133151	000000
JUL	35	111127	149157	139145	231246
JUL	36	184208	130130	131149	195212
JUL	37	113165	147147	149155	000000
JUL	38	133137	132161	123137	238238
JUL	39	127161	130159	131137	216220
JUL	40	096144	138171	129135	244254
JUL	41	135161	145169	155164	218240
JUL	42	144159	138145	135137	250256
JUL	43	123142	136145	153161	000000
JUL	44	125139	136136	123129	222246
JUL	45	125137	136171	121123	246246
JUL	46	133155	153153	123129	000000
JUL	47	127133	138165	123139	000000
JUL	48	125137	145161	105105	000000
LAF	1	135144	130147	137149	201233
LAF	2	133142	165165	129153	201246
LAF	3	142146	132157	129155	242252
LAF	4	133163	151151	000000	220233
LAF	5	127133	145163	123123	201201
LAF	6	127198	167182	131153	214258
LAF	7	137153	145147	123135	242252
LAF	8	137146	140155	129141	205264
LAF	9	117123	130159	129143	224227
LAF	10	144165	149159	153153	229231
LAF	11	137171	145157	119119	227227
LAF	12	142148	132145	127131	240254
LAF	13	172182	128145	127151	222224
LAF	14	150167	130136	103105	000000
LAF	15	137144	136138	129131	209218
LAF	16	131165	147153	125129	209238
LAF	17	133137	190190	000000	224238
LAF	18	139146	132171	129131	218238
LAF	19	117133	147161	137137	227233
LAF	20	107144	147159	107137	209218
LAF	21	125159	132138	135135	000000
LAF	22	146153	130153	171173	222248

LAF	23	139146	136165	133133	216231
LAF	24	133144	126134	145145	229235
LAF	25	109125	145155	129145	260302
LAF	26	159163	138138	000000	224233
LAF	27	131135	132147	135135	205242
LAF	28	129155	147157	107121	214246
LAF	29	000000	000000	000000	199233
LAF	30	129155	132161	135171	222238
LAF	31	153153	145145	155155	000000
LAF	32	131176	000000	000000	205229
LAF	33	135142	157157	123123	218246
LAF	34	144150	159159	123133	000000
LAF	35	121146	145161	137151	222250
LAF	36	182190	142151	135137	222235
LAF	37	000000	000000	000000	222242
LAF	38	135180	136142	119190	238242
LAF	39	139148	138138	137161	205209
LAF	40	144146	138140	133145	229244
LAF	41	137167	136182	129155	207262
LAF	42	139169	140163	123137	233250
LAF	43	139150	130130	125131	240242
LAF	44	137180	175175	119147	227233
LAF	45	129178	142147	145145	207246
LAF	46	171172	142157	123155	000000
LAF	47	133169	128145	125135	235238
LAF	48	167180	132167	149149	242252
LTM	1	146184	173173	125127	235264
LTM	2	111180	147147	123139	220231
LTM	3	123135	134134	135157	216248
LTM	4	127153	145169	145145	220248
LTM	5	137155	145145	129157	235250
LTM	6	111131	134134	135163	242266
LTM	7	139161	140180	137147	207235
LTM	8	123127	147147	141141	233238
LTM	9	159202	136167	141145	207262
LTM	10	142190	155155	131143	214224
LTM	11	142142	136184	129131	218222
LTM	12	142176	134167	123123	000000
LTM	13	135167	130161	121137	000000
LTM	14	123123	138165	121131	203207
LTM	15	153161	128194	117133	199233
LTM	16	113137	132145	139139	220258
LTM	17	169171	149157	123151	235238
LTM	18	163165	147157	167167	240240
LTM	19	142174	190190	123123	212240
LTM	20	127174	145145	133133	199220
LTM	21	123123	136140	129153	214238
LTM	22	000000	000000	000000	209222
LTM	23	139153	145145	137173	250250
LTM	24	133163	130130	143143	224268
LTM	25	133146	130134	123135	235258
LTM	26	133165	142142	147151	231260
LTM	27	123144	138179	123153	214252
LTM	28	123125	000000	000000	224264
LTM	29	137148	159159	137143	220222
LTM	30	131169	147159	133139	242242
LTM	31	133146	130130	155155	199227
LTM	32	135137	136165	111141	233244

LTM	33	127131	142153	119131	207238
LTM	34	150202	163179	121145	231246
LTM	35	125146	155159	127131	201244
LTM	36	115161	159163	129167	227233
LTM	37	142153	145157	119127	229363
LTM	38	148155	142171	157157	218258
LTM	39	142174	138161	135143	220235
LTM	40	163171	132179	139139	216224
LTM	41	153178	138153	123131	227306
LTM	42	123169	153153	133133	227229
LTM	43	135184	157161	131141	209252
LTM	44	137157	130147	129147	231242
LTM	45	139150	136145	123133	203235
LTM	46	000000	000000	000000	233258
LTM	47	119133	138161	125133	199218
LTM	48	163186	167173	139161	242258
SCB	1	115169	145145	151155	229231
SCB	2	125127	136157	157157	224233
SCB	3	113148	142155	149149	235240
SCB	4	125142	149157	135141	229238
SCB	5	125146	145167	133135	227238
SCB	6	131155	161161	113127	212216
SCB	7	000000	000000	000000	214231
SCB	8	142155	145147	137159	254260
SCB	9	176180	155177	099127	222248
SCB	10	109167	163163	125141	224227
SCB	11	113133	145167	143151	218231
SCB	12	115159	163163	133143	203227
SCB	13	115165	145147	131131	229240
SCB	14	000000	000000	000000	220222
SCB	15	148155	136136	125143	216224
SCB	16	131178	130130	135145	229231
SCB	17	115165	145147	131131	229240
SCB	18	111161	153188	125137	218231
SCB	19	165192	161177	123123	240248
SCB	20	111129	177177	153153	212231
SCB	21	135174	134142	121123	252268
SCB	22	146146	140147	117135	209222
SCB	23	125133	132155	147147	216242
SCB	24	139142	157165	133137	231235
SCB	25	135150	138163	143159	000000
SCB	26	125129	128167	133145	218248
SCB	27	155172	140140	139177	209214
SCB	28	159161	145157	127127	222242
SCB	29	148155	145186	125147	227248
SCB	30	133157	145155	139149	227332
SCB	31	133142	165165	129143	207235
SCB	32	133146	145145	129133	209229
SCB	33	111125	142173	153159	238246
SCB	34	139178	142147	139149	203216
SCB	35	125161	145165	127127	224252
SCB	36	131133	138147	123153	227246
SCB	37	115169	132171	125159	203238
SCB	38	135169	147147	141149	227242
SCB	39	135135	130140	107133	227240
SCB	40	115131	157157	131139	224227
SCB	41	129135	138138	125131	000000
SCB	42	125155	140140	125153	216218

SCB	43	119125	177182	117133	207227
SCB	44	142157	175175	137151	224235
SCB	45	135169	167175	131131	242242
SCB	46	133144	157163	113131	227240
SCB	47	131144	138145	123143	216260
SCB	48	135144	140153	135143	212227
SPO	1	129144	138147	129135	229262
SPO	2	135161	128128	129141	266274
SPO	3	109176	134134	131161	201224
SPO	4	125150	132161	129137	229246
SPO	5	157171	128130	121135	000000
SPO	6	115137	136142	119131	214218
SPO	7	121171	145145	133143	229260
SPO	8	148176	134138	109123	207227
SPO	9	148194	142171	123137	229252
SPO	10	131137	140159	125137	201231
SPO	11	127176	142171	131141	207207
SPO	12	121137	145145	149149	222233
SPO	13	135146	145147	143175	233246
SPO	14	137169	000000	103131	218224
SPO	15	137172	138145	135153	216216
SPO	16	131133	169179	155157	224242
SPO	17	123137	145155	131135	231242
SPO	18	144176	136136	113131	216272
SPO	19	123150	151151	125143	231240
SPO	20	000000	000000	000000	238242
SPO	21	127137	165169	131149	229264
SPO	22	129153	000000	131133	229235
SPO	23	115155	140142	141145	229285
SPO	24	127139	134138	141145	000000
SPO	25	125148	130157	135137	207220
SPO	26	125169	128177	149153	207231
SPO	27	144153	157179	117153	214238
SPO	28	123125	149157	133167	000000
SPO	29	127190	167167	123182	224240
SPO	30	133144	130151	153155	238250
SPO	31	165171	142157	155155	205209
SPO	32	146178	145145	139143	000000
SPO	33	123148	167167	159159	205222
SPO	34	135155	130130	157159	224304
SPO	35	137153	134163	117147	222242
SPO	36	150163	134188	147147	000000
SPO	37	000000	000000	000000	227238
SPO	38	131167	155161	127127	218229
SPO	39	142161	132132	127159	227242
SPO	40	121165	169175	111133	260260
SPO	41	115139	147159	139173	212240
SPO	42	129144	130138	103147	205244
SPO	43	155171	153153	123145	248260
SPO	44	148176	000000	131143	216240
SPO	45	153163	130163	153153	222242
SPO	46	157190	138167	129133	242244
SPO	47	148157	145155	131139	218227
SPO	48	163186	145151	145145	000000
VSM	1	131153	132157	127137	220233
VSM	2	142144	145163	129135	212216
VSM	3	115135	147163	131135	231248
VSM	4	148148	145145	127137	203203

VSM	5	115123	134149	000000	242244
VSM	6	127194	000000	123123	216240
VSM	7	133198	165165	137149	240246
VSM	8	131144	134171	125133	220250
VSM	9	169176	192192	141145	238244
VSM	10	117148	163169	131169	250252
VSM	11	131161	142173	127131	238266
VSM	12	142146	138142	161164	235293
VSM	13	139165	159167	127151	203229
VSM	14	142153	136140	139139	000000
VSM	15	135150	136163	125145	199216
VSM	16	121123	175175	137153	214231
VSM	17	137163	145165	109137	222231
VSM	18	111125	147147	111127	231248
VSM	19	123153	132177	129149	235250
VSM	20	117161	165165	103153	235248
VSM	21	117125	134145	127143	199248
VSM	22	137157	145145	131133	224235
VSM	23	109135	153161	123135	227248
VSM	24	135142	149163	149149	222229
VSM	25	129178	155173	111127	231233
VSM	26	155167	149186	147147	216227
VSM	27	117150	136159	129135	229238
VSM	28	133178	145145	000000	224235
VSM	29	133178	145145	143143	224235
VSM	30	169176	163163	131135	201222
VSM	31	165220	145145	129129	218229
VSM	32	144150	132134	129141	000000
VSM	33	150167	145153	123149	266266
VSM	34	157172	145145	137137	231242
VSM	35	131148	000000	000000	216240
VSM	36	137142	136145	129133	222252
VSM	37	144171	130157	147157	214222
VSM	38	144169	132140	125163	203224
VSM	39	125206	130169	131145	207227
VSM	40	127167	155180	119125	000000
VSM	41	105206	153159	119131	227235
VSM	42	142155	155157	103131	240240
VSM	43	150204	136145	111139	224235
VSM	44	142148	149173	123164	231238
VSM	45	121121	142142	000000	238300
VSM	46	123167	145149	131131	233244
VSM	47	163186	140161	131141	224231
VSM	48	125172	147147	127163	224233

Références bibliographiques

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F., 1996-2001. **Genetix 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Laboratoire Genome, Population, Interaction CNRS UMR 5000, UM II, Montpellier.
- Huvet A., Fabioux C., McCombie H., Lapègue S., Boudry P., 2004. **Natural hybridization between 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. Open Access version : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3355/>
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995)
- Nei M., 1978. **Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals**. *Genetics*, 89 : 583-590.
- Rohfritsch A., Bierne N., Boudry P., Heurtebise S., Cornette F., Lapègue S. **Population genomics of invasiveness of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the context of its geographic expansion in Northern Europe**. En préparation.
- Sauvage C., Boudry P., Lapègue S., Bierne N., 2007. **Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas***. *Gene*, 406, 13-22.
- Sellos D., Moal J., Degremont L., Huvet A., Daniel J.-Y., Nicoulaud S., Boudry P., Samain J.-F., Van Wormhoudt A., 2003. **Structure of amylase genes in populations of pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas*): Tissue expression and allelic polymorphism**. *Marine Biotechnology*, 5(4), 360-372.
- Taris N., Baron S., Sharbel T., Sauvage C., Boudry P., 2005. **A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)**. *Aquaculture Research*, 36(5), 516-518. Publisher's official version : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01208.x> , Open Access version : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1814/>
- Stanisière, J.Y., Dumas, F., Plus, M., Maurer, D., Robert, S., 2006. **Caractérisation des composantes hydrodynamiques d'un système côtier semi-fermé : Le Bassin de Marennes - Oléron**, DOP/LER.LER/PC/06.1059, pp. 112.