

Université Pierre et Marie Curie – Paris VI

Diplôme d'Etudes Supérieures de Sciences

\*\*\*\*

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

27329  
E410-LALA  
OLR 1995

**ANALYSE DU SUCCES REPRODUCTEUR CHEZ DES POPULATIONS  
NATURELLES ET D'ECLOSERIE D'HUITRE PLATE  
*OSTREA EDULIS* L.**

2003



**Delphine LALLIAS**

**Responsable scientifique : Sylvie LAPEGUE**

**Laboratoire Génétique et Pathologie  
IFREMER La Tremblade**



## Remerciements

Je remercie tout d'abord Philippe GOULETQUER de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie Sylvie LAPEGUE pour son encadrement, sa gentillesse, sa bonne humeur et ses conseils.

Merci également à Pierre BOUDRY.

Je remercie tout particulièrement Nicolas TARIS pour m'avoir formée à la biologie moléculaire et notamment à l'utilisation du séquenceur. Merci pour son calme, sa disponibilité, ses encouragements et son soutien moral.

Un grand merci à Ian WILSON pour sa patience, sa disponibilité et son efficacité pour adapter le logiciel PARENTAGE à mon étude.

Je remercie également Tristan MARSHALL pour m'avoir conseillée sur l'utilisation du logiciel CERVUS dans le cas où aucun parent n'est connu de même que le sexe des géniteurs potentiels.

Merci à Emmanuel GOYARD, Bryan NEFF, Roy DANZMAN pour leurs conseils sur les analyses de parenté ainsi que leurs tentatives de trouver un logiciel adapté à mes données.

Merci à Florence CORNETTE pour son dynamisme et la mise en place de dispositifs expérimentaux inédits à l'écloserie...

Je remercie également Raphaël BRIZARD, Serge HEURTEBISE, Jean-Christophe BILLY pour leur aide à l'écloserie.

Je remercie Florence RIVET, notre bibliothécaire, parisienne exilée à La Tremblade, pour les commandes d'article.

Je remercie également Maeva, Céline, Delphine, Karine, Béatrice, Jean-Côme et Lionel pour leur accueil et les soirées barbecue.

Je remercie bien évidemment tous les stagiaires qui ont séjourné à la maison des stagiaires. Et notamment Sarah et Angélique qui m'ont supportée et écoutée dans les moments de doute, qui m'ont soutenue et encouragée. Merci à elles pour les petites soirées entre filles.

Enfin, je remercie le club de badminton trembladais d'exister. J'ai pu découvrir ce sport et m'y attacher. Merci pour les nombreuses heures passées à me défouler et à évacuer le stress accumulé dans la journée. Je tiens à cette occasion à m'excuser auprès de tous mes partenaires, Nico, Sarah, Jean-Côme, Kasia et la veille de mon départ Angélique. Merci particulièrement à Stéphane pour sa bonne humeur et les amortis toujours plus près du filet.

## SOMMAIRE

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Marqueurs moléculaires utilisés en biologie des populations.</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Les bivalves marins, modèle unique en génétique des populations</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Ostrea edulis : notre modèle d'étude</b>	<b>2</b>
<b>1.4. Etat des connaissances sur la génétique des populations de l'huître plate</b>	<b>3</b>
<b>1.5. Problématique de cette étude</b>	<b>5</b>
<b>2- MATERIEL ET METHODES</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Espèce étudiée Ostrea edulis</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Echantillonnage et expérimentation</b>	<b>9</b>
<b>2.3. Outils moléculaires : microsattellites</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Extraction d'ADN</b>	<b>11</b>
<b>2.5. Révélation du polymorphisme</b>	<b>12</b>
<b>2.6. Variabilité et différenciation génétiques</b>	<b>12</b>
<b>2.7. Effectif efficace</b>	<b>13</b>
<b>2.8. Analyses de parenté</b>	<b>14</b>
2.8.1. Quand la mère est connue (femelles incubantes, milieu naturel)	15
2.8.2. Quand la mère est connue et qu'il existe une liste de géniteurs potentiels	16
<b>3- RESULTATS</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Déséquilibre de liaison</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Variabilité intra-population dans les populations adultes</b>	<b>18</b>
3.2.1. Polymorphisme	18
3.2.2. Répartition des fréquences alléliques	18
3.2.3. Taux d'hétérozygotie	19
<b>3.3. Analyses de parenté</b>	<b>21</b>
3.3.1. Probabilités d'exclusion	21
3.3.2. Femelles incubantes 2001 prélevées en milieu naturel	21
3.3.3. Analyse des pontes en masse issues d'adultes maintenus en écloserie	24
3.3.4. Analyse des pontes issues des femelles incubantes maintenues en écloserie	26
<b>4. DISCUSSION</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Déficit en hétérozygotes</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Complémentarité des études en milieu naturel et contrôlé</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Difficulté des analyses de parenté en milieu contrôlé</b>	<b>29</b>
<b>4.4. Apport de nos données pour une meilleure connaissance de la biologie de la reproduction de l'huître plate</b>	<b>31</b>
<b>4.5. Variance du succès reproducteur et taille efficace : implications pour expliquer les phénomènes de déficits en hétérozygotes et d'hétérosis</b>	<b>33</b>
<b>5. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>36</b>

## **1. INTRODUCTION**

La description de la variabilité génétique des êtres vivants est une étape indispensable pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'adaptation et l'évolution des espèces, mais aussi pour la gestion des ressources génétiques. La génétique des populations s'attache à décrire la variabilité génétique dans les populations naturelles, à en déterminer l'ampleur, l'origine et à caractériser les forces qui la maintiennent. Notamment, elle vise à l'étude de l'équilibre entre la dérive génétique (changement des fréquences alléliques entre générations sous l'effet du hasard) qui conduit à la différenciation des populations, et les flux de gènes qui conduisent à l'homogénéisation génétique des populations.

### **1.1. Marqueurs moléculaires utilisés en biologie des populations.**

L'utilisation des marqueurs moléculaires a révolutionné le domaine de la biologie des populations. Toute une batterie de marqueurs est actuellement disponible, le choix des marqueurs comme outils d'étude dépendant de leurs propriétés en fonction de la question biologique posée. Les marqueurs moléculaires permettent ainsi de s'intéresser à de multiples échelles d'étude allant de la population à l'individu et de répondre à de multiples questions. Ils peuvent en effet permettre d'inférer le rôle relatif des forces évolutives, d'analyser les structures sociales et d'apparentement entre individus, d'étudier les barrières aux échanges entre taxons (étude des zones hybrides) ainsi que les relations et histoires évolutives entre espèces (taxonomie et phylogénie moléculaires).

En particulier, les microsatellites représentent des outils très étudiés en biologie des populations. Ce sont en effet des marqueurs codominants, neutres, hérités selon les règles mendéliennes. Les loci présentent de plus un important polymorphisme dû à la variation du nombre de répétitions du motif de base (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989). Enfin, ils sont relativement abondants et répartis aléatoirement dans le génome (Hearne *et al.*, 1992). De ce fait ils sont adaptés à de nombreuses problématiques en biologie des populations.

### **1.2. Les bivalves marins, modèle unique en génétique des populations**

La génétique des populations des bivalves marins a connu un développement récent, depuis une trentaine d'années seulement, du fait de la complexité du milieu marin : la notion

de barrière géographique est en effet moins évidente que dans le milieu terrestre; les organismes présentent des cycles de vie souvent mal connus (Launey, 1998).

Parmi les organismes marins, les populations de mollusques bivalves ont été particulièrement étudiées depuis le début des années 1970, et cela pour plusieurs raisons : ils sont abondants, faciles à récolter et l'on dénombre plusieurs espèces d'intérêt économique. De plus, leur cycle de vie est représentatif de nombreux organismes marins : fécondation externe, alternance d'une phase larvaire pélagique et d'une phase adulte benthique. Du fait des caractéristiques de leur cycle de reproduction, les populations de bivalves marins représentent un modèle unique pour le généticien des populations. En effet, ces organismes remplissent toutes les conditions nécessaires pour satisfaire à l'équilibre de Hardy-Weinberg, modèle théorique de base en génétique des populations :

- Du fait de la libération des gamètes en pleine eau, on s'attend à ce que les fécondations se fassent au hasard à l'intérieur des populations, illustrant ainsi le modèle de panmixie.
- La phase larvaire libre permettrait, potentiellement, des dispersions sur de grandes distances, ce qui conduirait à de forts flux géniques et donc à une homogénéité génétique sur de grandes distances.
- Les populations de bivalves marins ont souvent des effectifs très élevés, ce qui devrait conduire à une dérive génétique faible (Launey, 1998).

### 1.3. *Ostrea edulis* : notre modèle d'étude

L'huître plate, *Ostrea edulis*, est l'espèce endémique des côtes européennes, atlantiques et méditerranéennes. Elle a été traditionnellement exploitée en Europe et en France depuis l'Antiquité. Mais sa production a chuté de près de 20000 tonnes dans les années 50 jusqu'à environ 1500 tonnes actuellement par an suite à la progression de deux maladies parasitaires successives dues à *Marteilia refringens* (zone infra-littorale) et à *Bonamia ostreae* (zones d'eau profonde). La sélection des souches d'huîtres plates tolérantes à *Bonamia ostreae* (programme de sélection engagé à l'Ifremer de La Tremblade depuis 1985) est susceptible de permettre un renouveau de la filière traditionnelle de l'huître plate élevée en eau profonde (où *Marteilia* est absent). La mise en place d'un programme de sélection implique la connaissance de la diversité génétique des populations naturelles, étude de base en génétique des populations. De plus, la réintroduction, dans un avenir plus ou moins proche, de souches sélectionnées dans le milieu naturel pose de nombreuses questions en terme de

biologie de la conservation des populations naturelles (et de leur patrimoine génétique) et implique une meilleure connaissance de la biologie de la reproduction de l'huître plate. C'est pourquoi de nombreuses études ont été menées afin de mieux connaître ce modèle biologique.

#### 1.4. Etat des connaissances sur la génétique des populations de l'huître plate

- ETUDES A L'ECHELLE DE L'AIRE DE REPARTITION DE L'ESPECE

De nombreuses études génétiques au niveau de l'aire de répartition ont été menées, basées sur des marqueurs nucléaires (allozymes ou microsatellites) et mitochondriaux.

Tout d'abord, quelques études des variations à des loci enzymatiques ont été effectuées sur l'huître européenne *Ostrea edulis* (Wilkins & Mathers, 1973; Buroker, 1982; Saavedra *et al.*, 1987; Alvarez *et al.*, 1989; Johannesson *et al.*, 1989). Ces études génétiques (limitées en terme de nombres de loci et de populations étudiés) ont permis de mettre en évidence que cette espèce présente des niveaux de variation allozymique plus faibles que chez les autres bivalves (Buroker, 1982; Johannesson *et al.*, 1989) et qu'il existe une différenciation globale généralement faible entre ces populations (Saavedra *et al.*, 1987; Johannesson *et al.*, 1989). Ces deux résultats principaux sont confirmés lorsque l'étude est étendue à l'échelle de l'aire de répartition de l'espèce, incluant des populations atlantiques et des populations méditerranéennes (Saavedra *et al.*, 1993). Une différenciation dans les fréquences alléliques sous la forme d'un cline macrogéographique s'étendant de la Norvège à la Turquie au locus ARK\* (Saavedra *et al.*, 1993) indique que la sélection naturelle ou des événements historiques auraient eu un rôle important dans l'origine de la différenciation géographique observée. Lors d'une étude plus détaillée basée sur davantage de loci et de populations, Saavedra *et al.* (1995) ont mis en évidence l'existence de clines de fréquences alléliques à de nombreux loci. De plus, la localisation géographique du point médian des clines au niveau du détroit de Gibraltar est en faveur d'un contact secondaire entre deux stocks d'huîtres, atlantique et méditerranéen, qui se seraient différenciés en allopatrie suite à des variations climatiques et de niveau de la mer lors des glaciations du Quaternaire.

Puis, afin d'avoir une vue plus précise de la génétique des populations de cette espèce, Launey *et al.* (2002), Diaz Almeda *et al.* (soumis) ont analysé la structuration génétique géographique en utilisant des marqueurs microsatellites et mitochondriaux (12S), et ont comparé ces résultats avec les données allozymiques précédemment publiées (Saavedra *et al.*, 1993, 1995). Les patrons de variation mis en évidence sont similaires pour les trois types de marqueurs, correspondant à un modèle d'isolement par la distance. De plus, si l'on compare les données

microsatellites et mitochondriales, une plus grande variabilité a été observée entre les populations pour la diversité mitochondriale. Un facteur 10 a été mis en évidence entre la différenciation génétique calculée à partir du marqueur mitochondrial ( $F_{st}=0,224$ ; Diaz-Almeda *et al.*, soumis) par rapport à la différenciation calculée à partir des microsatellites ( $F_{st}=0,019$ ; Launey *et al.*, 2002). Les mitochondries, à transmission maternelle, fournissent des renseignements sur la structuration génétique via la voie femelle. Cette différence quantitative d'un facteur 10 observée entre les  $F_{st}$  des deux génomes, s'expliquant en partie par une taille efficace ( $N_e$ ) de population femelle réduite, et donc un  $N_e$  mitochondrial réduit, pourrait être également due à divers facteurs (Diaz Almeda *et al.*, soumis) :

- un sex-ratio biaisé en faveur des mâles (jusqu'à un ratio de 3 : 1) pendant la saison de reproduction (Ledantec & Marteil, 1976)
- des fortes mortalités causées par *Bonamia ostreae* chez les adultes de 2 ou 3 ans (Culloty & Mulcahy, 1996) : l'espèce est protandre donc la proportion d'individus qui achèvent de se reproduire en tant que femelles est réduite par l'action du parasite
- une variance dans le succès reproducteur des femelles : si les mâles réussissent à féconder plusieurs femelles, une variabilité dans les conditions océanographiques devrait accroître la variance du succès reproducteur des femelles (Hedgecock, 1994) davantage que celle des mâles, réduisant ainsi le  $N_e$  mitochondrial par rapport au  $N_e$  nucléaire.

- EXISTENCE DE DEUX PHENOMENES SOUVENT CONJOINTS

Deux phénomènes rapportés dans de nombreuses études ont également pu être mis en évidence chez *Ostrea edulis*:

- L'existence d'un déficit en hétérozygotes par rapport aux fréquences théoriques attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg a été démontrée pour des loci enzymatiques (Wilkins & Mathers, 1973; Saavedra *et al.*, 1987; Alvarez *et al.*, 1989) et des loci microsatellites (Launey, 1998; Launey *et al.*, 2002). De tels déficits en hétérozygotes semblent être une observation commune chez les populations de bivalves marins, à la fois aux loci allozymiques (Zouros & Foltz, 1984) et aux loci microsatellites (Huvet *et al.*, 2000).
- Une corrélation positive entre l'hétérozygotie d'un individu aux marqueurs génétiques et des traits associés à la valeur sélective (survie, croissance) a également été mise en évidence. Une telle corrélation a été démontrée chez *Ostrea edulis* en se basant sur l'étude de loci enzymatiques (Alvarez *et al.*, 1989; Launey, 1998) mais aussi sur celle de marqueurs microsatellites (Bierne *et al.*, 1998). L'existence de cette corrélation a été rapportée pour des organismes variés et tout particulièrement pour des populations de bivalves marins (à titre

d'exemples : David *et al.*, 1995 pour *Spisula ovalis*; Launey & Hedgecock, 2001 pour *Crassostrea gigas*).

- ETUDES DE LA DYNAMIQUE DE REPRODUCTION DE L'HUITRE PLATE

Des études à une échelle plus fine, celle de la population, et plus particulièrement à sa dynamique de reproduction ont été initiées (Taris, 2002) afin de mieux comprendre les facteurs qui peuvent participer à la mise en place d'une structuration génétique permettant d'observer les phénomènes de déficit en hétérozygotes et de relation entre hétérozygotie et croissance.

Tout d'abord, deux études de la variabilité génétique du naissain ont été réalisées. Des collecteurs placés à Sète (population méditerranéenne) pendant deux semaines lors du printemps 1994 ont permis de mettre en évidence une variabilité significativement plus faible chez les individus se sédentarisant par rapport à la population adulte locale (Launey, 1998). La variabilité de 4 cohortes recrutées en baie de Quiberon durant le printemps 2001 a été suivie : aucune différence significative au sein des cohortes et entre les cohortes et la population adulte n'a été mise en évidence en termes d'hétérozygotie, de nombre d'allèles et de valeurs de  $F_{st}$  (Taris, 2002).

Ensuite, des analyses de parenté ont été effectuées sur des larves prélevées dans la cavité palléale de 4 femelles incubantes. L'estimation du nombre de pères ayant fécondé chaque femelle s'étend de 1 à 10 (Taris, 2002).

### 1.5. Problématique de cette étude

Deux classes d'arguments ont été évoquées pour expliquer les déficits en hétérozygotes et les corrélations hétérozygotie-croissance.

La première classe (hypothèse de superdominance) implique que la sélection agit directement sur les génotypes allozymiques, remettant de ce fait en cause la neutralité des marqueurs enzymatiques. Cette hypothèse peut être réfutée du fait de la mise en évidence de l'hétérosis avec l'étude de marqueurs neutres, les microsatellites (Bierne *et al.*, 1998; Launey & Hedgecock, 2001).

La seconde classe (hypothèse de superdominance associative) stipule que le polymorphisme allozymique est neutre mais reflète indirectement la variation à des loci liés à la valeur sélective par des corrélations génétiques (Bierne *et al.*, 1998). Dans ce cas, les loci électrophorétiques peuvent être des gènes neutres en déséquilibre gamétique avec des loci,

localisés dans leur proximité chromosomique, soumis à sélection (effet local) ou bien représenter des marqueurs neutres du degré d'hétérozygotie génomique (effet général, David *et al.*, 1995). Que l'effet de cette corrélation génétique soit local ou général, l'hypothèse de la superdominance associative trouve ses explications dans les caractéristiques de la biologie de la reproduction et de la dynamique de la population. En effet, selon Bierne *et al.* (1998), une taille efficace instantanée réduite peut provoquer un déséquilibre gamétique entre les marqueurs génétiques et les loci associés à la valeur sélective (effet local) alors qu'une consanguinité partielle peut générer une variation dans l'hétérozygotie génomique globale entre les individus de sorte que l'homozygotie à n'importe quel locus sera corrélée avec la dépression de consanguinité (effet global).

De plus, à l'échelle de l'individu, les femelles peuvent être fécondées par un nombre limité de mâles (Taris, 2002). Mais cette étude porte sur un petit nombre de femelles et doit être étendue.

Enfin, une des hypothèses permettant d'expliquer la différence quantitative d'un facteur 10 entre les  $F_{st}$  des génomes nucléaire et mitochondrial serait une variance dans le succès reproducteur des femelles (Diaz Almeda *et al.*, soumis). En effet, selon les conditions océanographiques, certaines femelles peuvent ne pas pondre et participer à la génération suivante. En revanche, si les mâles sont capables de féconder plusieurs femelles, leur variance du succès reproducteur sera moins importante.

Ainsi, il apparaît primordial d'approfondir la connaissance de la biologie de la reproduction de l'huître plate afin de mieux comprendre comment les caractéristiques de la biologie de reproduction de l'espèce peuvent rendre compte à la fois de l'hétérosisme et des déficits en hétérozygotes observés et du  $N_e$  mitochondrial réduit. Cette étude vise donc à répondre à plusieurs questions :

1) Combien de mâles ont contribué à la descendance des femelles incubantes prélevées dans le milieu naturel? Cette partie de l'étude vise à approfondir les résultats obtenus par Taris (2002) en analysant les descendances issues d'un plus grand nombre de femelles.

2) Est-il possible de mettre en évidence une variance dans le succès reproducteur des géniteurs potentiels, entraînant de ce fait une taille efficace de la population réduite? En effet, Li & Hedgecock (1998) ont démontré que la taille efficace d'une population marine peut être considérablement réduite par une forte variance du succès reproducteur, qui pourrait alors générer un déséquilibre de phase gamétique temporaire. Cette seconde partie de l'étude nécessite le suivi en éclosion du cycle de reproduction d'adultes, dont les pontes en masse

successives seront récupérées et analysées, afin d'avoir accès au génotype de chaque géniteur et ainsi identifier leur contribution respective à chaque ponte.

3) Un mâle est-il capable de féconder plusieurs femelles? On a vu précédemment qu'il était important de démontrer directement que chaque mâle peut féconder plusieurs femelles (la variance du succès reproducteur femelle étant une des hypothèses permettant d'expliquer un plus faible  $N_e$  mitochondrial). Cette dernière partie de l'étude nécessite là encore de travailler en milieu contrôlé (suivi du cycle de maturation d'adultes en éclosion) et de récupérer les larves dans la cavité palléale des femelles : le génotype de la mère étant connu, la contribution paternelle pourra aisément être identifiée comme les génotypes de tous les géniteurs potentiels sont connus.



Figure 1 Carte de répartition géographique d'*Ostrea edulis* (liseré rouge) (d'après Jaziri, 1985)

## 2- MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Espèce étudiée *Ostrea edulis*

- TAXONOMIE : la systématique de l'huître plate (Mollusque Bivalve, Filibranches) est rappelée Tableau 1.

**Tableau 1 Systématique de l'huître plate *Ostrea edulis*.**

	SYSTEMATIQUE	CARACTERES DESCRIPTIFS
	Embranchement : Mollusques	Corps mou non segmenté, souvent protégé par une coquille calcaire, et comprenant le manteau, la masse viscérale, le pied et la cavité palléale Coquille à deux valves
	Classe : Bivalves (ou Lamellibranches)	Branchies disposées en lamelles Absence de tête Symétrie bilatérale nette
	Ordre : Filibranches	Quatre branchies en lamelles formées de filaments repliés Deux muscles adducteurs
	Famille : Ostréidés	Coquille à valve gauche plus profonde que la droite
	Genre : <i>Ostrea</i>	Coquille de l'adulte irrégulièrement ovale, avec des valves ayant le même contour extérieur, la supérieure faiblement marquée de plis rayonnants
	Espèce : <i>edulis</i>	

- REPARTITION GEOGRAPHIQUE : le genre *Ostrea* a une répartition très large dans les eaux chaudes et tempérées de tous les océans. L'espèce *Ostrea edulis*, qui vit essentiellement en milieu tempéré, se distingue ainsi des autres espèces du genre *Ostrea* à distribution plutôt tropicale. De caractère plus océanique que l'huître creuse, *Ostrea edulis* vit dans des eaux salées et peu turbides. Les bancs et les cultures sont situées sur des zones infralittorales ou toujours immergées. L'huître plate *Ostrea edulis* est l'huître indigène des côtes françaises. Son aire de répartition naturelle 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 1).

- CYCLE DE REPRODUCTION : l'huître plate est une espèce hermaphrodite asynchrone à sexualité consécutive rythmique. Elle est généralement protandre mais peut changer de sexe plusieurs fois dans la même saison de ponte. Elle constitue ses gonades au printemps et prend un aspect laiteux. Elle se reproduit en été et en automne dans le milieu naturel. C'est une espèce larvipare (ou incubatrice) : le mâle libère le sperme dans le milieu, la femelle filtre les gamètes et la fécondation a lieu dans la cavité palléale. Pendant 8 à 10 jours, la femelle incube les larves dans la cavité palléale puis les libère dans le milieu à raison d'un million par ponte

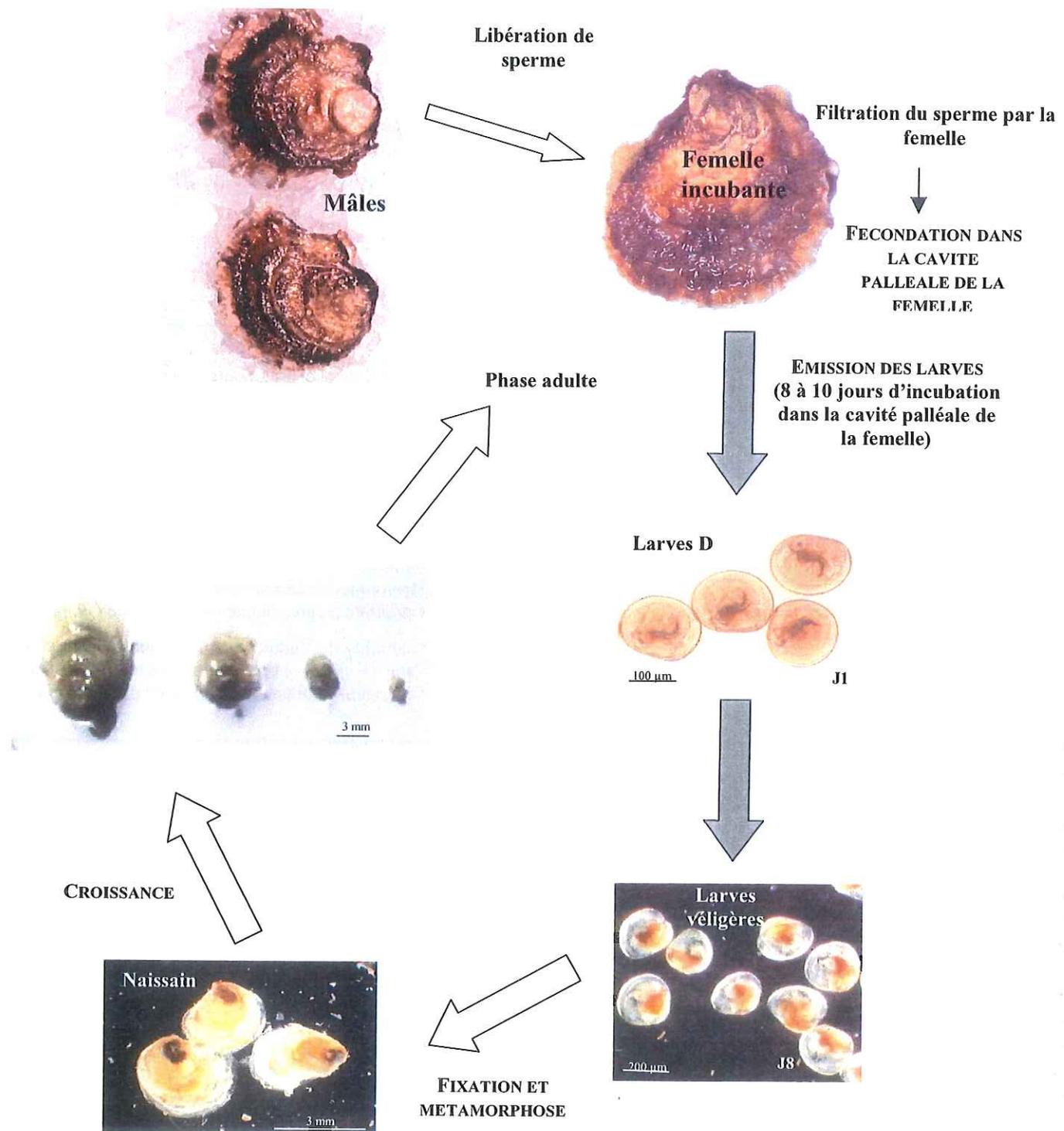
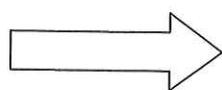


Figure 2 Cycle de reproduction d'*Ostrea edulis* (d'après Launey, 1998)



Phase benthique



Phase libre planctonique

en moyenne. Les larves mesurent alors 160  $\mu\text{m}$  environ. La phase planctonique s'échelonne sur une durée de 5 à 14 jours, au terme de 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 (Figure 2).

## 2.2. Echantillonnage et expérimentation

- En 2001, 14 branchies de femelles ardoisées ainsi que leurs larves associées (contenues dans la cavité palléale) ont été échantillonnées sur une zone de recrutement naturel située en baie de Quiberon :

- 26/06/01 : femelles F1 et F2
- 03/07/01 : femelle F3
- 10/07/01 : femelles F4, F5, F6, F7 et F8
- 17/07/01 : femelles F9 et F10
- 08/08/01 : femelles F21
- 14/08/01 : femelles F22, F23 et F24

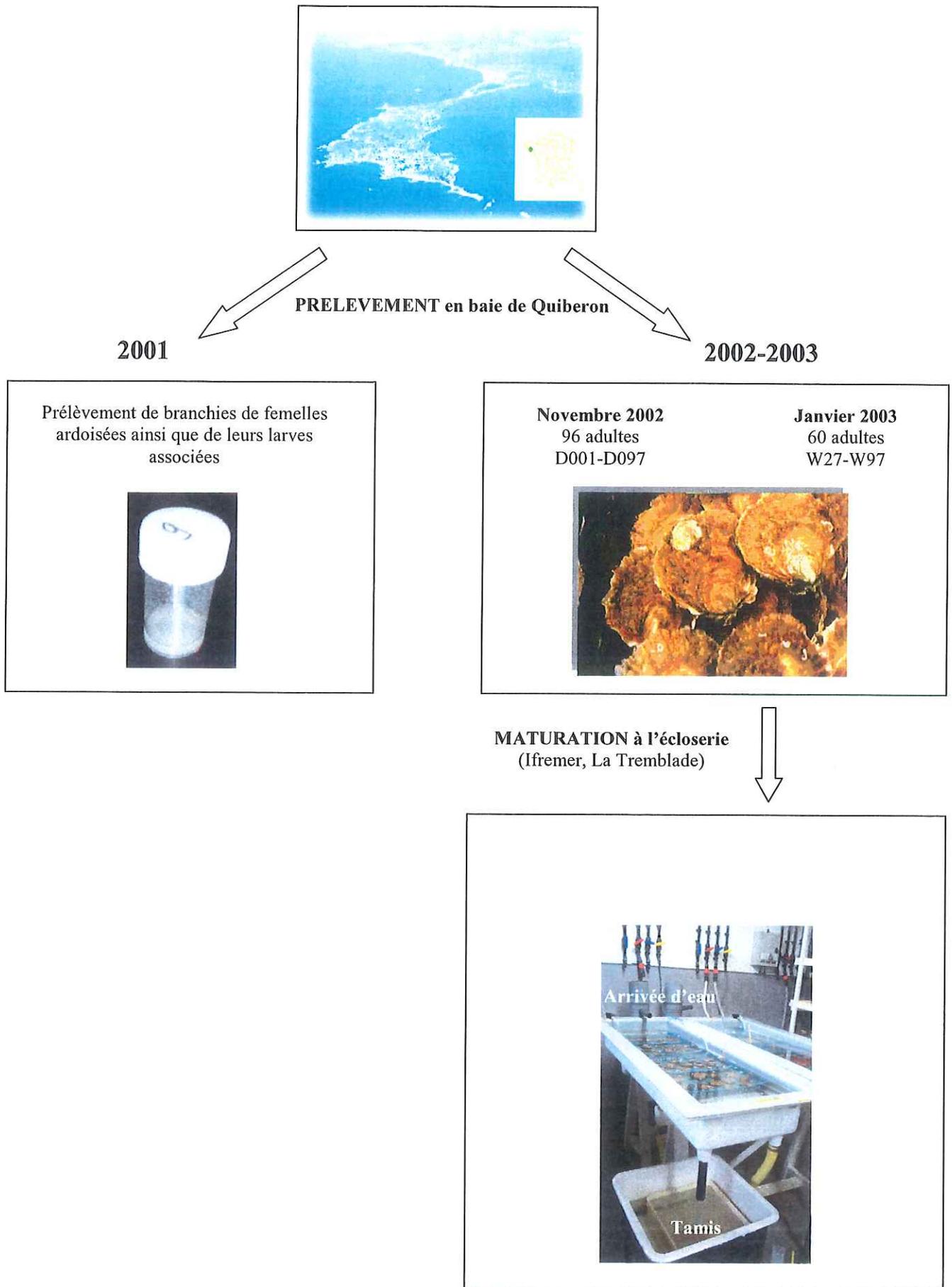
- En Novembre 2002, 96 adultes ont été prélevés en baie de Quiberon et ramenés à la station de La Tremblade pour suivre le cycle de reproduction. En raison de la forte mortalité des huîtres mises en maturation, un deuxième pool de 60 adultes issus de population naturelle ont été échantillonnés en Janvier 2003 et mis en maturation (Figure 3).

Ces deux pools d'adultes ont été placés dans des bacs différents. Pendant la maturation, la température de l'eau de mer a été progressivement augmentée. L'alimentation consistait en un mélange de trois souches de phytoplancton : *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* et *Tetraselmis suecica*. Ces animaux ont été typés par microsatellite et nous avons récolté des pontes de ces différents bacs. Dans la suite du rapport, le terme de "ponte en masse" désigne les pontes dont les larves ont été récupérées, après leur émission, sur un tamis.

## 2.3. Outils moléculaires : microsatellites

### 2.3.1. Présentation générale

Les microsatellites sont des régions de l'ADN constituées de répétitions en tandem de petite taille (entre 1 et 5 pb), pour une taille totale en général inférieure à 200 pb (Rasmussen *et al.*, 1991). Ils sont abondants et répartis aléatoirement le long du génome (Heard *et al.*, 1992) mais sont sous-représentés dans les régions télomériques et centromériques des chromosomes



**Figure 3 Echantillonnage et expérimentation**

(Wong *et al.*, 1990 ; Winterø *et al.*, 1992). Les microsatellites sont des marqueurs codominants, potentiellement neutres et très polymorphes. Ces loci montrent un important polymorphisme dû à la variation du nombre de répétitions du motif de base (Litt & Luty, 1989 ; Weber & May, 1989).

L'identification de marqueurs microsatellites peut se faire soit en recherchant des séquences répétées dans des banques de données existantes, soit en identifiant ces séquences par criblage d'une banque génomique.

Cette identification est longue mais leur utilisation est aisée en routine. De ce fait, ils sont utilisés pour répondre à de nombreuses questions biologiques. Du fait de leur fort polymorphisme, ils représentent un outil puissant :

- d'assignation de parenté
- d'étude de la structure des populations
- en cartographie

Les taux de mutations chez les microsatellites sont environ de  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  (Weissenbach *et al.*, 1992 ; Dallas, 1992). Le modèle de mutation des microsatellites reste discuté.

### 2.3.2. Définition des loci microsatellites

Au cours de cette étude, 4 loci ont été utilisés : OeduJ12, OeduU2, OeduH15 et OeduT5. Ils ont été définis par Launey (1998) en suivant le protocole ci-dessous :

- extraction d'ADN génomique et digestion par des enzymes de restriction
- sélection des fragments de 400-800 pb
- digestion du vecteur de clonage par une enzyme de restriction (plasmide)
- ligation
- transformation de bactéries compétentes
- criblage des banques partielles par des sondes dinucléotidiques, trinuécléotidiques et tétranucléotidiques
- repérage des clones positifs
- miniprep (extraction de l'ADN par lyse alcaline)
- séquençage et définition des amorces

Les caractéristiques et les conditions d'amplification des 4 loci microsatellites utilisés lors de cette étude sont résumés dans le Tableau 2.

**Tableau 2 Loci microsattellites de l'huître plate européenne *Ostrea edulis* utilisés.**

Locus	Motif répété	Gamme de taille des allèles	T <sub>a</sub> *	Séquence des amorces
OeduJ12	(GT) <sub>14</sub>	116-174 pb	50°C	J12-R TCG TCA CCT CCC TCT CAG AG J12-F GCT GTA TTT CCA TCA ATT CGA G
OeduU2	(AC) <sub>21</sub> (AG) <sub>7</sub>	146-210 pb	50°C	U2-R GAA AGA AAT GGA GGC AAT AAC U2-F ACC AAT GAA CAC AGA TCA CC
OeduH15	(ATCT) <sub>n</sub>	165-225 pb	50°C	H15-R TAA TGA TTT CGT TCG TTG AC H15-F TTT TGA CTC TGT GAT ATC GAC
OeduT5	(CA) <sub>15</sub>	106-166 pb	53°C	T5-R TAG TGA ATG GTC TTG CAT TCC T5-F2 CTT CGT TCT TGT ACG TAA GCG

\* T<sub>a</sub>=température d'appariement

### 2.3.3. Révélation du polymorphisme

Les séquences répétées sont en général encadrées par des séquences uniques elles-mêmes peu variables : les séquences flanquantes. La définition d'amorces dans ces régions flanquantes permet d'amplifier spécifiquement une séquence microsattellite par PCR. La taille relativement faible des fragments amplifiés permet une bonne séparation des fragments sur un gel de polyacrylamide et une détermination précise de chaque allèle.

## 2.4. Extraction d'ADN

### • EXTRACTION D'ADN DES ADULTES

Après anesthésie au Chlorure de Magnésium, un morceau de branchie a été prélevé et placé dans un tube Ependorf contenant de l'alcool 70%.

La première étape consiste en une lyse cellulaire : un fragment de branchie est récupéré et placé dans un mélange contenant 400 µl de tampon d'extraction (NaCl 5M, Tris 1M pH 8, EDTA 0,5M pH 8, SDS 10%) et 5 µl de protéinase K à 10 mg.ml<sup>-1</sup>. Cette étape de digestion dure une nuit au bain marie à 55°C.

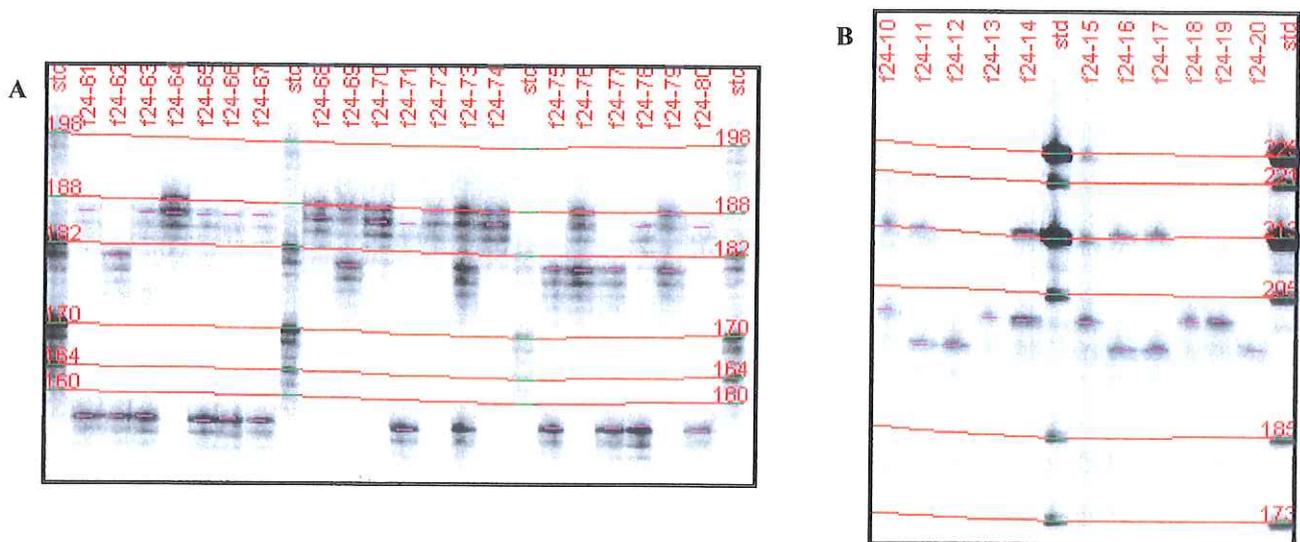
L'extraction de l'ADN a été effectuée en suivant la méthode classique au phénol-chloroforme.

Plusieurs étapes sont nécessaires :

- déprotéinisation par ajout de phénol-chloroforme : le phénol est un agent dénaturant des protéines, permettant la séparation protéines/acides nucléiques.
- précipitation de l'ADN par ajout d'éthanol 100%
- conservation de l'ADN par reprise du culot dans 50 µl de TE

### • EXTRACTION D'ADN LARVAIRE (80 LARVES PAR FEMELLE)

L'individualisation des larves s'effectue sous loupe binoculaire dans une cuve Dolfuss : chaque larve est placée dans un tube de 0,2 ml avec environ 4 µl d'éthanol 70%. Puis l'alcool est évaporé en plaçant les tubes 15 minutes au Speed Vac. A chaque larve est ajouté 50 µl de



**Figure 4 Révélation du polymorphisme des loci microsatellites par migration sur un gel de polyacrylamide (6,5 %)**

**A** : locus U2 (dinucléotidique)

**B** : locus H15 (tétranucléotidique)

Les témoins (std), dont la longueur des fragments (en pb) est connue, sont visualisés par les lignes verticales rouges surmontées de la longueur du fragment. Les échantillons analysés sont numérotés : par exemple, f24-61 correspond à la larve 61 de la femelle F24. Ce numéro est reporté au-dessus de chaque colonne permettant d'associer rapidement le génotype à la larve correspondante. Les traits violets, correspondant à l'identification de chaque allèle, sont placés manuellement sous le logiciel d'analyse d'images GENE PROFILER 4.0.

tampon (1,5 ml de buffer X10 PCR, 75  $\mu$ l du détergent Tween 20, qsp H<sub>2</sub>O 15 ml) et 5  $\mu$ l de protéinase K à 10 mg.ml<sup>-1</sup>. Les larves sont ensuite mises à incuber dans un thermocycleur 1 heure à 55°C et 20 minutes à 100°C.

## 2.5. Révélation du polymorphisme

### • PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Elle permet l'amplification sélective de petits fragments d'ADN grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. La réaction de PCR se fait dans un volume final de 10  $\mu$ l contenant la solution d'ADN et le mélange réactionnel (MgCl<sub>2</sub> 50 mM, tampon, dNTP 2 mM, amorces 1 pM, Taq polymérase). Selon les loci microsatellites considérés, le mélange réactionnel diffère légèrement (Annexe 1).

Le programme d'amplification comporte différentes étapes :

- 5 minutes à 95 °C (dénaturation initiale)
- 30 cycles successifs : 20 secondes à 95 °C (dénaturation), 20 secondes à 50 °C ou 53 °C (appariement des amorces, voir Tableau 2), 30 secondes à 72 °C (élongation)
- 3 minutes à 72 °C (élongation finale).

### • REVELATION DU POLYMORPHISME

Les amorces utilisées lors de la PCR sont marquées par des fluorochromes qui fluorescent soit à 700 nm (loci OeduJ12 et OeduU2) soit à 800 nm (loci OeduH15 et OeduT5). Après dénaturation de l'ADN par ajout de 3,5  $\mu$ l de rouge (cycle de 2 minutes à 95 °C), les produits de PCR migrent sur un gel de polyacrylamide (20 ml d'acrylamide liquide 6,5 %, 15  $\mu$ l de TEMED et 150  $\mu$ l d'APS 10 %) sur un séquenceur de type LICOR®. Les génotypes des adultes et des larves sont ensuite déterminés grâce à l'utilisation du logiciel d'analyse d'images GENE PROFILER 4.0. (Figure 4).

## 2.6. Variabilité et différenciation génétiques

Pour chaque échantillon (adulte ou de larves), plusieurs paramètres ont été estimés à l'aide du logiciel GENETIX 4.0.

- le nombre d'allèles par locus et par échantillon
- l'hétérozygotie observée Ho (proportion des individus hétérozygotes à chaque locus)

- la diversité génétique non biaisée  $H_{nb}$  de Nei. Cette estimation de l'hétérozygotie théorique moyenne attendue sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg est corrigée pour les biais liés à la taille de l'échantillon.

$$H_{nb} = 2N \sum (1 - p_i^2) / (2N - 1)$$

avec  $p_i$  la fréquence du  $i^{\text{ème}}$  allèle et  $N$  la taille de l'échantillon.

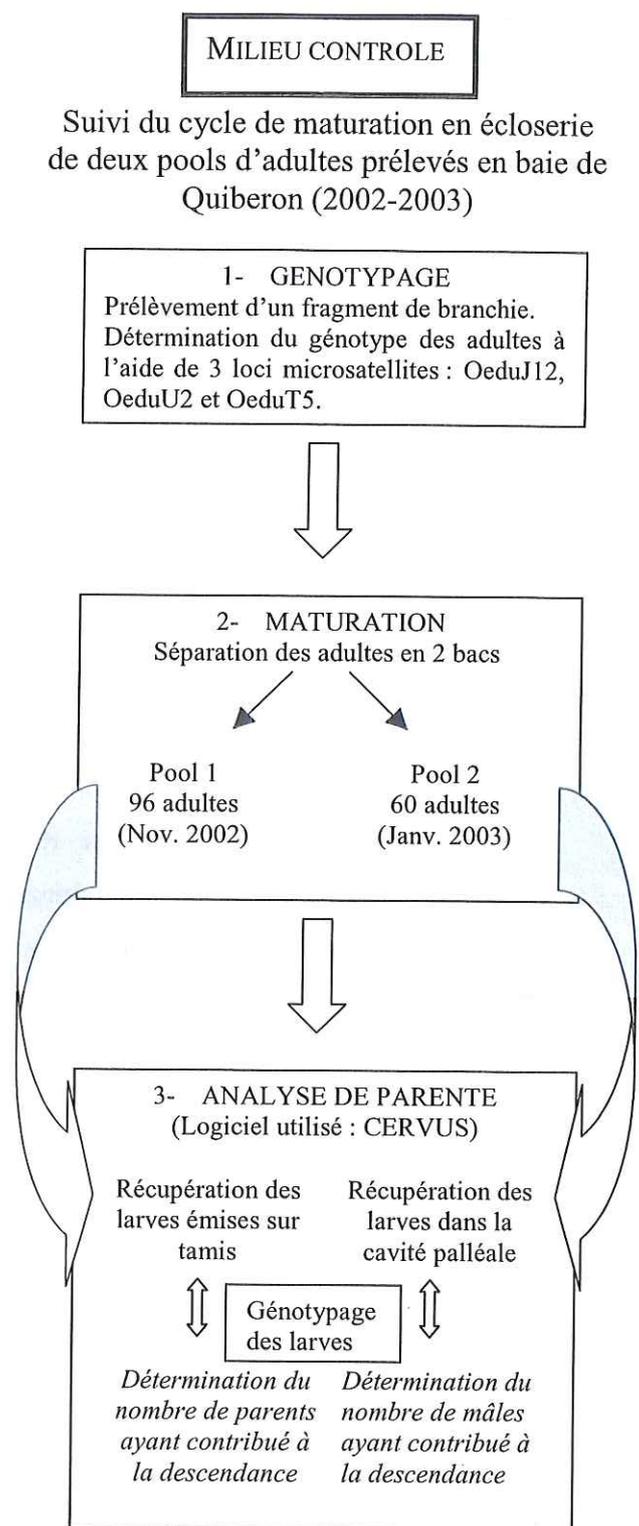
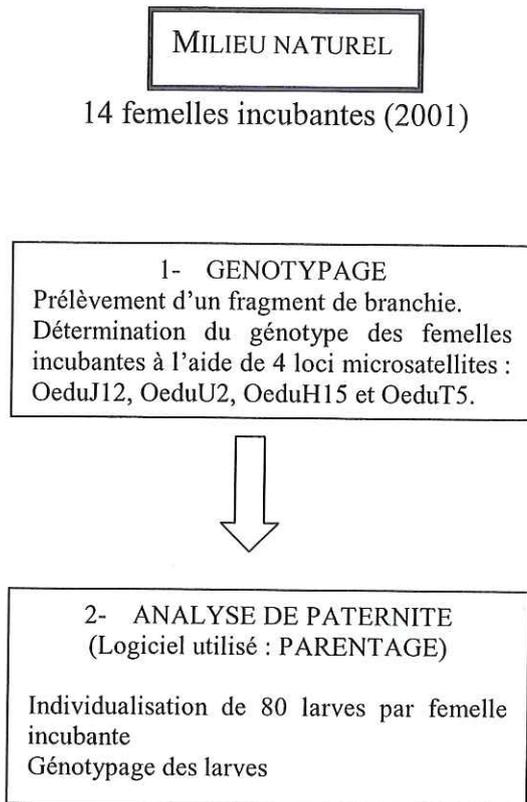
- l'indice de fixation de Wright  $F_{is}$  qui mesure les écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg à l'intérieur de chaque population (estimé selon Weir & Cockerham, 1984). Le logiciel GENEPOP ([genepop@wbiomed.curtin.edu.au](mailto:genepop@wbiomed.curtin.edu.au)) a permis de tester si ces écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg sont significatifs ou non. De plus, le déséquilibre de liaison a également pu être calculé sous ce logiciel, permettant de mesurer les associations préférentielles entre allèles de deux loci distincts : la ségrégation indépendante entre les loci est ainsi testée.

## 2.7. Effectif efficace

La taille efficace ( $N_e$ ) peut se définir comme la taille d'une population idéale (modèle de Wright Fisher) qui aurait les mêmes propriétés génétiques que la population observée (mêmes fréquences alléliques, même taux d'hétérozygotie).  $N_e$  est généralement beaucoup plus petit que l'effectif total réel de la population, les différences pouvant être liées à des paramètres de la reproduction et à l'histoire de vie des populations (sex-ratio biaisé, fluctuations démographiques, variations dans la fertilité individuelle, ...).

L'estimation de ce paramètre reste délicate en populations naturelles (Waples, 1989). L'estimation directe de ce paramètre, reposant sur des données démographiques, est difficile à obtenir pour des populations naturelles. En revanche, les méthodes indirectes utilisent des données génétiques. On distingue différentes méthodes basées sur le changement temporel des fréquences alléliques, l'excès d'hétérozygotie, la perte d'hétérozygotie et le déséquilibre de liaison.

La méthode dite "temporelle" utilisant les changements temporels des fréquences alléliques dans des générations successives a connu un succès récent (Pollack, 1983; Waples, 1989). 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 fréquences alléliques pour des loci sélectivement neutres.



**Figure 5** Présentation de la problématique d'analyse de parenté

Hedgecock *et al.* (1992) ont utilisé cette méthode pour estimer la taille efficace de plusieurs populations d'aquaculture (bivalves et crustacés) et ont développé le programme EPS qui a été utilisé ici.

Dans un premier temps on estime les fréquences alléliques et un estimateur de la variance temporelle des fréquences alléliques,  $F$ , standardisé pour compenser les différences entre loci pour les fréquences alléliques. L'estimateur utilisé ici,  $\hat{F}_k$ , est celui de Pollack (1983) pour les loci ayant plus de trois allèles :

$$\hat{F}_k = \frac{2}{K-1} \sum_{i=1}^K \frac{(x_{i,1} - x_{i,0})^2}{(x_{i,1} + x_{i,0})}$$

où  $K$  est le nombre d'allèles à un locus donné, et  $x_{i,1}$  et  $x_{i,0}$  les fréquences de l'allèle  $i$  dans la population dérivée et la population source respectivement.

La valeur moyenne sur la population,  $\bar{F}$ , est estimée par la moyenne de  $\hat{F}_k$  sur les différents loci, pondérée par le nombre d'allèles à chaque locus.

On obtient un estimateur de la moyenne harmonique de la taille efficace de la population sur l'intervalle de temps considéré :

$$\hat{N}_k = \frac{t}{\bar{F} - 1/(2S_0) - 1/(2S_t)}$$

où  $t$  est le nombre de générations entre le premier échantillonnage de  $S_0$  individus et l'échantillonnage de  $S_t$  individus.

L'intervalle de confiance à 95% pour  $\hat{N}_k$  est calculé d'après Waples (1989).

Le programme utilisé pour ces calculs n'accepte pas plus de 15 allèles par locus. Nous avons donc décidé de regrouper des allèles (allèles présents dans la population d'origine et non dans la population dérivée, allèles à basse fréquence dans les deux populations par exemple).

## 2.8. Analyses de parenté

Les analyses de parenté ont été effectuées à la fois pour des femelles incubantes prélevées dans le milieu naturel et pour des populations d'adultes maintenues en écloserie c'est-à-dire en milieu contrôlé (Figure 5).

### 2.8.1. Quand la mère est connue (femelles incubantes, milieu naturel)

Les larves ont été récupérées dans la cavité palléale de leur mère : le génotype de celle-ci est donc disponible. En revanche, nous n'avons pas accès aux génotypes des parents potentiels, ce qui limite considérablement la gamme de logiciels d'analyse de parenté utilisables. La seule information disponible concernant la population d'adultes, incluant les géniteurs potentiels, se résume aux fréquences alléliques (Taris, 2002).

Afin de déterminer le nombre de pères qui ont contribué à la descendance des femelles incubantes prélevées en 2001, le logiciel PARENTAGE développé par Ian Wilson a été utilisé (<http://www.maths.abdn.ac.uk/~ijw>). Il a été écrit pour assigner la paternité de juvéniles de calmars issus de cordons d'œufs (Emery *et al.*, 2001). A notre connaissance, il s'agit d'un des rares logiciels ne nécessitant pas les génotypes des parents potentiels.

Ce programme est basé sur les statistiques bayésiennes : (Shoemaker *et al.*, 1999) : des inférences sont faites sur la distribution de probabilité postérieure ( $p(\theta/X)$ ) des variables d'intérêt. Cette densité postérieure est proportionnelle à la probabilité antérieure (avant toute observation des données, basée sur notre connaissance du problème) multipliée par la vraisemblance d'observer les données sous le modèle. Le paradigme bayésien est en effet basé sur la formule suivante :

$$p(\theta / X) = \frac{p(\theta)p(X / \theta)}{p(X)}$$

- $\theta$  : paramètres d'intérêt
- $X$  : données observées
- $p(\theta)$  : distribution antérieure des paramètres (établie a priori)
- $p(\theta/X)$  : distribution postérieure des paramètres d'intérêt (distribution de probabilité conditionnelle du paramètre non observé étant donné les données observées).

Dans notre étude, le logiciel PARENTAGE a ainsi été utilisé pour calculer  $p(a_f, \theta/Y)$ ,  $a_f$  étant le vecteur des pères (l'élément  $a_f^{(i)}$  donnant le père de l'individu  $i$ ),  $\theta$  représentant un ensemble de variables non observées et  $Y$  représentant le vecteur des génotypes des descendants. Plusieurs distributions a priori ont été stipulées dans le fichier d'entrée du programme :

- concernant la distribution des descendants entre les mâles : contribution équivalente des mâles ou suivi d'une loi gamma (1,4)

- concernant la distribution des descendants entre les femelles : les femelles étant incubantes, la mère est connue avec certitude (d'où motherprior : 1)

- concernant le nombre de pères : de 1 à 40 ou de 1 à 100 selon les femelles.

Pour chaque permutation, les génotypes de tous les pères ayant contribué à la descendance (80 larves analysées) sont déterminés ; le nombre de larves associées à chaque père de génotype donné est précisé, permettant d'avoir accès à la contribution relative de chaque père. De plus, un calcul de fréquences sur les 1000 permutations permet d'estimer le nombre de pères moyen ayant fécondé la femelle incubante considérée ainsi que l'écart-type.

## 2.8.2. Quand la mère est connue et qu'il existe une liste de géniteurs potentiels

### • CALCUL DE LA PROBABILITE D'EXCLUSION

La probabilité d'exclusion correspond à la probabilité qu'un mâle pris au hasard dans la population soit exclu. Elle définit la puissance d'un jeu de marqueurs. La probabilité d'exclusion d'une population augmente avec le nombre de loci employés, le nombre d'allèles par locus et la distribution des allèles à chaque locus (Chakraborty *et al.*, 1974). Une augmentation de la probabilité d'exclusion accroît la vraisemblance de paternité au sein d'un set de parents mâles non exclus (Smouse & Chakraborty, 1986). C'est pourquoi il est indispensable de calculer les probabilités d'exclusion avant toute analyse de parenté afin de s'assurer que l'information contenue par les marqueurs moléculaires employés est suffisante pour effectuer des analyses de parenté (c'est-à-dire qu'elle est suffisante pour identifier les parents qui ont contribué à la descendance).

La probabilité d'exclusion au locus  $l$  se calcule à l'aide de la formule suivante dans le cas où un des parents (la mère dans notre cas) est connu avec certitude :

$$P_{El} = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3$$

avec  $n$  : nombre d'allèles au locus  $l$  et  $p_i$  : fréquence du  $i^{\text{ème}}$  allèle.

Dans le cas de  $L$  loci, la probabilité d'exclusion combinée peut être calculée de la manière suivante :

$$P_{CE} = 1 - \prod_{l=1}^L (1 - P_{El})$$

### • DETERMINATION DU NOMBRE DE PERES AYANT CONTRIBUE A LA DESCENDANCE

Trois approches peuvent être utilisées pour calculer la paternité quand tous les parents candidats sont échantillonnés :

- méthode d'exclusion (Ellstrand, 1984 ; Chakraborty *et al.*, 1988) : les génotypes multilocus des descendants et des mères sont comparés avec ceux de tous les pères potentiels;

les pères potentiels sont exclus par examen de la paternité locus par locus (la contribution de la mère étant identifiée, l'allèle restant à chaque locus doit correspondre à la contribution paternelle) ; on procède ainsi locus par locus jusqu'à ce qu'un seul ou plusieurs pères restent.

- méthode d'allocation catégorique (Foltz & Hoogland, 1981 ; Meagher, 1986 ; Meagher & Thompson, 1986 et 1987; Marshall *et al.*, 1998) : basée sur l'approche de vraisemblance, le rapport de vraisemblance (le père supposé est le vrai père / le père supposé est un individu non lié choisi au hasard dans la population) est calculé locus par locus ainsi que le LOD score de chaque père (multiplication des rapports de vraisemblance obtenus pour chaque locus); le père le plus vraisemblable est assigné à un descendant donné.

- méthode d'allocation fractionnée (Devlin *et al.*, 1988 ; Roeder *et al.*, 1989 ; Smouse & Meagher, 1994) : les vraisemblances paternelles sont calculées de la même manière que pour l'allocation catégorique ; la méthode assigne la paternité d'un descendant à un ou plusieurs parents mâles non exclus, la fraction assignée à chaque parent mâle particulier étant proportionnelle à sa vraisemblance de paternité par rapport aux vraisemblances de tous les autres.

Dans notre étude, le logiciel CERVUS 2.0. (accessible sur <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen>), basé sur le maximum de vraisemblance, a été utilisé, permettant d'assigner la paternité avec une confiance statistique donnée (Marshall *et al.*, 1998).

### 2.8.3. Quand aucun des parents n'est connu mais qu'il existe une liste de géniteurs potentiels

- CALCUL DE LA PROBABILITE D'EXCLUSION

La probabilité d'exclusion au locus  $l$  se calcule de la manière suivante dans le cas où aucun parent n'est connu :

$$P_{El} = 1 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^2 + 2 \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^3 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^4$$

avec  $n$  : nombre d'allèles au locus  $l$  et  $p_i$  : fréquence du  $i^{\text{ème}}$  allèle.

Dans le cas de  $L$  loci, la probabilité d'exclusion combinée peut être calculée de la manière suivante :

$$P_{CE} = 1 - \prod_{l=1}^L (1 - P_{El})$$

- DETERMINATION DU NOMBRE DE PARENTS AYANT CONTRIBUE A LA DESCENDANCE

Les trois mêmes approches peuvent être utilisées pour déterminer la parenté d'un descendant lorsque les génotypes de tous les parents potentiels sont disponibles. Là encore, le logiciel CERVUS a été utilisé.

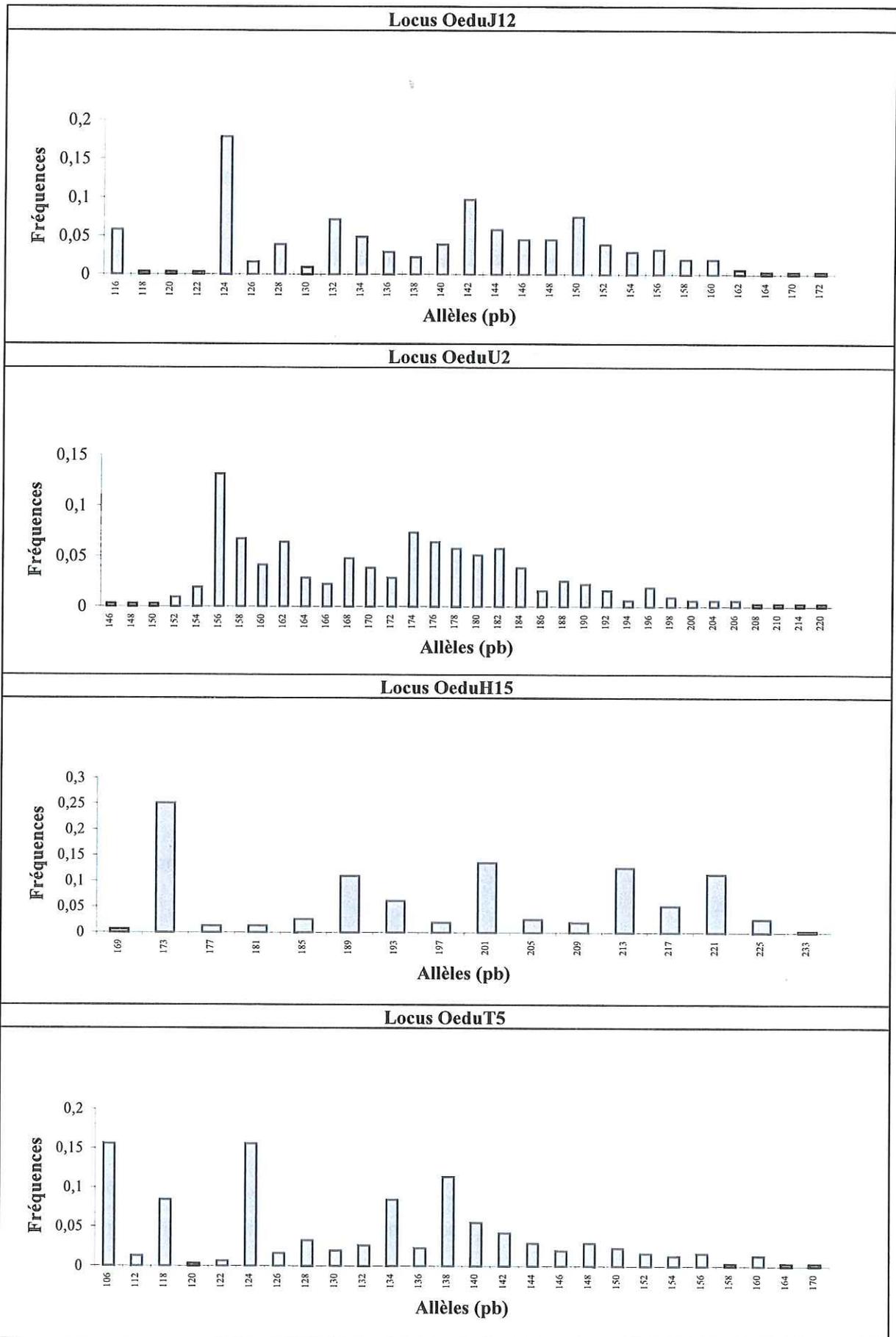


Figure 6 Fréquences alléliques aux 4 loci microsatellites étudiés pour 156 adultes (populations D et W).

### 3- RESULTATS

#### 3.1. Déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison a été calculé par paires de loci pour chaque population et pour les deux populations regroupées grâce à l'option 2 du logiciel Genepop (accès direct sur le site genepop@wbiomed.curtin.edu.au). Aucun test n'est significatif ( $p > 0,633$  pour toutes les combinaisons possibles). Aucun déséquilibre de liaison n'a donc pu être mis en évidence dans les deux populations naturelles étudiées : les 4 loci étudiés ségréguent de manière indépendante.

#### 3.2. Variabilité intra-population dans les populations adultes

##### 3.2.1. Polymorphisme

Les fréquences alléliques par population et par locus sont données en Annexe 2. Le nombre total d'allèles pour chaque population est donné dans le Tableau 3.

**Tableau 3** Nombre total d'allèles par population et par locus et nombre moyen d'allèles par population ( $N_{am}$ ). (entre parenthèses : écart-type)

Population	N	OeduJ12	OeduU2	OeduH15	OeduT5	$N_{am}$
D	96	26	30	15	24	23,75 (5,5)
W	60	21	26	16	23	21,50 (3,6)
D+W	156	27	34	16	26	25,75 (6,4)

Le nombre moyen d'allèles est très important, de 23.75 pour la population D et de 21.5 pour la population W.

##### 3.2.2. Répartition des fréquences alléliques

Le  $F_{st}$  par paire de population a été calculé sous GENETIX ( $F_{st} = -0.00157$  entre les populations D et W, non significatif). Aucune différenciation significative n'a pu être mise en évidence entre ces deux populations. Le calcul des fréquences alléliques a donc été réalisé sur les deux populations regroupées pour une estimation plus fiable.

Les distributions des fréquences alléliques sur les différents loci sont données dans la Figure 6. Tous les loci montrent des distributions multimodales. On n'observe pas de

discontinuité majeure dans les distributions et les pas entre les allèles correspondent à une répétition du motif de base.

### 3.2.3. Taux d'hétérozygotie

Les valeurs d'hétérozygotie observée et attendue sont présentées dans le Tableau 4. L'hétérozygotie moyenne attendue, sur tous les loci, est de 0.91 pour la population D et de 0.92 pour la population W, soit une valeur considérablement plus élevée que pour les allozymes. Globalement, l'hétérozygotie moyenne observée est inférieure à l'hétérozygotie théorique attendue au vu des fréquences alléliques.

**Tableau 4 Hétérozygotie par locus et par population, hétérozygotie moyenne sur tous les loci.  $H_o$  est l'hétérozygotie observée,  $H_{nb}$  l'hétérozygotie attendue non biaisée sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg (Nei, 1978).**

		Population D	Population W	Population D+W
Effectif		96	60	156
OeduJ12	$H_o$	0,895	0,966	0,922
	$H_{nb}$	0,928	0,932	0,929
OeduU2	$H_o$	0,906	0,900	0,904
	$H_{nb}$	0,947	0,945	0,946
OeduH15	$H_o$	0,747	0,767	0,755
	$H_{nb}$	0,862	0,887	0,871
OeduT5	$H_o$	0,916	0,898	0,909
	$H_{nb}$	0,914	0,921	0,916
Moyenne	$H_o$	0,866	0,883	0,873
	$H_{nb}$	0,913	0,921	0,915

Un test statistique pour le déficit en hétérozygotes est proposé sur le Tableau 5, qui donne les valeurs de  $F_{is}$  (estimées selon Weir & Cockerham) et les probabilités exactes de  $p$  calculées à l'aide de l'option 1 du logiciel Genepop. Les trois tests multilocus sont positifs. Sur l'ensemble des loci, les deux populations étudiées, prises ensemble ou séparément, montrent des déficits en hétérozygotes par rapport aux proportions attendues sous Hardy-Weinberg, déficit significatif lorsque les données sont regroupées sur les deux populations. Si on calcule les  $F_{is}$  par locus et par population, la situation apparaît différente selon les loci et selon la population considérée. Les loci OeduJ12 et OeduT5 présentent des valeurs de  $F_{is}$  positives ou négatives selon la population considérée mais jamais significatives. Le point essentiel est que le déficit significatif en hétérozygotes de la population D est essentiellement dû au locus OeduH15, seul locus à présenter un déficit significatif ( $p=0.0075$ ). De même, pour la population W, même si aucun déficit en hétérozygotes significatif n'a pu être mis en évidence,

il apparaît là encore que le locus OeduH15 est responsable de la majorité du déficit observé (p=0.071 pour ce locus, à la limite de la significativité).

**Tableau 5** Ecart à Hardy-Weinberg estimé par le calcul du Fis selon Weir & Cockerham (1984), et probabilité associée au test de significativité.

Population	Multilocus	OeduJ12	OeduU2	OeduH15	OeduT5
D	0,051 **	0,036 <sup>(NS)</sup>	0,043 <sup>(NS)</sup>	0,134 **	-0,002 <sup>(NS)</sup>
W	0,042 <sup>(NS)</sup>	-0,037 <sup>(NS)</sup>	0,048 <sup>(NS)</sup>	0,136 <sup>(NS)</sup>	0,025 <sup>(NS)</sup>
D+W	0,047 *	0,007 <sup>(NS)</sup>	0,045 <sup>(NS)</sup>	0,134 **	0,007 <sup>(NS)</sup>

NS p>0.05, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

### 3.2.4. Calcul des fréquences des allèles nuls

Chakraborty *et al.* (1992) ont proposé une méthode de calcul de la fréquence des allèles nuls (r) à partir du déficit en hétérozygotes apparent, et montrent qu'on peut estimer r à partir des valeurs d'hétérozygotie observée  $H_o$  et attendue  $H_{nb}$  par :

$$r = \frac{H_{nb} - H_o}{H_{nb} + H_o}$$

La fréquence des allèles nuls peut être estimée selon Brookfield (1996) qui, contrairement à Chakraborty *et al.* (1992), prend en compte l'existence des individus non amplifiés, considérés comme homozygotes pour l'allèle nul. Si la proportion d'homozygotes nuls est N, Brookfield (1996) montre que le maximum de vraisemblance pour l'estimateur de r est :

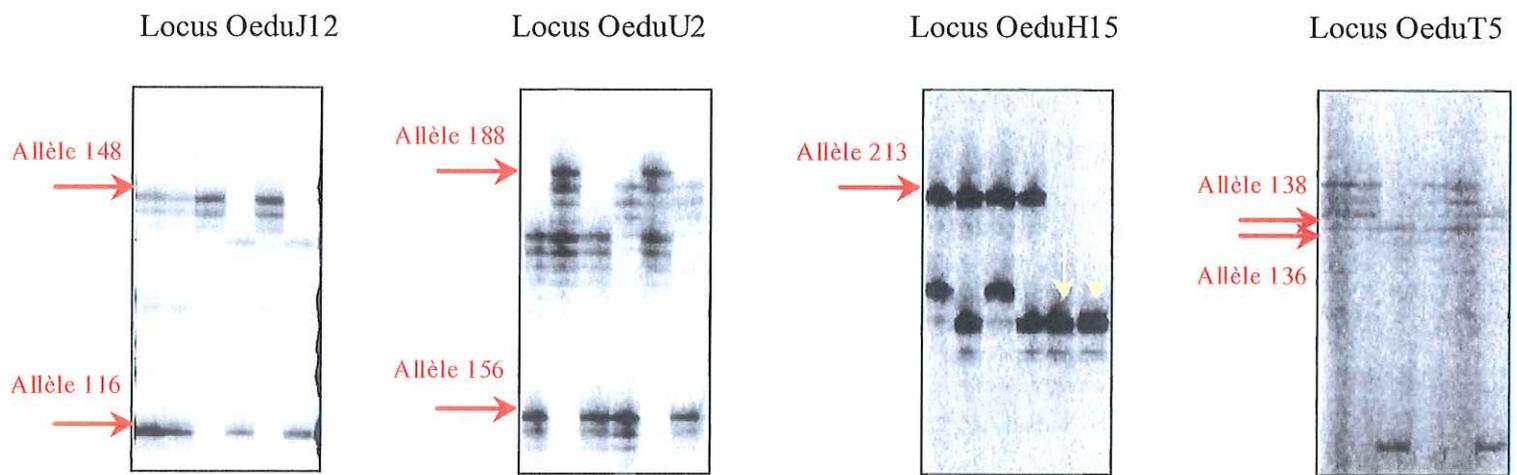
$$r = \frac{A + \sqrt{A^2 + B}}{2(1 + H_{nb})}$$

où  $A = H_{nb}(1 + N) - H_o$  et  $B = 4N(1 - H_{nb}^2)$ .

Ces deux méthodes donnent des estimations respectivement minimales et maximales pour la fréquence des allèles nuls. Le calcul des fréquences des allèles nuls au locus OeduH15 est donné pour chaque population et pour les deux populations regroupées dans le Tableau 6. Ces fréquences sont relativement élevées, entre 7 à 10% selon la méthode de calcul employée.

**Tableau 6** Estimation des fréquences des allèles nuls au locus OeduH15 (r) en fonction du taux d'hétérozygotie observé  $H_o$ , attendu  $H_{nb}$  et de la fréquence des individus n'ayant pas amplifié (N).

Population	$H_{nb}$	$H_o$	N	r (Brookfield, 1996)	r (Chakraborty et al., 1992)
D	0.862	0.747	0.03	0.071	0.1
W	0.887	0.767	0.03	0.073	0.099
D+W	0.871	0.755	0.03	0.071	0.099



**Figure 7** Adéquation entre le génotype de la femelle incubante et celui des larves associées. Exemple pour les larves 75, 76, 77, 78, 79 et 80 de la femelle F24, correspondant aux 6 colonnes représentées sur chaque image. Les allèles de la mère sont représentés par les flèches rouges (dénomination de l'allèle correspondant à la longueur en paires de bases du fragment amplifié). Les deux flèches jaunes mettent en évidence deux larves (79 et 80) dont le génotype au locus OeduH15 n'est pas compatible avec celui de la mère (homozygote pour l'allèle 213).

### 3.3. Analyses de parenté

#### 3.3.1. Probabilités d'exclusion

Les probabilités d'exclusion ont été calculées pour chaque locus ( $PE_i$ ) et pour les loci combinés progressivement ( $PE(C)$ ). Ainsi, dans le cas où un parent est connu avec certitude, la probabilité d'exclusion dans la population W est de 99.5 % lorsque les loci OeduJ12, OeduU2 et OeduH15 sont pris en compte et de 99.9 % lorsque les 4 loci sont pris en compte (Tableau 7).

**Tableau 7 Probabilités d'exclusion ( $PE_i$ ) pour chaque locus et pour les loci combinés ( $PE(C)$ ) calculées dans le cas où un parent est connu avec certitude.**

	Adultes D (n=96)			Adultes W (n=60)			Adultes D + W (n=156)		
	Nb allèles	$PE_i$	$PE(C)$	Nb allèles	$PE_i$	$PE(C)$	Nb allèles	$PE_i$	$PE(C)$
OeduJ12	26	0.848	0.848	21	0.847	0.847	27	0.852	0.852
OeduU2	30	0.884	0.982	26	0.874	0.981	34	0.886	0.983
OeduH15	15	0.721	0.995	16	0.761	<b>0.995</b>	16	0.741	0.996
OeduT5	24	0.818	0.999	23	0.827	<b>0.999</b>	27	0.828	0.999

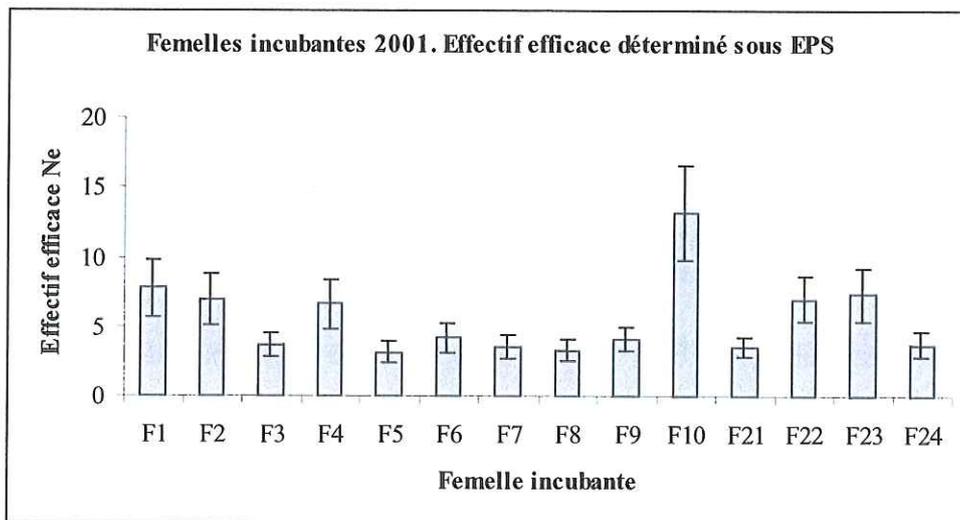
Les mêmes calculs ont été effectués dans le cas où aucun parent n'est connu pour la population D. En prenant en compte les trois premiers loci, la probabilité d'exclusion est dans ce cas de 97.6 % (Tableau 8) au lieu de 99.5 % (Tableau 7).

**Tableau 8 Probabilités d'exclusion ( $PE_i$ ) pour chaque locus et pour les loci combinés ( $PE(C)$ ) calculées dans le cas où aucun parent n'est connu.**

	Adultes D (n=96)		
	Nb allèles	$PE_i$	$PE(C)$
OeduJ12	26	0.737	0.737
OeduU2	30	0.792	0.945
OeduH15	15	0.562	<b>0.976</b>
OeduT5	24	0.693	0.993

#### 3.3.2. Femelles incubantes 2001 prélevées en milieu naturel

L'étude porte sur 14 femelles incubantes, dont 4 précédemment analysées par Taris (2002). Pour chacune d'elle, le génotype aux 4 loci microsatellites a été déterminé. L'ADN de 80 larves associées à chaque femelle incubante a été extrait afin de déterminer le génotype multilocus de ces larves. Lors de l'analyse, la présence des allèles maternels est vérifiée



**Figure 8** Histogramme représentant l'effectif efficace théorique ayant généré les cohortes de chaque femelle incubante prélevée en 2001 dans le milieu naturel.

comme illustré dans la Figure 7. Cinq femelles analysées, F4, F6, F8, F23 et F24 présentent quelques larves dont le génotype n'est pas compatible avec celui de la mère au locus OeduH15. Les 5 femelles impliquées sont homozygotes à ce locus. L'inadéquation se révèle par la présence de larves homozygotes pour un allèle autre que celui porté par la mère (Figure 7). De ce fait, le locus OeduH15 n'a pas été pris en compte dans les analyses de parenté pour ces 5 femelles.

- CALCUL DE L'EFFECTIF EFFICACE SOUS LE LOGICIEL EPS

L'effectif efficace "théorique" (mère connue) ayant généré les cohortes de chaque femelle incubante a été déterminé en se basant sur la variation des fréquences alléliques entre la population d'adultes reproducteurs (échantillonnage de 68 adultes en 2001, dont 21 femelles incubantes; Taris, 2002) et les pontes récupérées dans la cavité palléale de chaque femelle (80 larves individualisées par femelle). Celui-ci est assez variable selon la femelle incubante considérée, allant de 3.17 pour F5 à 13.14 pour F10, mais reste peu élevé (Figure 8).

- DETERMINATION DU NOMBRE DE PERES SOUS LE LOGICIEL PARENTAGE

Pour chaque femelle incubante, le nombre d'allèles par locus a été déterminé. Le nombre moyen d'allèles par locus est très variable, de 4.3 pour les femelles F7 et F21 à 18.5 pour la femelle F10. Puis le nombre de pères moyen associé à chaque femelle a été déterminé à l'aide du logiciel PARENTAGE. Là encore les résultats sont très variables, de 1 pour les femelles F5, F8 et F21 à 47.9 pour la femelle F10 (Tableau 9). Il existe une très bonne corrélation entre le nombre moyen d'allèles par locus et le nombre de pères moyen ( $r=0.96$ ).

**Tableau 9** Nombre d'allèles par locus, nombre moyen d'allèles et nombre de pères moyen déterminé sous PARENTAGE pour 14 femelles incubantes prélevées en milieu naturel en 2001. En italique sont figurés les résultats pour les 4 femelles analysées par Taris (2002). En gras sont figurés les nombres d'allèles pour les loci utilisés au cours des analyses de parenté.

Femelle	Nombre d'allèles par locus				Nombre moyen d'allèles	Nombre de pères moyen
	OeduJ12	OeduU2	OeduH15	OeduT5		
<i>F1</i>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	-	15.3	35.48 +/- 4.29
F2	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	-	14.3	26.5 +/- 2.74
<i>F3</i>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	-	6	7.13 +/- 9.93
F4	<b>11</b>	<b>15</b>	10	<b>17</b>	13.3	26.92 +/- 3.24
<i>F5</i>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	-	7	1
F6	<b>14</b>	<b>16</b>	6	<b>12</b>	12	14.66 +/- 1.38
<i>F7</i>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	-	4.3	2
F8	<b>8</b>	<b>9</b>	7	<b>6</b>	7.5	1
F9	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	12.3	14.58 +/- 4.16
F10	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	18.5	47.91 +/- 3.87
F21	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	4.3	1
F22	<b>17</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	17.5	34.63 +/- 1.80
F23	<b>20</b>	<b>23</b>	10	<b>17</b>	17.5	39.80 +/- 3.66
F24	<b>7</b>	<b>8</b>	6	<b>9</b>	7.5	6.9 +/- 1.97

### Femelles incubantes 2001. Analyse de parenté sous PARENTAGE

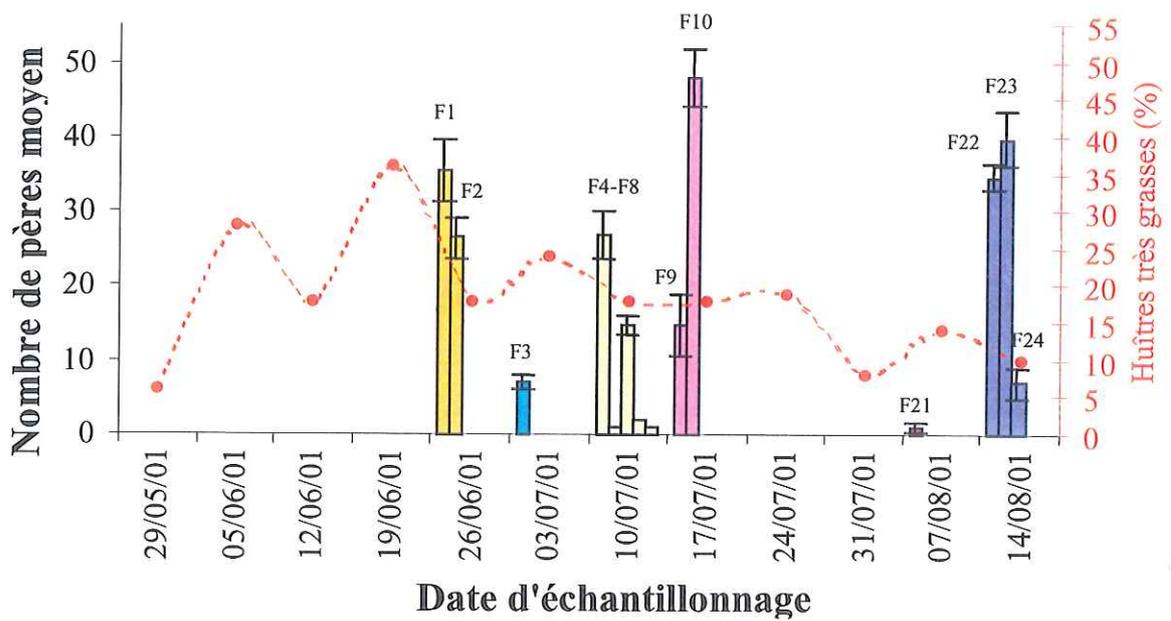


Figure 9 Histogramme représentant le nombre de pères moyen déterminé sous PARENTAGE pour chaque femelle incubante prélevée en milieu naturel en fonction de la date d'échantillonnage. A cet histogramme est superposé une courbe montrant l'évolution du pourcentage d'huîtres très grasses pendant la période d'échantillonnage.

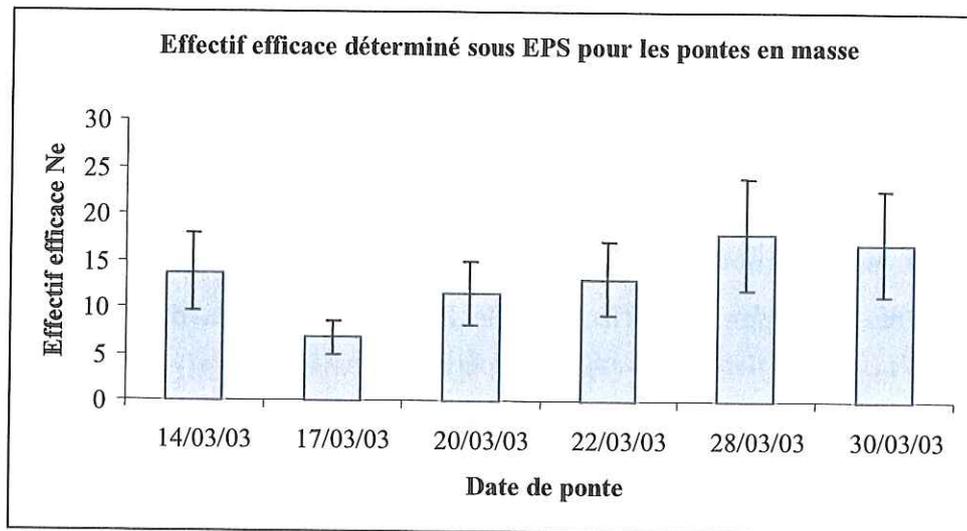
Nous avons établi la distribution du nombre de pères moyen pour chaque femelle incubante en fonction de la date d'échantillonnage. Aucun patron particulier n'a pu être mis en évidence d'autant plus que le nombre de femelles prélevées à chaque date d'échantillonnage est variable (une femelle prélevée le 03/07/01, cinq femelles le 10/07/01). Cependant il est clair que le nombre de pères moyen est très variable entre des femelles prélevées à la même date, de 1 pour la femelle F8 à 26.9 pour F4 le 10/07/01 (Figure 9).

Deux fichiers de départ ont été utilisés pour calculer le nombre de pères. Le premier stipule que la contribution des mâles à la descendance est variable. Le second établit a priori que chaque parent mâle contribue de manière équivalente à la descendance. Ces deux fichiers ont été utilisés pour calculer le nombre de pères ayant contribué à la descendance pour les femelles F3, F4, F5, F7, F8, F21 et F24. Les résultats issus de ces fichiers ont été comparés. Etablir a priori une contribution équivalente de tous les pères amène à une estimation du nombre de pères minimum. En effet, tous les pères possédant a priori une contribution équivalente, le logiciel ne tient pas compte des pères minoritaires (intervenant dans un seul ou un petit nombre des descendants). C'est pourquoi le nombre de pères moyen passe de 1 à 5.33 pour F5 en fonction de la loi de probabilité établie a priori pour la distribution des pères (Tableau 10).

**Tableau 10 Comparaison des résultats obtenus pour le nombre de pères moyen en fonction de la loi établie a priori pour la distribution des descendants entre les parents mâles**

Femelles	Nombre de pères moyen	
	Loi gamma (1,4)	Contribution équivalente des pères
F3	7.05 +/- 1.55	7.13 +/- 0.93
F4	32.67 +/- 8.3	26.92 +/- 3.24
F5	5.33 +/- 1.41	1
F7	2.01 +/- 0.12	2
F8	5.6 +/- 0.86	1
F21	1.32 +/- 0.73	1
F24	7.95 +/- 1.15	6.9 +/- 1.97

Même si on a établi a priori que chaque père contribuait de manière équivalente à la descendance, on a pu mettre en évidence une variance dans le succès reproducteur des mâles. Pour les femelles F5, F8 et F21 le génotype du père a pu être déterminé de manière non ambiguë : le génotype donné pour chacune des 1000 permutations est identique. En reprenant le génotype de chaque larve (dont le génotype de la mère est connue), ce génotype est compatible avec 91.25 % des larves pour F5 ; 82.5 % pour F8 et 97.5 % pour F21. Pour les larves où ce génotype n'est pas compatible, l'inadéquation des allèles paternels avec le génotype de ces larves est valable pour plusieurs loci, permettant d'exclure une erreur de



**Figure 10** Détermination de l'effectif efficace pour chacune des pontes en masse issues d'adultes maintenus en éclosion. Celui-ci a été calculé sous le logiciel EPS à partir de la variance des fréquences alléliques entre les deux générations.

typage et ainsi de mettre en évidence une contribution mineure d'autres pères . Cette mise en évidence de la participation à la descendance de contributeurs minoritaires est en relation une fois de plus avec la différence dans le nombre de pères moyen selon le fichier de départ. Pour la femelle F21, qui présentait la différence la plus faible entre les deux estimateurs, le contributeur est plus que majoritaire puisqu'il participe à 97.5 % des larves. De ce fait, moins de contributeurs minoritaires ont participé à la descendance, ce qui explique la faible différence entre les deux estimateurs.

De même pour la femelle F7, les génotypes des deux pères ont été déterminés. Avec une contribution équivalente de chaque père, 999 sur 1000 permutations donnent deux pères dont le génotype est établi avec certitude. Dans le cas d'une distribution gamma (1,4), deux pères sont là encore supposés mais 11 permutations proposent trois pères. Les génotypes des deux pères déterminés par le logiciel sont les mêmes que dans les cas précédents. Ainsi, 6 génotypes possibles sont proposés. Pour chaque permutation, chaque génotype paternel étant associé à un nombre de larves, il est possible de déterminer la contribution de chaque génotype à la descendance :

- père 1 : 42.28 %
  - père 2 : 41.54 %
  - père 3 : 7.73 %
  - père 4 : 7.56 %
  - père 5 : 0.53 %
  - père 6 : 0.325 %
- } deux pères identifiés avec établissement a priori d'une distribution équivalente de chaque père

Pour les autres femelles, présentant un nombre d'allèles plus important, seul le second fichier établissant une contribution équivalente des pères a pu être utilisé du fait de la puissance de calcul trop importante requise avec le premier fichier.

### 3.3.3. Analyse des pontes en masse issues d'adultes maintenus en éclosion

Les dates de récupération des pontes successives sont présentées en Annexe 3. Seules 6 pontes ont pu être analysées. Globalement, le nombre moyen d'allèles pour chaque ponte est plus faible (14.3 à 18.3) que pour la population d'adultes géniteurs (24.3).

- CALCUL DE L'EFFECTIF EFFICACE SOUS LE LOGICIEL EPS

Les fréquences alléliques de la population source ont été déterminées sur les 63 adultes ayant survécu 15 jours avant la date de la première ponte. En effet, l'incubation des larves dans la cavité palléale durant 10 jours, les individus qui sont morts 15 jours avant la ponte n'ont pas pu participer à celle-ci. Les fréquences alléliques de la population dérivée ont été obtenues à

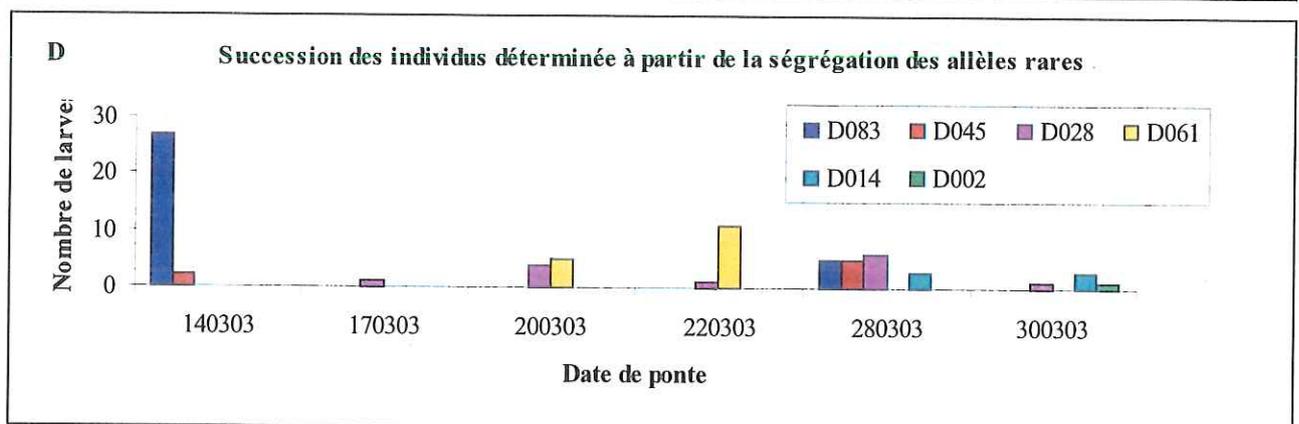
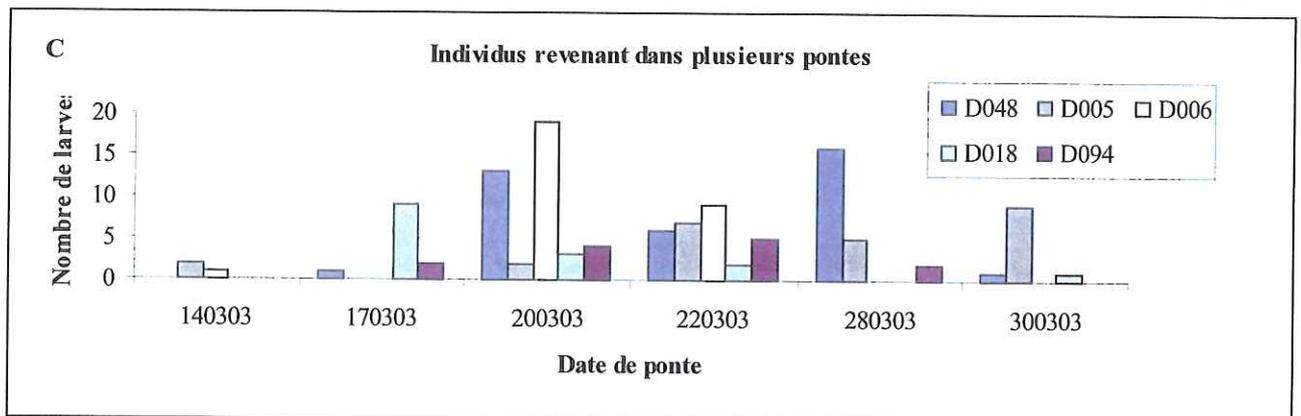
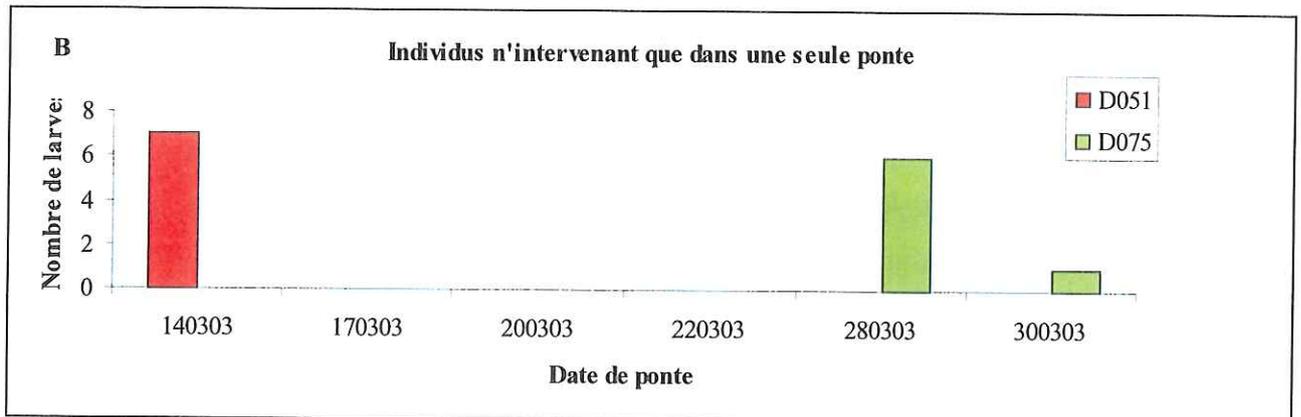
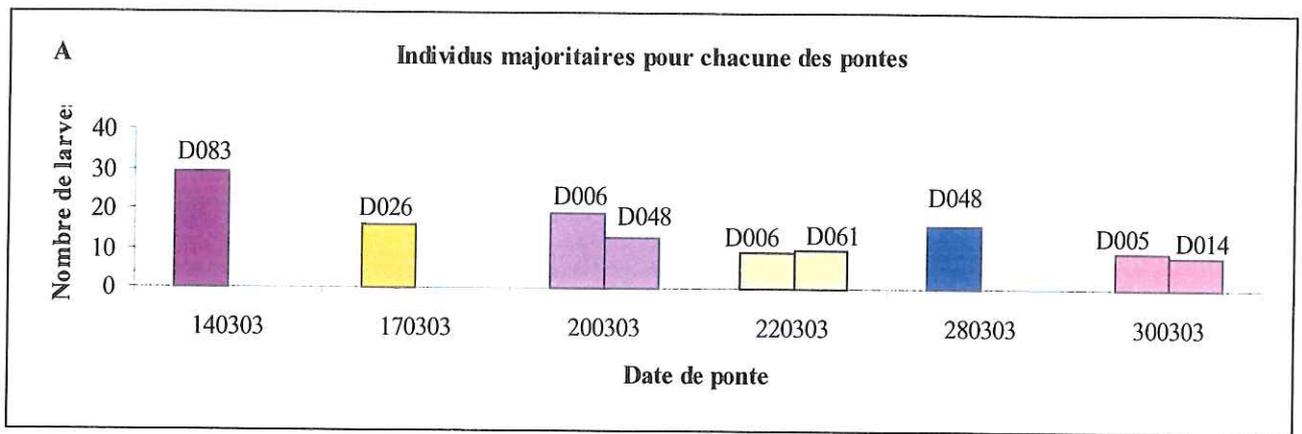


Figure 11 Histogrammes représentant la succession des individus participant aux pontes successives. Les adultes contribuant à chaque ponte ont été identifiés à l'aide du logiciel CERVUS basé sur le maximum de vraisemblance.

partir des 80 larves individualisées pour chacune des pontes. L'effectif efficace, représentant le nombre de parents parmi la population de géniteurs potentiels qui ont contribué à la descendance, est relativement faible, compris entre 6.77 pour la ponte du 17/03/03 et 17.87 pour celle du 28/03/03 (Figure 10).

- DETERMINATION DES PARENTS AYANT CONTRIBUE A LA DESCENDANCE SOUS LE LOGICIEL CERVUS

Afin de déterminer le couple de parents le plus vraisemblable associé à chaque larve, le logiciel CERVUS a été utilisé deux fois de suite. Lors du premier run, les deux parents les plus vraisemblables ont été déterminés pour chaque larve associés ou non à une certaine confiance statistique (80 ou 95%). Lors du deuxième run, le parent considéré comme le plus vraisemblable à l'issue du premier run est établi comme le parent connu. A l'issue du deuxième run, si le parent le plus vraisemblable correspond au deuxième parent le plus vraisemblable du premier run, alors la paire parentale a été déterminée pour la larve considérée (Marshall, com. pers.). Ainsi, la proportion de larves dont le couple de parents a pu être déterminé est de 55%, 35%, 56%, 45%, 52% et 36% pour les pontes du 14/03/03, 17/03/03, 20/03/03, 22/03/03, 28/03/03 et 30/03/03 respectivement en utilisant 3 marqueurs microsatellites OeduJ12, OeduU2 et OeduT5.

Pour chaque ponte, le ou les individus contribuant le plus à la descendance ont pu être identifiés par un simple calcul de fréquences. On remarque une succession au cours du temps des individus "majoritaires" (Figure 11A). Aucun phénomène de ponte en masse (la ponte d'un individu déclenchant celle des autres, comme chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par exemple; Le Dantec & Marteil, 1976) n'ayant été rapporté chez l'huître plate, on s'attend plutôt à ce que des individus différents interviennent dans les différentes pontes. C'est ce qui est observé pour quelques individus : D051 n'intervient que dans la ponte du 14/03/03 alors que D075 intervient principalement dans la ponte du 28/03/03 (Figure 11B). Or, dans la majorité des cas, les mêmes individus peuvent intervenir dans plusieurs pontes différentes : D006 interviendrait en effet dans deux pontes successives alors que D005 et D094 participeraient à la descendance de 4 ou 5 pontes différentes (Figure 11C). Afin de tester la réalité biologique de ce phénomène, notre analyse s'est ensuite appuyée sur la ségrégation des allèles rares, correspondant à des allèles présents chez un seul des géniteurs potentiels dans notre cas. Le nombre de larves portant chacun des allèles rares a ainsi été compté dans les différentes pontes, permettant d'affirmer la participation à la ponte de l'adulte le portant. Le phénomène précédemment mis en évidence se trouve alors confirmé : D083 intervient en effet

1- Adultes disposés individuellement dans des bécjers

2- Anesthésie au  $MgCl_2$  ou mise à sec pendant une nuit

3- Observation des bécjers et récupération des larves associées à la femelle incubante



Larves blanchâtres (précoces, diamètre 100  $\mu m$ )

**Figure 12 Récupération des larves présentes dans la cavité palléale d'adultes dont le cycle de maturation a été suivi en éclosérie.**

dans deux pontes espacées de 15 jours; D061 se retrouve dans deux pontes successives; D028 intervient dans 5 des 6 pontes analysées (Figure 11D).

### 3.3.4. Analyse des pontes issues des femelles incubantes maintenues en éclosion

Le deuxième pool d'adultes ( $n=60$ ) maintenu en éclosion était destiné à récupérer les larves avant leur émission, afin de pouvoir associer chaque ponte à une femelle incubante de génotype déterminé. En vue de saisir le moment de maturation optimum, correspondant au moment où le maximum de femelles sont prêtes à libérer les larves contenues dans leur cavité palléale, nous avons attendu la récupération sur tamis de deux pontes. Puis, une série de 50 adultes ont été placés début Avril individuellement dans un béccher contenant un mélange d'eau de mer, d'eau douce et de  $MgCl_2$  afin de les anesthésier. Le contenu de chaque béccher a été inspecté individuellement, aucune ponte n'a pu être récoltée. Quinze jours plus tard, la ponte issue de la femelle W56 a été récoltée de la façon décrite précédemment. Suite à ces deux anesthésies successives, aucune ponte en masse n'a pu être de nouveau récupérée sur un tamis. De ce fait, nous avons changé de stratégie de récupération des larves. Les adultes ont alors été placés individuellement dans un béccher et sont restés à sec toute une nuit; puis de l'eau de mer a été rajoutée. Après une journée, les bécchers ont à nouveau été inspectés : une deuxième femelle, W45, a libéré les larves présentes dans sa cavité palléale (Figure 12). Les pontes des deux femelles incubantes sont composées de larves jeunes  $100 \mu m$  de diamètre environ (les larves émises naturellement mesurant en moyenne  $160 \mu m$ ).

Dans un premier temps, l'effectif efficace a été calculé en s'appuyant sur la variance des fréquences alléliques entre les deux générations. Pour les pontes issues des femelles W45 et W56, il est respectivement de  $8.32 \pm 2.80$  et de  $7.10 \pm 2.32$ , c'est-à-dire du même ordre de grandeur que celui trouvé pour les femelles incubantes prélevées dans le milieu naturel en 2001.

Enfin, nous avons tenté d'assigner la paternité à l'aide du logiciel CERVUS en utilisant deux marqueurs OeduJ12 et OeduT5. Malheureusement, la paternité n'a pas pu être assignée malgré une probabilité d'exclusion de 97.3%.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Déficit en hétérozygotes

Nos données montrent l'existence, pour la population d'adultes D et les deux populations D et W regroupées, de déficits en hétérozygotes par rapport aux fréquences génotypiques attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg, déficits significatifs essentiellement dus au locus OeduH15.

Le déficit en hétérozygotes aux loci enzymatiques est un phénomène fréquemment observé dans les populations de bivalves marins (voir par exemple Zouros & Foltz, 1984). Cela peut paraître étonnant car les caractéristiques principales du cycle de vie des bivalves marins semblent en faire des candidats idéaux pour remplir les conditions nécessaires à la réalisation de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Les principales explications pour ce phénomène sont de trois types :

- 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 un mélange de populations de fréquences alléliques différentes (effet Walhund).
- non détection du polymorphisme introduisant une sous-estimation de l'hétérozygotie observée : aneuploïdie, existence d'allèles nuls ou artéfacts de lecture de gels.
- effets sélectifs : élimination d'une partie des hétérozygotes au cours de la phase larvaire ou embryonnaire.

Les populations de bivalves marins, à fécondation externe et à forts effectifs, sont a priori de bons candidats pour illustrer le modèle de panmixie. Cependant, David *et al.* (1997) ont analysé la microstructuration de populations naturelles de spicule *Spisula ovalis*, à la fois des structures microgéographiques et temporelles. Ces auteurs ont tenté d'établir dans quelle mesure le mélange de cohortes successives contribue au déficit en hétérozygotes observé (effet Walhund temporel) et dans quelle mesure le mélange d'individus de sites très proches l'un de l'autre contribue à ces déficits (effet Walhund microgéographique). Ils ont montré que ces structures temporelles et microgéographiques, bien que significatives, sont trop faibles pour générer les déficits en hétérozygotes observés via un effet Walhund temporel ou spatial. De plus, Taris (2002) s'est intéressé à la dynamique de reproduction de l'huître plate afin de mieux comprendre les facteurs qui peuvent participer à la mise en place d'une structuration génétique permettant d'observer les phénomènes de déficits en hétérozygotes et de relation

hétérozygotie-croissance. La comparaison de la variabilité observée dans quatre cohortes recrutées au cours de la même saison de reproduction à celle observée chez les adultes n'a pas permis de mettre en évidence la validité de l'hypothèse de consanguinité à l'échelle locale. L'hypothèse d'un effet Walhund temporel est également réfuté car les valeurs de  $F_{st}$  inter-cohortes sont trop faibles.

D'autres causes du déficit en hétérozygotes, indépendantes des processus populationnels (comme la structure à petite échelle spatio-temporelle ou la consanguinité) et compatibles avec l'effet locus-spécifique peuvent donc être avancées.

La fréquence des allèles nuls a pu être estimée à 10% selon Chakraborty *et al.* (1992) et à 7% selon Brookfield (1996). L'existence d'allèles nuls chez les microsatellites a déjà été rapportée dans de nombreuses études (Callen *et al.*, 1993) et précisément au locus OeduH15 chez l'huître plate *Ostrea edulis* (Launey, 1998 ; Taris, 2002). Ils peuvent être dus à l'existence de mutation dans les régions flanquantes qui empêcherait le bon appariement des amorces, ou par des phénomènes de compétition lors de l'amplification d'allèles de tailles très différentes.

La présence d'allèles nuls au locus OeduH15 est corroborée par la présence de larves homozygotes pour un allèle autre que celui porté par la mère lors de l'analyse de descendance réalisée sur des femelles incubantes prélevées dans le milieu naturel en 2001. Cinq des 14 femelles incubantes, homozygotes à ce locus, sont concernées par ce phénomène d'inadéquation entre le génotype de la mère et celui de certaines larves (Figure 7), résultant de la ségrégation d'un allèle nul : la mère, apparemment homozygote, serait en fait hétérozygote pour l'allèle nul. Ce résultat permet d'affirmer que les allèles nuls peuvent être hérités et ne représentent pas de simples artéfacts lors de la réaction de PCR. Cette transmission d'allèles nuls microsatellites a d'ailleurs été démontrée lors de l'étude de croisements de 5 familles d'huître creuse *Crassostrea gigas* provenant de stocks australiens et d'Amérique du Nord (McGoldrick *et al.*, 2000). De même, Foltz (1986) a mis en évidence la présence d'allèles nuls à deux loci allozymiques chez *C. virginica* et stipule que les allèles nuls représentent une cause possible du déficit en hétérozygotes observé.

#### 4.2. Complémentarité des études en milieu naturel et contrôlé

Sans l'accès à la population de géniteurs potentiels, peu de logiciels sont utilisables. L'approche bayésienne fournie par PARENTAGE s'avère être une aide précieuse. Une telle

approche connaît un intérêt croissant pour des applications en génétique à des problèmes complexes (Shoemaker *et al.*, 1999).

Cette approche nécessite cependant l'établissement de la distribution a priori de certains paramètres inconnus et qu'on veut justement estimer. C'est le cas par exemple du succès reproducteur (contribution relative des mâles à la descendance). Au cours de l'analyse de la paternité avec le logiciel PARENTAGE, deux modèles établissant la distribution a priori des descendants entre les mâles ont été utilisés, l'un stipulant une contribution équivalente des mâles, l'autre stipulant que cette distribution suit une loi gamma (1,4). Notre étude a permis de mettre en évidence une différence dans l'estimation du nombre de pères contribuant à la descendance suivant le modèle établi a priori. Notamment, la comparaison des résultats pour 7 des femelles incubantes (présentant un nombre d'allèles moyen par locus compris entre 4.3 et 7.5) a permis de démontrer que l'établissement a priori d'une contribution équivalente de tous les pères amène à une estimation du nombre de pères minimum. En revanche, ce deuxième modèle a été le seul utilisé pour l'analyse des 7 autres femelles (présentant un nombre moyen d'allèles compris entre 12 et 18.5) du fait de la puissance de calcul trop importante requise avec le premier modèle. De plus, comme aucune donnée n'est disponible sur la variance du succès reproducteur, il est plus facile de poser a priori une contribution équivalente de chaque père d'autant plus que le suivi d'une loi gamma (1,4) est tout aussi arbitraire.

Une critique courante de l'approche bayésienne est que le choix de la distribution antérieure du paramètre est trop subjective d'autant plus que dans certains cas la distribution postérieure est très sensible au choix du modèle a priori (Shoemaker *et al.*, 1999). Cet inconvénient peut conduire à des biais dans les résultats du fait de la méconnaissance de certains paramètres biologiques et de ce fait de la simplification de la réalité qui en résulte. Il apparaît donc primordial de travailler en premier lieu en milieu contrôlé. L'étude de la génétique des stades larvaires dans des expériences en éclosion devrait en effet permettre d'enlever une part de la complexité des populations naturelles comme la variabilité spatio-temporelle des événements de reproduction et de recrutement ou l'effet Walhund et ainsi permettre de mieux appréhender certains paramètres pour ensuite les réinjecter dans le modèle bayésien pour une application à des populations naturelles.

#### 4.3. Difficulté des analyses de parenté en milieu contrôlé

Trois méthodes ont classiquement été développées pour assigner la parenté lorsque tous les géniteurs potentiels ont été échantillonnés : la méthode d'exclusion, la méthode

d'allocation catégorique (basée sur le maximum de vraisemblance) et la méthode d'allocation fractionnée.

Le choix du logiciel adéquat adapté à notre étude a été compliqué par le fait qu'aucun parent n'est connu et que les huîtres sont hermaphrodites et sont capables de changer plusieurs fois de sexe au cours d'une saison de reproduction (Le Dantec & Marteil, 1976). En effet, la probabilité d'exclusion est plus faible lorsque aucun parent n'est connu, ce qui diminue du même coup l'assignation de la parenté. Plusieurs logiciels basés sur la méthode d'exclusion ont été testés comme FETII (développé par Boulangé et Goyard ; site [http://www.ifremer.fr/cop/Unite\\_Gene/Fetii/fetii\\_fr.htm](http://www.ifremer.fr/cop/Unite_Gene/Fetii/fetii_fr.htm)) ou PROBMAX (développé par Danzman ; site <http://www.uoguelph.ca/~rdanzman/software/PROBMAX/>) : du fait de la non connaissance du sexe des géniteurs potentiels, le nombre de combinaisons de parents possibles est très important, ce qui complique fortement l'analyse et aboutit à un nombre de couples non exclus trop important pour une quelconque interprétation des résultats. De plus, le logiciel CERVUS (Marshall *et al.*, 1998), basé sur le maximum de vraisemblance, permet de calculer le parent le plus vraisemblable associé à chaque descendant avec une confiance statistique de 80 ou 95%. Dans le cas où aucun parent n'est connu, il permet classiquement de déterminer parmi toutes les femelles la mère la plus vraisemblable puis dans un second temps le père le plus vraisemblable. Or dans notre cas, chaque géniteur potentiel doit être considéré dans l'analyse successivement comme femelle puis mâle ce qui accroît le nombre de géniteurs potentiels. La proportion de larves dont le couple parental a pu être déterminé avec une certaine confiance statistique (entre 35% et 56% selon la ponte considérée) est, du fait de ces limitations, relativement faible et en tout cas insuffisant pour déterminer de façon fine la contribution relative des géniteurs potentiels au sein de chaque ponte en masse.

De ce fait, afin d'augmenter la puissance de l'assignation de parenté, il faudrait accroître le nombre de marqueurs utilisés. Marshall *et al.* (1998) ont en effet appliqué leur logiciel à un jeu de 3 loci enzymatiques et 9 loci microsatellites (dont les nombres d'allèles sont plus restreints que dans notre étude, de 6 à 13). De plus, Coltman *et al.* (1998) ont mis en évidence que 6 loci microsatellites avec une probabilité d'exclusion d'environ 95% sont inadéquats pour définir les relations de pedigree à un niveau de confiance de 95% dans une population naturelle de phoques présentant un grand nombre de mâles candidats. Même si notre étude s'est déroulée en milieu contrôlé, on peut ainsi penser que le nombre de marqueurs utilisé était insuffisant. En effet, aucun parent n'était connu. De plus, un grand nombre de larves ont pu être assignées grâce à la ségrégation de certains allèles portés par un seul des géniteurs potentiels. Les pontes en masse où ces allèles ne sont pratiquement pas retrouvés

sont d'ailleurs associés à la plus faible réussite de l'assignation : sans la ségrégation de ces allèles rares, les taux de réussite de l'assignation auraient été dans tous les cas insuffisante. D'autre part, même lorsque la mère est connue, l'assignation de la paternité n'a pas pu aboutir. Un autre facteur pourrait donc expliquer la faible résolution de nos assignations : les deux femelles incubantes analysées présentant un allèle commun dans la population de géniteurs potentiels, le logiciel n'arrive pas à identifier les contributions paternelles du fait de la ségrégation d'allèles partagés par un nombre assez important d'individus. Ceci est corroboré là encore par la plus forte réussite de l'assignation de parenté lorsqu'un allèles rare ségrège dans la descendance.

Enfin, deux autres approches pourraient être testées. La première consisterait à appliquer une méthode d'allocation fractionnée (Devlin *et al.*, 1988). En effet, les assignations catégoriques ne peuvent pas être effectués pour tous les descendants et sont associés à un biais en faveur des homozygotes (tous les descendants avec l'allèle seront alloués aux homozygotes), ce biais diminuant avec l'ajout de marqueurs génétiques (Smouse & Meagher, 1994). Le programme CHAMLAMB (Smouse & Meagher, 1994) pourrait être testé sur les deux femelles incubantes. Par contre, aucun logiciel utilisant cette approche lorsque aucun parent n'est connu n'a pu être trouvé. Une deuxième approche consisterait à ne pas assigner un descendant à des parents mais de modeler la structure de probabilité de l'échantillon entier de descendants simultanément en déterminant les paramètres de fertilité les plus vraisemblables qui auraient pu générer un tel échantillon (Roeder *et al.*, 1989).

Malgré les difficultés rencontrées lors de l'analyse des données, certaines caractéristiques concernant la biologie de la reproduction de l'huître plate ont pu être dégagées.

#### 4.4. Apport de nos données pour une meilleure connaissance de la biologie de la reproduction de l'huître plate

Les résultats partiels obtenus avec le logiciel CERVUS sur les pontes en masse couplés à l'analyse des femelles incubantes prélevées dans le milieu naturel sont précieux pour mieux connaître la dynamique de la reproduction de l'huître plate.

Tout d'abord une grande variabilité a été mise en évidence, que ce soit en termes de nombre de pères ayant contribué à la descendance (analyse de descendance de femelles incubantes en milieu naturel) ou en termes d'effectif efficace (analyses de pontes en milieu contrôlé ou naturel). La comparaison de ces deux estimateurs pour les 14 femelles incubantes

prélevées en 2001 met en évidence une différence quantitative importante. Or on pouvait s'attendre à ce que la taille efficace, correspondant au nombre d'individus ayant contribué à la génération suivante, soit du même ordre de grandeur que le nombre de pères déterminés sous PARENTAGE. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence quantitative entre ces deux paramètres :

- ce calcul est effectué sur des pontes issues de femelles incubantes; on fixe donc la contribution des femelles, en empêchant les autres femelles de participer à la descendance; un facteur de différence d'au moins deux peut donc être attendu
- l'existence d'un sex-ratio déséquilibré
- une variance du succès reproducteur individuel : le calcul suppose une contribution équivalente de chaque parent

De manière générale, l'effectif efficace déterminé à l'aide du logiciel EPS pour les pontes en masse est relativement faible (moins d'une vingtaine d'individus), comme il a été démontré en milieu naturel dans une cohorte méditerranéenne recrutée en 1994 (Launey, 1998).

De plus, malgré le manque d'information sur le comportement reproducteur de l'huître plate, et de ce fait du caractère indicatif des résultats obtenus, l'approche bayésienne utilisée par le logiciel PARENTAGE a permis d'avoir accès à des informations intéressantes sur le succès reproducteur. Une variance importante du succès reproducteur a en effet pu être mise en évidence dans certains cas particuliers : selon la femelle incubante considérée, le mâle majoritaire est responsable de 82.5 à 97.5 % des larves. Une telle variance a précédemment été mise en évidence chez *C. gigas* par PCR-SSCP (Li & Hedgecock, 1998) et avec des microsatellites (Boudry *et al.*, 2002). Cette variance du succès reproducteur peut s'expliquer par un asynchronisme lors de la maturation. Chez l'huître plate en effet, la ponte d'un individu ne déclenche pas celle des autres individus (Le Dantec & Marteil, 1976). Ce fait est corroboré par la succession des individus majoritaires participant aux pontes en masse (Figure 11A).

Enfin, différentes dynamiques de reproduction ont pu être dégagées à partir des résultats partiels provenant de l'analyse des pontes en masse récupérées sur tamis en milieu contrôlé :

- l'individu D083 a participé à deux pontes espacées de 15 jours : on peut émettre l'hypothèse que cet individu a changé de sexe (Gérard, com.pers). Une inversion rapide du sexe a déjà été observée chez l'huître plate dans des expériences en écloserie : suite à la ponte d'un individu, une biopsie a été effectuée et du sperme a été récupéré.

- l'individu D061 a été retrouvé dans deux pontes successives : l'émission de sa ponte s'est étalé sur deux jours. Ce phénomène s'observe assez couramment, l'émission de pontes pouvant s'étaler sur 1 ou 2 jours.
- l'individu D028 a participé aux descendance de 5 des 6 pontes analysées : dans ce cas extrême, une hypothèse pourrait être que la libération des gamètes s'est étalée dans le temps.

#### 4.5. Variance du succès reproducteur et taille efficace : implications pour expliquer les phénomènes de déficits en hétérozygotes et d'hétérosis

La taille efficace de population ( $N_e$ ) est un paramètre important en biologie évolutive et de la conservation car elle influence la quantité de dérive génétique des populations. Elle détermine en effet le taux d'accroissement de la consanguinité ( $\Delta F$ ), et ainsi le taux de perte de la variabilité génétique dans une population ( $\Delta F=1/N_e$ ). L'effectif efficace représente de ce fait un paramètre primordial en terme de dérive génétique (une population avec un  $N_e$  grand sera moins sujette à la dérivé génétique) et doit donc être estimé pour une meilleure gestion des ressources génétiques.

- FAIBLE TAILLE EFFICACE ET VARIANCE DU SUCCES REPRODUCTEUR

Cette étude a permis de mettre en évidence une taille efficace limitée de la population d'huîtres plates *Ostrea edulis* étudiée en milieu contrôlé puisque selon la ponte en masse analysée, celle-ci est comprise entre 6.77 et 17.87 alors que la population de géniteurs potentiels comprenait 63 adultes qui ont été soumis aux mêmes conditions environnementales (trophiques, thermiques) puisque le cycle de maturation a été suivi en écloserie.

Quelques caractéristiques de l'histoire de vie des huîtres tend à limiter la taille efficace de la population comme un sex-ratio déséquilibré et le fait que la fécondation prend place à l'intérieur de la cavité palléale ce qui favorise la fécondation par les plus proches voisins (Saavedra *et al.*, 1987). De plus, l'analyse de la variabilité génétique d'une cohorte captée à Sète en 1994 (Launey, 1998) a permis de démontrer que le naissain capté sur une période de temps courte était issue d'un nombre réduit de géniteurs (probablement moins d'une vingtaine de géniteurs). Il semble donc que la maturation sexuelle ne soit pas synchrone chez cette espèce et que le succès reproducteur soit hautement variable dans le temps selon les individus comme mis en évidence par l'analyse des "pontes en masse".

- IMPLICATIONS SUR LE DEFICIT EN HETEROZYGOTES ET L'HETEROSIS

Il existe une relation entre la biologie de la reproduction (variance du succès reproducteur qui implique un faible  $N_e$ ) et le déséquilibre temporaire de la phase gamétique (ou hétérosis associée aux marqueurs).

La possibilité que les populations soient transitoirement fragmentées en petits groupes reproducteurs a été envisagée. Une grande variance dans le succès reproducteur conduisant à des tailles efficaces de population de quelques ordres en dessous des nombres habituels (Hedgecock, 1994) et les variations de recrutement dues à des fluctuations aléatoires locales dans les conditions favorables pour la nourriture des recrues peuvent créer des conditions pour une différenciation génétique locale entre cohortes (David *et al.*, 1997). Ces patrons de différenciation sont en général éphémères et ne reflètent pas une structure permanente et sont décrits comme "chaotic genetic patchiness" (Johnson & Black, 1984; David *et al.*, 1997). Un échantillonnage au stade larvaire dans le plancton dans une population naturelle de *C. gigas* (Li & Hedgecock, 1998) a fourni des évidences pour une légère structure génétique temporelle et pour une faible taille efficace impliquant un nombre limité de géniteurs à succès à l'origine d'un échantillon donné de larves.

L'analyse des ratios de ségrégation de marqueurs chez l'huître du Pacifique *C. gigas* confirme que ces distorsions par rapport aux proportions mendéliennes sont largement attribuables à la sélection contre des mutations délétères récessives à des gènes de fitness liés à ces marqueurs (Launey & Hedgecock, 2001). David *et al.* (1997) suggèrent que même des niveaux faibles de consanguinité (environ 1%) peuvent maintenir un déséquilibre suffisant entre les marqueurs et les gènes de fitness pour produire l'hétérosis associée aux marqueurs observée. De plus, le ratio taille efficace/taille actuelle de la population dans les populations marines peut être considérablement réduit par une forte variance dans le succès reproducteur (Hedgecock, 1994; Li & Hedgecock, 1998), qui pourrait alors générer un déséquilibre temporaire de la phase gamétique et l'hétérosis associée aux marqueurs. Bierne *et al.* (2000) a montré analytiquement et par simulations que des situations de non équilibre, comme les goulots d'étranglement maintenus, peuvent générer une forte superdominance associative. Celle-ci arrive principalement suite à une variance individuelle du coefficient de consanguinité. De petites tailles de populations aussi bien qu'une consanguinité récurrente dans de grandes populations pourrait accroître cette variance de consanguinité relativement à celle de grandes populations panmictiques.

Nos résultats, bien que partiels et incomplets, permettent de mieux comprendre comment une relation entre le système de reproduction de l'huître plate et l'hétérosis peut s'instaurer. En effet, l'analyse des pontes issues de femelles incubantes prélevées dans le milieu naturel et de celles recueillies sur un tamis en éclosérie a établi l'existence d'une variance du succès reproducteur individuelle. Cependant, ces résultats doivent être approfondis par l'utilisation d'autres outils d'analyse de parenté, notamment basés sur l'allocation fractionnée qui nous permettrait d'obtenir la distribution du succès reproducteur dans la population.

## 5. BIBLIOGRAPHIE

- Alvarez, G., Zapata, C., Amaro, R. & Guerra, A. (1989). Multilocus heterozygosity at protein loci and fitness in the European oyster, *Ostrea edulis* L. *Heredity*, **63** : 359-372.
- Bierne, N., Launey, S., Naciri-Graven, Y. & Bonhomme, F. (1998). Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, **148** : 1893-1906.
- Bierne, N., Tsitrone, A. & David, P. (2000). An inbreeding model of associative overdominance during a population bottleneck. *Genetics*, **155** : 1981-1990.
- Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., Hervouet, V. & Bonhomme, F. (2002). High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, **204** : 283-296.
- Brookfield, J.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, **5** : 453-455.
- Buroker, N.E. (1982). Allozyme variation in three non-sibling *Ostrea* species. *Journal of Shellfish research*, **2** : 157-163.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C. & Sutherland, G.R. (1993). Incidence and origine of "null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellites markers. *American Journal of Human Genetics*, **52** : 922-927.
- Chakraborty, R., De Andrade, M., Daiger, S.P. & Budowle, B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann. Hum. Genet.*, **56** : 45-57.
- Chakraborty, R., Meagher, T.R. & Smouse, P.E. (1988). Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics*, **118** : 527-536.
- Chakraborty, R., Shaw, M. & Schull, W.J. (1974). Exclusion of paternity : The current state of the art. *American Journal of Human Genetics*, **26** : 477-488.
- Coltman, D.W., Bowen, W.D. & Wright, J.M. (1998). Male mating success in an aquatically mating pinniped, the harbour seal (*Phoca vitulina*), assessed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, **7** : 627-638.
- Culloty, S.C. & Mulcahy, M.F. (1996). Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, **144** : 53-63.
- Dallas, J. (1992). Estimation of microsatellite mutation rate in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, **2** : 452-456.
- David, P., Delay, B., Berthou, P. & Jarne, P. (1995). Alternative models for allozyme-associated heterosis in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Genetics*, **139** : 1719-1726.
- David, P., Perdieu, M-A., Pernot, A-F. & Jarne, P. (1997). Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution*, **51**(4) : 1318-1322.
- Devlin, B., Roeder, K. & Ellstrand, N.C. (1988). Fractional paternity assignment : theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics*, **76** : 369-380.
- Diaz-Almela, E., Boudry, P., Launey, S., Bonhomme, F. & Lapegue, S. Comparison of mitochondrial DNA and nuclear genetic structure in the European flat oyster *Ostrea edulis*. Soumis à *Journal of Heredity*.
- Ellstrand, N.C. (1984). Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. *The American Naturalist*, **123** (6) : 819-828.

- Emery, A.M., Wilson, I.J., Craig, S., Boyle, P.R. & Noble, L.R. (2001). Assignment of paternity groups without access to parental genotypes : multiple mating and developmental plasticity in squid. *Molecular Ecology*, **10** : 1265-1278.
- Foltz, D.W. (1986). Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the Oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution*, **40(4)** : 869-870.
- Foltz, D.W. & Hoogland, J.L. (1981). Analysis of the mating system in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) by likelihood of paternity. *Journal of Mammalogy*, **62(4)** : 706-712.
- Hearne, C.M., Ghosh, S. & Todd, J.A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, **8** : 288-294.
- Hedgecock, D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In : *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (Beaumont, A.R. ed.), London : Chapman & Hall : 122-134.
- Hedgecock, D., Chow, V. & Waples, R.S. (1992). Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies. *Aquaculture*, **108** : 215-232.
- Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C. & Bonhomme, F. (2000). Variable microsatellites in the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics*, **3** : 71-72.
- Johannesson, K., Rodstrom, E.M. & Aase, H. (1989). Low genetic variation in Scandinavian populations of *Ostrea edulis* L. – possible causes and implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **128** : 177-190.
- Johnson, M.S. & Black, R. (1984). Pattern beneath the chaos : the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evolution*, **38(6)** : 1371-1383.
- Launey, S. (1998). Marqueurs microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. : caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles. Mémoire de Thèse de Doctorat, 108 p.
- Launey, S. & Hedgecock, D. (2001). High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, **159** : 255-265.
- Launey, S., Ledu, C., Boudry, P., Bonhomme, F. et Naciri-Graven, Y. (2002). Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *The Journal of Heredity*, **93** : 40-47.
- Ledantec, X. & Marteil, L. (1976). La reproduction des huîtres. Rev. Trav. ISPTM, XL 2 : 233-256.
- Li, G. & Hedgecock, D. (1998). Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among larval samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*, **55** : 1025-1033.
- Litt, M. & Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, **44** : 397-401.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B. & Pemberton, J.M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7** : 639-655.
- Mc Goldrick, D.J., Hedgecock, D., English, L.J., Baoprasertkul, P. & Ward, R.D. (2000). The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) : selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research*, **19** : 779-788.
- Meagher, T.R. (1986). Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. *The American Naturalist*, **128** : 199-215.

- Meagher, T.R. & Thompson, E. (1986). The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology*, **29** : 87-106.
- Meagher, T.R. & Thompson, E. (1987). Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). *Ecology*, **68**(4) : 803-812.
- Pollack, E. (1983). A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. *Genetics*, **104** : 531-548.
- Rassman, K., Schlötterer, C. & Tautz, D. (1991). Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, **12** : 113-118.
- Roeder, K., Devlin, B. & Lindsay, B.G. (1989). Application of maximum likelihood methods to population genetic data for the estimation of individual fertilities. *Biometrics*, **45** : 363-379.
- Saavedra, C., Zapata, C., Guerra, A. & Alvarez, G. (1987). Genetic structure of flat oyster (*Ostrea edulis* [Linneo, 1758]) from the NW from the Iberian Peninsula. *Investigation Pesq*, **51** : 225-241.
- Saavedra, C., Zapata, C., Guerra, A. & Alvarez, G. (1993). Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **115** : 85-95.
- Saavedra, C., Zapata, C. & Alvarez, G. (1995). Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **122** : 95-104.
- Shoemaker, J.S., Painter, I.S. & Weir, B.S. (1999). Bayesian statistics in genetics-a guide for the uninitiated. *Trends in Genetics*, **15** : 354-358.
- Smouse, P.E. & Chabraborty, P. (1986). The use of restriction fragment length polymorphism in paternity analysis. *American Journal of Human Genetics*, **38** : 918-939.
- Smouse, P.E. & Meagher, T.R. (1994). Genetic analysis of male reproductive contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae). *Genetics*, **136** : 313-322.
- Taris, N. (2002). Diversité génétique et dynamique du recrutement chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. Mémoire de DESS, Université Paris VI, 32 p.
- Waples, R.S. (1989). A generalized approach for estimating effective size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, **121** : 379-391.
- Weber, J.L. & May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, **44** : 388-396.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for analysis of population structure. *Evolution*, **38** : 1358-1370.
- Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, M., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G. & Lathrop, M. (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, **359** : 794-801.
- Wilkins, N.P. & Mathers, N.F. (1973). Enzyme polymorphisms in the European oyster, *Ostrea edulis* L. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **4** : 41-47.
- Winterø, A.K., Fredholm, M. & Thompsen, P.D. (1992). Variable (dG-dT)<sub>n</sub>-(dC-dA)<sub>n</sub> in the porcine genome. *Genomics*, **12** : 281-288.
- Wong, A.K., Yee, A.H., van de Sande, J.H. & Rattner, J.B. (1990). Distribution of CT-rich tract is conserved in vertebrates chromosomes. *Chromosoma*, **99** : 344-351.
- Zouros, E. & Foltz, D.W. (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve Molluscs. *Malacologia*, **25**(2) : 583-591.

**Mélange réactionnel pour chacun des loci microsatellites utilisés**

Produit	Volume (µl) pour un individu (OeduJ12)		Volume (µl) pour un individu (OeduU2)	
	Larves	Adultes	Larves	Adultes
MgCl2 (50 mM)	1.1	1	0.9	1
Tampon	1.1	1	0.9	1
Amorce 1 (1pM)	0.4	0.3	0.7	0.5
Amorce 2(1pM)	0.4	0.3	0.7	0.5
Taq	0.2	0.2	0.4	0.2
dNTP	0.7	0.5	0.6	0.5
Eau	0	1.7	0	1.3
Total mix	3.9	5	4.2	5
ADN	6.1	5	5.8	5

Produit	Volume (µl) pour un individu (OeduH15)		Volume (µl) pour un individu (OeduT5)	
	Larves	Adultes	Larves	Adultes
MgCl2 (50 mM)	0.9	1	0.9	1
Tampon	0.9	1	0.9	1
Amorce 1 (1pM)	0.8	0.5	1	1
Amorce 2(1pM)	0.8	0.5	1	1
Taq	0.3	0.2	0.3	0.2
dNTP	0.6	0.5	0.6	0.5
Eau	0	1.3	0	0.3
Total mix	4.3	5	4.7	5
ADN	5.7	5	5.3	5

**Fréquences alléliques par locus et par population**

<b>J12</b>		
	<i>Pop. D</i>	<i>Pop. W</i>
(N)	95	59
116	0.0421	0.0847
118	0.0053	0.0000
120	0.0053	0.0000
122	0.0053	0.0000
124	0.1895	0.1610
126	0.0158	0.0169
128	0.0368	0.0424
130	0.0158	0.0000
132	0.0789	0.0593
134	0.0579	0.0339
136	0.0316	0.0254
138	0.0211	0.0254
140	0.0421	0.0339
142	0.0895	0.1102
144	0.0368	0.0932
146	0.0421	0.0508
148	0.0526	0.0339
150	0.0789	0.0678
152	0.0421	0.0339
154	0.0368	0.0169
156	0.0263	0.0424
158	0.0211	0.0169
160	0.0105	0.0339
162	0.0053	0.0085
164	0.0000	0.0085
170	0.0053	0.0000
172	0.0053	0.0000

<b>H15</b>		
	<i>Pop.D</i>	<i>Pop.W.</i>
(N)	95	60
169	0.0053	0.0083
173	0.2684	0.2250
177	0.0158	0.0083
181	0.0105	0.0167
185	0.0158	0.0417
189	0.1263	0.0833
193	0.0684	0.0500
197	0.0053	0.0417
201	0.1316	0.1417
205	0.0316	0.0167
209	0.0105	0.0333
213	0.1105	0.1500

217	0.0579	0.0417
221	0.1211	0.1000
225	0.0211	0.0333
233	0.0000	0.0083

**U2**

	<i>Pop.D</i>	<i>Pop.W</i>
(N)	96	60
146	0.0052	0.0000
148	0.0052	0.0000
150	0.0052	0.0000
152	0.0052	0.0167
154	0.0104	0.0333
156	0.1250	0.1417
158	0.0677	0.0667
160	0.0469	0.0333
162	0.0625	0.0667
164	0.0365	0.0167
166	0.0365	0.0000
168	0.0417	0.0583
170	0.0313	0.0500
172	0.0313	0.0250
174	0.0677	0.0833
176	0.0677	0.0583
178	0.0677	0.0417
180	0.0365	0.0750
182	0.0781	0.0250
184	0.0260	0.0583
186	0.0104	0.0250
188	0.0313	0.0167
190	0.0260	0.0167
192	0.0104	0.0250
194	0.0000	0.0167
196	0.0260	0.0083
198	0.0104	0.0083
200	0.0104	0.0000
204	0.0104	0.0000
206	0.0000	0.0167
209	0.0000	0.0083
210	0.0052	0.0000
214	0.0000	0.0083
220	0.0052	0.0000

**T5**

	<i>Pop.D</i>	<i>Pop.W</i>
(N)	95	59
106	0.1474	0.1695
112	0.0158	0.0085
118	0.1053	0.0508
120	0.0000	0.0085

---

122	0.0105	0.0000
124	0.1632	0.1441
126	0.0158	0.0169
128	0.0368	0.0254
130	0.0211	0.0169
132	0.0211	0.0339
134	0.0737	0.1017
136	0.0158	0.0339
138	0.1211	0.1017
140	0.0632	0.0424
142	0.0316	0.0593
144	0.0211	0.0424
146	0.0105	0.0339
148	0.0368	0.0169
150	0.0316	0.0085
152	0.0105	0.0254
154	0.0053	0.0254
156	0.0158	0.0169
158	0.0000	0.0085
160	0.0158	0.0085
164	0.0053	0.0000
170	0.0053	0.0000

### Date de récupération des pontes en masse

En gras sont figurées les dates de pontes qui ont été analysées au cours de cette étude.

<b>14/03/03</b>
<b>17/03/03</b>
<b>20/03/03</b>
<b>22/03/03</b>
23/03/03
<b>28/03/03</b>
29/03/03
<b>30/03/03</b>
31/03/03
01/04/03
10/04/03
11/04/03
24/04/03
25/04/03
02/05/03