

Université de La Rochelle
3^{ème} cycle - HDR

Dossier d'habilitation à diriger des recherches

Présenté par

Sylvie Lapègue

Cadre de Recherche à l'Ifremer

**Apport de la génétique pour une meilleure
connaissance des populations naturelles
et une amélioration des populations cultivées
d'huîtres plates et creuses**

Soutenu le 27 septembre 2007, devant la commission
d'examen composée de :

François Bonhomme	Directeur de Recherche	Université de Montpellier II
Pascale Garcia	Professeur	Université de La Rochelle
Philippe Gouletquer	Directeur de Recherche	Ifremer, La Tremblade
André Gérard	Directeur de Recherche	Ifremer, Nantes
Dario Moraga	Maître de conférences	Université de Bretagne Occidentale
Pierre Miramand	Professeur	Université de La Rochelle
Edwige Quillet	Directeur de Recherche	INRA, Paris

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
PREAMBULE	5
RESUME DES TRAVAUX DE RECHERCHE	6
INTRODUCTION.....	7
CHAPITRE 1 - STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS D’HUITRES PLATES EUROPEENNES.....	11
1) L’huître plate d’Europe introduite dans le monde entier	11
2) A ne pas confondre avec <i>Ostreola stentina</i>	13
3) Structure génétique des populations européennes.....	18
4) L’hypothèse de « loterie » dans la variance du succès reproducteur	21
CHAPITRE 2 - L’ANEUPLOÏDIE, PREUVE D’UNE GRANDE PLASTICITE DU GENOME DE L’HUITRE CREUSE.....	30
1) L’aneuploïdie	30
2) L’aneuploïdie dans les populations des bassins de Marennes-Oléron et d’Arcachon.....	31
3) Les polluants, facteurs importants de l’environnement ostréicole	35
4) Impact de l’atrazine sur l’aneuploïdie.....	38
5) Impact du cadmium sur l’aneuploïdie.....	44
6) Impact du diuron sur l’aneuploïdie	46
CHAPITRE 3 – DEVELOPPEMENT DE CARTES GENETIQUES.....	49
1) Les cartes génétiques chez les coquillages	49
2) La production du matériel ségrégeant.....	51
3) La cartographie génétique de la moule bleue <i>M. edulis</i>	55
4) La cartographie génétique de l’huître plate <i>O. edulis</i>	59
5) Vers une augmentation de la densité de la carte génétique de <i>C. gigas</i>	64
CHAPITRE 4 – A LA RECHERCHE DE QTLs	68
1) Les bénéfices de la génétique quantitative et l’intérêt des QTLs.....	68
2) La production du matériel ségrégeant.....	71
3) Identification de QTLs de résistance à <i>Bonamia ostreae</i> chez l’huître plate	73
4) A la recherche de QTLs de résistance à un épisode de mortalité estivale chez l’huître creuse.....	78
PERSPECTIVES	82
CURRICULUM VITAE DETAILLE	89
FORMATION ET DIPLOMES.....	90
ACTIVITES DE RECHERCHE	90
Montage, réalisation et valorisation de projets scientifiques.....	90
Encadrement ou co-encadrement scientifique de thèses et DEA	91
Gestion de la recherche	92
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	93
Publications (Facteur d’impact de 2006)	93
Articles ou Chapitres d’ouvrage	96
Autres types de publications	96
Communications dans congrès, symposiums.....	97
Rapports de contrats ou conventions.....	103

Groupes de travail, Expertises, revues d'articles	104
Cours, formation	106
Divers	106
MODESTE CONTRIBUTION	108

Remerciements

Aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ce travail ; plusieurs ont suivi d'une manière ou d'une autre ces travaux et m'ont encouragé à diverses reprises.

A Karine Bouilly et Delphine Lallias, thésardes d'hier, presque au vrai sens du terme pour Delphine ; à Christopher Sauvage, thésard toujours plein de courage malgré l'adversité ; à Coralie Tacquet et Inès Ben Salah, encadrées de plus loin, je mesure tout ce que je vous dois car ce travail est largement le vôtre !

A tous les autres étudiants avec qui j'ai travaillé et dont la diversité fait la richesse...

A André Gérard, Philippe Gouletquer et Tristan Renault, responsables successifs du laboratoire qui m'ont soutenue dans mes travaux de recherche mais aussi à tous les membres du laboratoire, équipes génétique, pathologie, éclosion, et personnel administratif, qui le rendent si accueillant grâce à leurs compétences, leur motivation et leur bonne humeur quotidienne.

A Pierre Boudry avec qui j'ai collaboré étroitement durant ces dix années bientôt et qui a permis mon intégration dans ce monde « animal », pourtant déjà habitué à accueillir tous ces « généticiens des végétaux ». Il m'a tout de suite fait confiance en m'associant à ses travaux, ses projets. Merci encore pour les discussions fructueuses permettant des orientations décisives. Notre complicité au quotidien me manquera... bon vent breton !

A Serge Heurtebise qui m'a tant appris sur les huîtres, leur reproduction, mais aussi leurs caprices (si, je vous assure !) qui les rendent si passionnantes à étudier et à tenter de domestiquer.

A toute ma famille, Jean-Marc, Pierre, et Marie, pour leur soutien, leur patience et leur compréhension en particulier lors de mes « missions », et des périodes difficiles de dépôt de projets.

Préambule

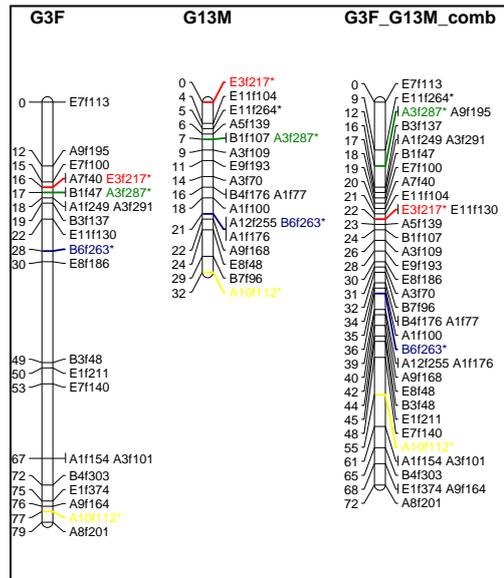
L'huître

L'huître, de la grosseur d'un galet moyen, est d'une apparence plus rugueuse, d'une couleur moins unie, brillamment blanchâtre. C'est un monde opiniâtrement clos. Pourtant on peut l'ouvrir : il faut alors la tenir au creux d'un torchon, se servir d'un couteau ébréché et peu franc, s'y reprendre à plusieurs fois. Les doigts curieux s'y coupent, s'y cassent les ongles : c'est un travail grossier. Les coups qu'on lui porte marquent son enveloppe de ronds blancs, d'une sorte de halos.

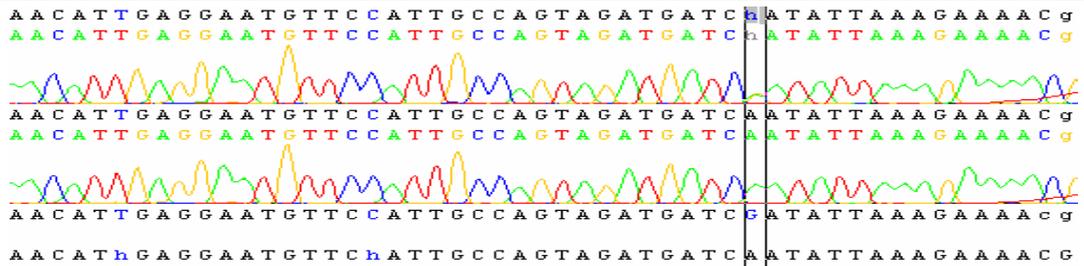
A l'intérieur l'on trouve tout un monde, à boire et à manger : sous un firmament (à proprement parler) de nacre, les cieux d'en dessus s'affaissent sur les cieux d'en dessous, pour ne plus former qu'une mare, un sachet visqueux et verdâtre, qui flue et reflue à l'odeur et à la vue, frangé d'une dentelle noirâtre sur les bords.

Parfois très rare une formule perle à leur gosier de nacre, d'où l'on trouve aussitôt à s'orner.

F. Ponge, le Partie pris des choses, 1942



Résumé des travaux de recherche



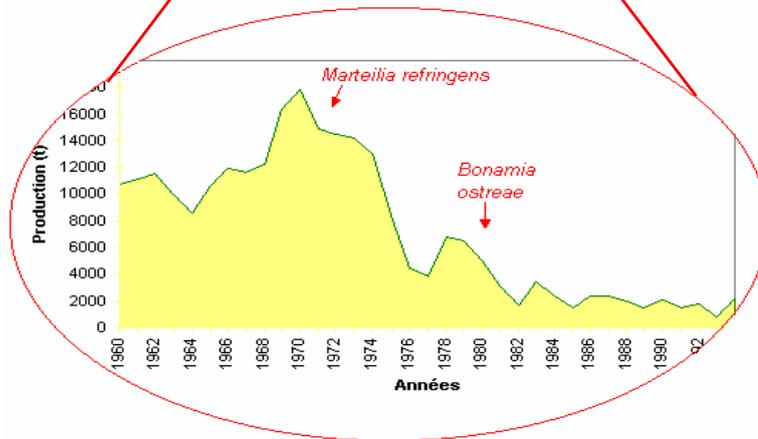
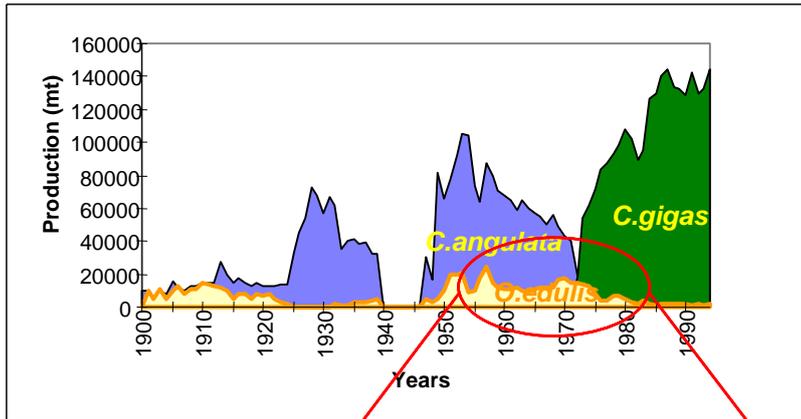


Figure 1. Production ostréicole française au cours du XX^{ième} siècle.

INTRODUCTION

J'ai été recrutée à l'Ifremer en février 1998 pour travailler dans le laboratoire de génétique et pathologie de La Tremblade dont je fais toujours partie à ce jour. Mon orientation de recherche a évolué au cours de ces années en prenant en compte l'évolution des programmes de travail de l'Ifremer mais aussi les mouvements de personnels dans notre laboratoire, déterminant aussi parfois la « poursuite » de certains travaux de façon temporaire. Bien que initialement recrutée pour travailler sur le programme de sélection pour la résistance à la bonamiose de l'huître plate, mon activité de recherche a été majoritairement tournée vers (1) la génétique des populations d'huîtres plates au niveau européen et des populations et espèces d'huîtres creuses au niveau mondial, (2) la caractérisation d'une particularité cytogénétique des huîtres qui correspond à un fort taux d'aneuploïdie dans les cellules somatiques, puis (3) plus récemment sur l'utilisation de marqueurs moléculaires pour la construction ou l'amélioration de cartes génétiques, permettant de (4) détecter de zones du génome respectivement liées à la résistance aux mortalités estivales chez l'huître creuse et la résistance au parasite responsable de la bonamiose pour l'huître plate. Ces quatre grands thèmes vont correspondre aux quatre chapitres développés dans ce document.

Bien que les huîtres et les chênes aient de nombreux points communs en termes de génétique des populations (individus sessiles mais avec une forte capacité de dispersion des premières phases du cycle), ce sont des espèces assez éloignées par ailleurs et mon travail de thèse concernant la « variabilité chloroplastique et mitochondriale chez les chênes blancs européens à deux échelles spatiales », réalisé au Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers de l'INRA Bordeaux- Cestas, ne sera pas exposé ici. En particulier, je ne ferai référence qu'aux publications issues de mon travail à l'Ifremer numérotées de 1 à 25 dans la partie « Curriculum vitae détaillé » présentée à la fin de ce document.

La conchyliculture et en particulier l'ostréiculture ont connu historiquement, en France comme de nombreux pays, une succession de phases de développement, d'exploitation puis de crises remarquables, le plus souvent liées à la surexploitation des stocks ou à l'apparition de maladies, mais aussi à la surcharge du milieu naturel ou à l'impact de polluants, démontrant une certaine fragilité de la filière. Ainsi, la production ostréicole française se caractérise au cours du vingtième siècle par l'exploitation simultanée ou successive de trois espèces (Figure 1). Si *Ostrea edulis* est l'espèce d'huîtres que l'on rencontre naturellement sur

les côtes européennes et françaises, elle a partagé son aire de répartition naturelle avec successivement l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, et l'huître du Pacifique, *Crassostrea gigas*, toutes les deux introduites d'Asie, et qui s'avèrent être des espèces très proches, voire des sous-espèces et que nous nommerons des taxons. Je ne détaillerai pas ici les études auxquelles j'ai participé afin de mieux comprendre les relations génétiques entre ces deux taxons, leurs distributions en Europe ainsi que dans leur zone d'origine en Asie. Elles ont été réalisées en étroite collaboration avec mon collègue Pierre Boudry et ont fait l'objet des publications n° **1, 3, 6, 7 et 10**. Je m'intéresserai dans ce **premier chapitre** aux huîtres plates, principalement *Ostrea edulis* mais également *Ostreola stentina*, une autre huître plate, plus petite, présente dans une partie de la zone de répartition de l'huître plate européenne. Je développerai ainsi l'intérêt des marqueurs moléculaires afin de caractériser la diversité et la structure génétique des populations, mais aussi identifier des stocks ou bien des espèces. Je détaillerai ensuite les différentes études qui nous ont permis de tester l'hypothèse d'une variation du succès reproducteur chez l'huître plate, paramètre particulièrement important dans la dynamique des populations et donc la mise en place de la structure génétique. Ces travaux ont fait l'objet de publications (Publications n° **9, 15, 16, 19, 24, 25**) ou sans en cours de rédaction.

Une des thématiques principales de recherche du laboratoire de génétique et pathologie est celle portant sur la mise au point et l'utilisation de polyploïdes dans la filière ostréicole, ceci avec la production de triploïdes (Gérard et al. 1999), puis de tétraploïdes chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Même si j'ai occasionnellement participé à certains travaux concernant la mise au point de méthodes alternatives d'obtention de polyploïdes (publication n° **13**) et la stabilité de leur génome (publication n° **12**), mon intérêt s'est porté sur un phénomène très particulier mais couramment observé, celui de l'aneuploïdie. Tout d'abord, des travaux antérieurs (programme européen GENEPHYS (1995-2000)) avaient permis de mettre en évidence que le paramètre permettant d'expliquer le plus de variation sur la croissance était celui de l'aneuploïdie. De plus une corrélation négative entre l'aneuploïdie somatique et le taux de croissance a été décrite dans la descendance d'huîtres cultivées *C. gigas* (Thiriot-Quiévreux et al. 1988; Thiriot-Quiévreux et al. 1992; Leitao et al. 2001c) et dans les populations naturelles de la même espèce (Zouros et al. 1996). De plus, l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de l'aneuploïdie a été émise (Leitao et al. 2001a) et il existerait aussi une perte préférentielle de certains chromosomes (dans les paires 1, 5, 9 et 10) dans les cellules aneuploïdes (Leitao et al. 2001b).

A la suite de ces travaux montrant l'intérêt d'étudier un tel phénomène, j'ai voulu étudier l'impact de facteurs environnementaux sur ce phénomène. En effet, les huîtres étant élevées dans un milieu ouvert, l'estran, elles sont soumises à de nombreuses contraintes environnementales. Tout d'abord, nous avons travaillé sur la comparaison intersites et interannuelle de l'aneuploïdie sur des huîtres des bassins de Marennes-Oléron et Arcachon, ainsi que sur un suivi annuel sur un site atelier du Bassin de Marennes-Oléron et enfin en comparant deux méthodes d'élevage. Ce travail a été réalisé en grande partie par H. McCombie, M. Bonnard et K. Bouilly. Cependant, étant donné la difficulté de séparer les différents effets de nombreux facteurs environnementaux dans le milieu, mon choix s'est porté sur l'étude en laboratoire de l'impact de facteurs susceptibles de créer des désordres chromosomiques (atrazine, diuron, cadmium) et répandus dans le bassin de Marennes-Oléron. Ce travail a été réalisé dans le cadre de la thèse de Karine Bouilly soutenue en 2004 et a donné lieu à plusieurs publications (publications n° **5**, **8**, **11**, **14** et **17**). Les résultats de ces travaux seront développés dans le **chapitre 2**.

L'aquaculture est une activité très importante dans la Communauté européenne, particulièrement dans les zones rurales et côtières. En 2004, le poisson, les mollusques et les crustacés d'aquaculture ont représenté plus de 2,5 milliards d'euros de chiffres d'affaires. Toutefois, les pertes financières dues aux maladies (mortalité, croissance réduite et moindre qualité) sont estimées à 20 % de la valeur de la production. Depuis de nombreuses années, notre équipe travaille sur des projets de sélection expérimentale de résistance à des maladies (bonamiose chez l'huître plate) ou des syndromes (mortalité estivale chez l'huître creuse). Dans les cas des huîtres, plus particulièrement étudiées dans notre laboratoire, compte tenu (1) des contraintes liées à la mise en place de schémas de sélection tels que ceux exposés précédemment, (2) de la difficulté de maîtriser la pression de sélection (parasite purifiable mais dont la reproduction n'est pas maîtrisée au laboratoire pour l'huître plate et syndrome complexe chez l'huître creuse), et enfin (3) pour l'huître plate de la longueur d'un cycle de sélection (3 années car la mortalité apparaît principalement lors du second ou troisième été de vie des huîtres), le développement de marqueurs génétiques, permettant une sélection assistée par ces mêmes marqueurs, est apparu à ce stade comme une voie de recherche intéressante. Mon action s'est ainsi située en parallèle puis à la suite des travaux exposés ci-dessus avec :

- 1) la reproduction des générations de sélection et consanguines d'huîtres plates que je ne détaillerai pas ici,
- 2) la réalisation ou la densification de cartes génétiques permettant,
- 3) la

recherche de QTLs. Ceci se réalise principalement dans le cadre de deux projets européens « Groupe Aquacole de l'Arc Atlantique (AAAG) » et « AQUAFIRST ».

Ces travaux sont ou ont été réalisés pour l'huître plate (et la moule) en étroite collaboration avec Serge Heurtebise, technicien au laboratoire et dans le cadre de la thèse de Delphine Lallias que j'ai co-encadrée scientifiquement. Des publications concernant ces travaux sont actuellement sous presse (Publications n° **20** et **22**) ou bien en cours de rédaction. En ce qui concerne les travaux sur l'huître creuse, les résultats sont en cours d'acquisition par Christopher Sauvage que je co-encadre également scientifiquement (Publication n°**21**). L'ensemble de ces résultats sont présentés dans les **chapitres 3 et 4**.



Embranchement	Mollusques
Classe	Bivalves
Ordre	Filibranches
Famille	Ostreidae
Genre	<i>Ostrea</i>
Espèce	<i>edulis</i>
Origine	Côte atlantique Européenne
Coquille	Valve gauche bombée Bord des valves plissé et feuilleté
Charnière	Présence de nombreuses petites dents latérales
Fécondation	Interne
Reproduction	Espèce hermaphrodite consécutive

Tableau 1.1. Systématique et particularités morphologiques d'*Ostrea edulis*.



Figure 1.1. Distribution géographique de *O. edulis* (en rouge) selon Jaziri (1990).

CHAPITRE 1 - STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS D'HUITRES PLATES EUROPEENNES

1) L'huître plate d'Europe introduite dans le monde entier

Le genre *Ostrea*, auquel appartient l'huître plate *Ostrea edulis*, possède une répartition très large dans les eaux chaudes et tempérées de tous les océans (Jaziri, 1990) avec une distribution cependant préférentiellement pantropicale. Parmi les espèces principales, plusieurs sont exploitées commercialement et nous pouvons citer notamment :

- l'huître plate australienne, *Ostrea angasi*, que l'on trouve en Australie (où elle est exploitée commercialement), Nouvelle-Zélande, mais également en Mer rouge, à l'île Maurice, à Singapour, aux Philippines,
- l'huître plate du Chili, *Ostrea chilensis*, que l'on trouve au Chili mais aussi en Nouvelle-Zélande et qui est également exploitée,
- l'huître plate américaine, *Ostrea conchaphila* (ou *lurida*), que l'on trouve sur la côte pacifique américaine depuis l'Alaska jusqu'au Mexique et qui a été exploitée au cours du XX^{ième} siècle,
- l'huître plate d'Argentine, *Ostrea puelchana*, répartie sur la côte atlantique sud-américaine, depuis le Brésil jusqu'en Argentine où elle fait également l'objet d'une exploitation commerciale,
- l'huître plate asiatique, *Ostrea denselammellosa*, trouvée en Chine, Corée, Japon, mais dont l'exploitation commerciale est en déclin, l'espèce étant peut-être en voie d'extinction,
- l'huître plate de Provence ou naine, *Ostrea stentina*, trouvée au Sud de la Méditerranée et sur l'ensemble des côtes africaines, mais trop petite pour être exploitée commercialement.

De caractère plus océanique, *Ostrea edulis* vit dans des eaux salées et peu turbides. Elle est l'huître plate indigène des côtes européennes (Tableau 1.1 et Figure 1.1) où elle est cultivée depuis l'Antiquité à partir de jeunes individus prélevés dans les populations naturelles. Son aire de répartition naturelle dépasse l'Europe puisqu'elle s'étend depuis la Norvège jusqu'à la baie d'Agadir au Maroc, en passant par le pourtour Méditerranéen, en France, Italie, Grèce, mais aussi au Maroc, en Tunisie et jusqu'en Adriatique et en Mer Noire (Ranson 1967; Jaziri 1990). Suite à deux épizooties majeures survenues à la fin des années 1960 puis des années

1970, l'exploitation de cette espèce a été très largement diminuée et la répartition de ses populations naturelles affectée dans une mesure qui est difficilement mesurable puisqu'aucun inventaire exhaustif n'a été réalisé, la répartition de Jaziri (1990) (Figure 1.1) devant être considérée comme approximative et certainement beaucoup plus fragmentée qu'indiquée. En effet, pour les côtes françaises par exemple, la répartition est beaucoup moins régulière qu'indiquée avec quelques populations présentes en Bretagne, Normandie et Languedoc-Roussillon.

Mais cette espèce a également été introduite pour des raisons commerciales dans plusieurs régions du monde, notamment aux Etats-Unis (Elston et al. 1986), au Canada (Newkirk et Haley 1982) et au Japon. Les transferts d'huîtres plates sont soumis depuis 1991 à des règles européennes mais aussi internationales de transfert pour éviter en particulier la prolifération du parasite *Bonamia ostreae* dans des zones où il n'est pas présent (CEE 1991). Par exemple, *Ostrea edulis* avait été introduite en Nouvelle-Ecosse (Canada) il y a trente ans, où les conditions sont réunies pour une bonne croissance de cette espèce. Les animaux provenaient principalement de populations naturalisées dans le Maine à partir d'ancêtres provenant des Pays-Bas (Newkirk et al. 1995). Comme le parasite est connu comme étant présent dans le Maine mais pas en Nouvelle-Ecosse, toute importation d'huîtres plates est interdite dans cette dernière zone. En collaboration avec des collègues canadiens, nous avons cherché à caractériser les différents stocks d'huîtres plates présents dans des populations naturalisées ou bien dans des écloséries commerciales en Nouvelle-Ecosse en les comparant avec des populations du nouveau Brunswick, de Colombie Britannique, du Maine et d'Europe. Ceci a été permis grâce aux marqueurs microsatellites développés précédemment dans notre équipe pour l'étude de la structure des populations Européennes (Launey et al. 2002). L'étude de diversité a permis de mettre en évidence une perte de variabilité génétique dans les populations introduites dans les régions maritimes (Nouvelle-Ecosse et Nouveau Brunswick) en particulier dans les stocks d'écloserie.

De plus, deux marqueurs microsatellites, qui ont pu être calibrés entre les deux laboratoires, ont permis de confirmer l'origine néerlandaise des populations du Maine (regroupement entre ANb (Pays-Bas) et les populations du Maine entourées en rouge) et de supposer une seconde introduction à partir de populations norvégiennes dans des populations de Nouvelle-Ecosse (regroupement entre Ana (Norvège) et les populations de Nouvelle-Ecosse entourées en bleu) (Figure 1.2) (Publication n° 15).

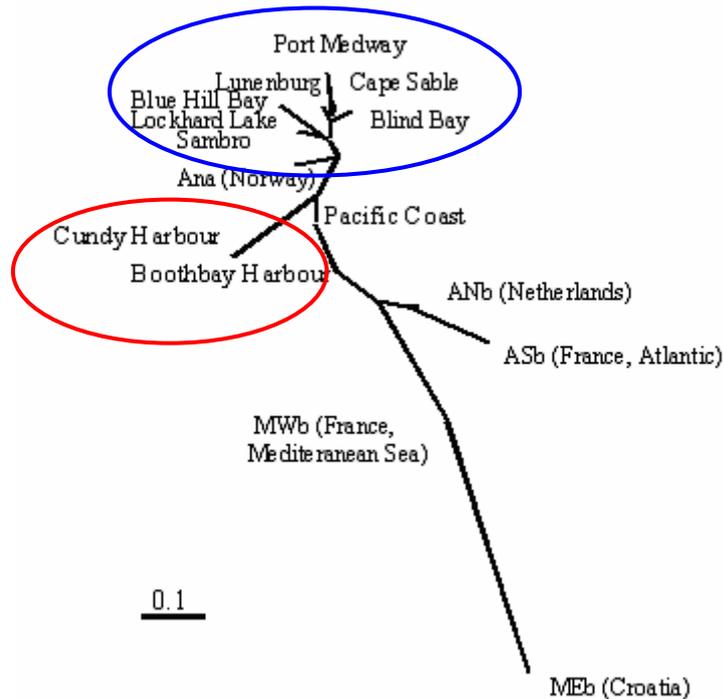


Figure 1.2. Arbre Neigbor-Joining obtenu à partir des fréquences alléliques à deux microsattellites.

Ce genre d'étude montre l'intérêt aquacole (niveau de diversité de stocks de reproducteurs) mais aussi règlementaire (possible traçage de l'origine d'introductions) de la caractérisation génétique des populations d'huîtres plates que l'on peut étendre à la caractérisation des espèces.

2) A ne pas confondre avec *Ostreola stentina*

En effet, les huîtres sont des animaux particulièrement plastiques au niveau de leur coquille, ce qui les rend difficiles à identifier, d'autant plus que de nombreux transferts intentionnels d'animaux ou d'introductions involontaires ont amplifié cette situation de recouvrement d'aires de répartition d'espèces ou de variants phénotypiques. Malgré la classification des huîtres réalisée par Harry (1985), de nombreux cas sont restés controversés. Dans les cas de mauvaise classification taxonomique ou de mauvaise identification des espèces d'huîtres, les données fournies par l'étude de l'ADN ont montré leur efficacité. Par exemple, en ce qui concerne les huîtres plates, O'Foighil et al. (1999) ont montré la distribution transocéanique (Nouvelle-Zélande et Chili) de l'huître du Chili *Ostrea chilensis*, et Morton et al. (2003) ont montré la présence de l'huître plate européenne *O. edulis* dans le sud-ouest de l'Australie

alors que l'huître plate australienne, *O. angasi*, était supposée être la seule espèce présente dans cette région.

En Europe, le long des côtes Méditerranéennes et Atlantiques, *O. edulis* est l'espèce principale d'huîtres plates mais une autre espèce d'huîtres plates est également présente. Il s'agit de l'huître de Provence, ou huître naine, *Ostreola stentina*. Etant donné sa faible taille maximale, 4 à 5 cm, cette espèce n'a pas été considérée comme d'intérêt ostréicole. Au contraire, *O. edulis*, malgré sa faible production mondiale (moins d'un pourcent au total), est produite à 99% en Europe, ce qui représente environ 28 millions d'euros de chiffres d'affaires. Aussi, pouvoir discriminer les deux espèces est particulièrement important dans le cadre du développement de productions à partir de naissain d'huîtres plates dans les zones où les deux espèces coexistent.

Nous avons donc échantillonné 214 huîtres, caractérisées morphologiquement comme étant de l'espèce *Ostreola stentina*, à partir des critères de Harry (1985). Elles provenaient de 5 populations : 2 en Tunisie dans le golf de Gabès (GH et KN), 2 au Portugal dans les estuaires de Sado (SA) et de Mira (MI), et une au Maroc dans la baie de Dakhla (MO) (Figure 1.3).

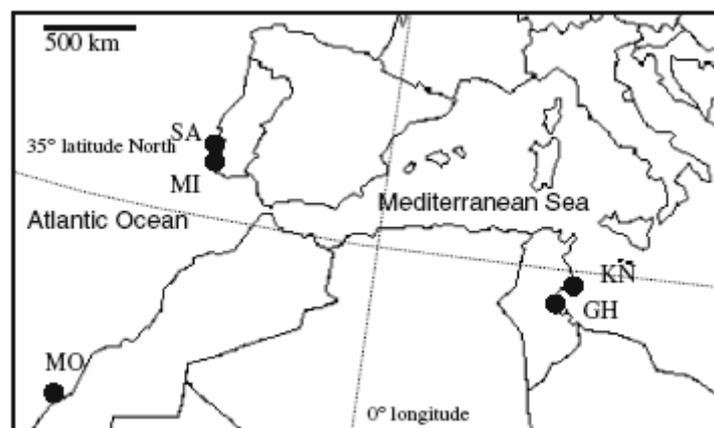


Figure 1.3. Localisation des populations d'huîtres plates *O. stentina* échantillonnées.

Nous avons étudié deux fragments d'ADN mitochondrial COI et 16S. Trois nouvelles séquences du fragment 16S, présentes sans exception dans les 5 populations ont été identifiées et comparées aux autres séquences du fragment 16S connues chez d'autres espèces des genres *Ostrea* et *Ostreola*. L'arbre construit à partir des distances génétiques entre séquences (Figure 1.4) a permis de confirmer que les trois nouveaux haplotypes détectés dans notre études sont

très proches entre eux (moins de 2% de divergence) mais aussi des haplotypes de *Ostrea aupouria* et *Ostreola equestris* (de 1.3% à 1.6%). D'autre part, la divergence entre les trois séquences d'*O. stentina* et les autres séquences du genre *Ostrea* vont de 3% à 9% avec une divergence claire avec *O. edulis* (7% à 8.2%). Ces résultats ont été confirmés avec l'analyse des séquences de COI.

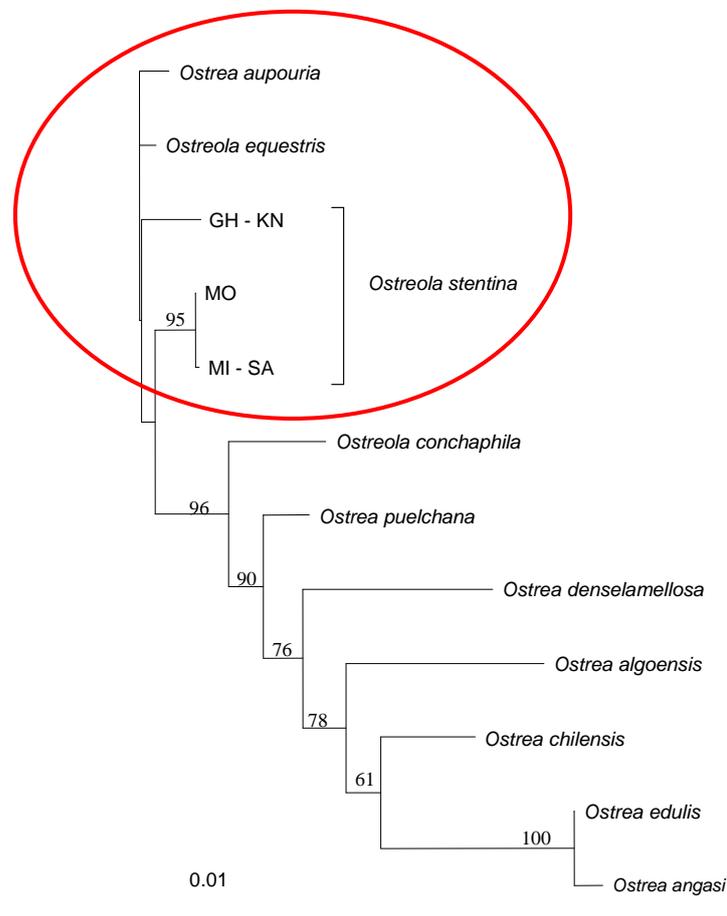


Figure 1.4. Arbre Neighbor-joining construit à partir des distances génétiques entre séquences du fragment 16S.

Cette faible divergence est assez inattendue en particulier entre *Ostrea aupouria* et *Ostreola stentina* étant donné que ces espèces n'appartiennent pas au même genre. De plus, *O. aupouria* est présente en Nouvelle-Zélande et *Ostreola equestris* sur les côtes de Floride. Kirkendale et al. (2004) ont déjà mis en évidence une très forte relation phylogénétique entre *O. chilensis* et *O. equestris* et notre étude rajoute une troisième espèce, *O. stentina*, dans cet exemple d'espèces proches aux distributions géographiques disjointes. Ce même genre de disjonction entre espèces proches a également été mis en évidence par (Jozefowicz et O'Foighil 1998) pour les couples *Cryptostrea permollis*/*O. puelchana* et *O. edulis*/*O. angasi*.

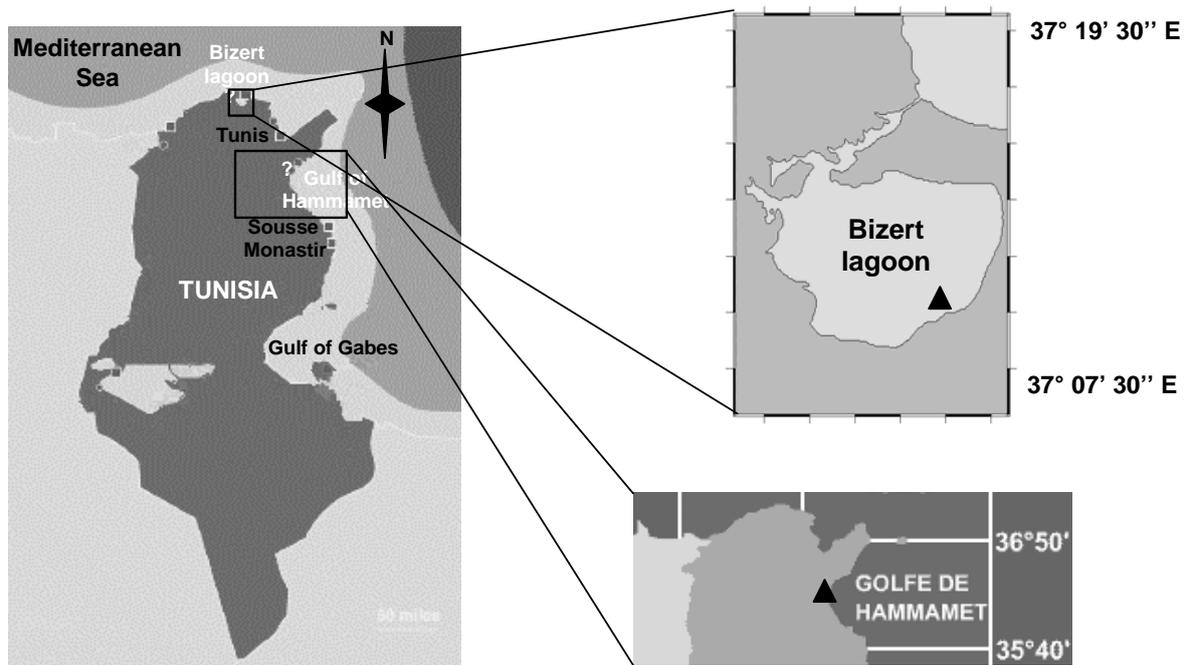


Figure 1.6. Localisation des populations tunisiennes étudiées dans la seconde étude.

Dans ce dernier cas, Kenchington et al. (2002) ont suggéré, sur la base d'une région répétée située dans l'ITS-1, que ces deux espèces étaient en fait une seule et même espèce.

Comme déjà observé par Kirkendale et al. (2004), *Ostreola equestris*, *Ostreola conchaphila*, et maintenant *Ostreola stentina*, les trois espèces du genre *Ostreola* ne peuvent être considérées comme des espèces sœurs d'après nos données de séquences 16S et COI. C'est pourquoi, bien qu'identifiées dans un genre séparé par Harry (1985) dans sa classification des huîtres, nos données favorisent l'incorporation du genre *Ostreola* dans le genre *Ostrea* comme proposé par Coan et al. (2000).

Enfin, à partir des alignements entre les séquences de *O. stentina* et *O. edulis*, la combinaison fragments-enzyme de restriction 16S-*RsaI* a permis de mettre en place une analyse PCR-RFLP rapide sur gel d'agarose discriminant les deux espèces (Figure 1.5).

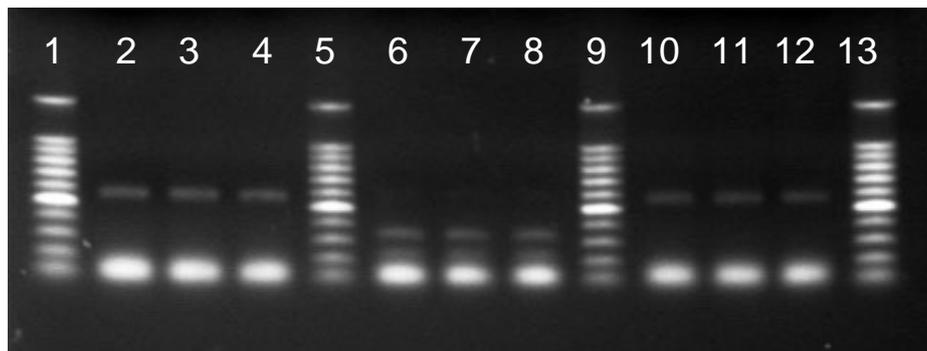


Figure 1.5. Exemple d'une identification rapide par PCR-RFLP sur gel d'agarose d'individus *O. stentina* (colonnes 6, 7, et 8) et d'individus *O. edulis* (colonnes 2, 3, 4, 10, 11, et 12). Les colonnes 1, 5, 9, et 13 correspondent au marqueur de taille 1kb.

Ces données ont été confirmées dans une seconde étude (Publication n° 24) réalisées en Tunisie uniquement (Figure 1.6) qui a également permis de préciser l'organisation de la diversité génétique entre les deux zones des côtes tunisiennes étudiées, la côte nord avec la lagune de Bizerte et la côte est avec le golfe de Hammamet. En analysant la distribution des haplotypes détectés (Figure 1.7), il apparaît qu'ils sont pratiquement tous spécifiques d'une population (sauf l'haplotype Sud tunisien de l'étude précédente présent à 95% à Hammamet et 5% (2 individus) à Bizerte) ce qui se traduit par une très forte différenciation (F_{st}) entre les deux populations de 84.5%.

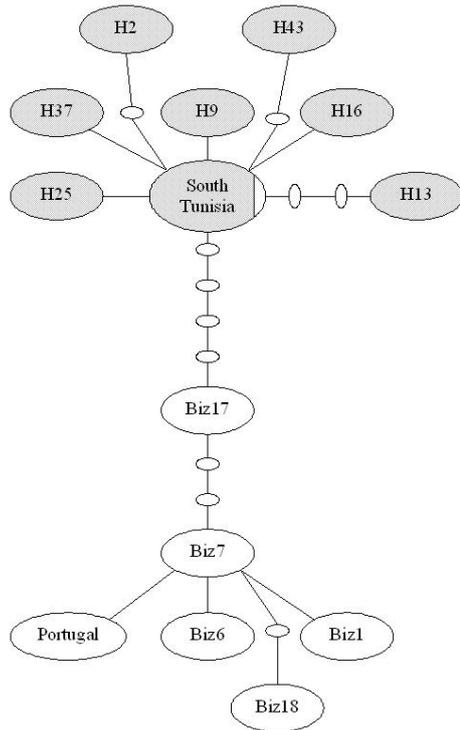


Figure 1.7. Réseau des haplotypes détectés dans cette étude avec la méthode de parcimonie pour l'estimation des généalogies de gènes à partir de séquences d'ADN. Les haplotypes en gris ont été détectés dans le golf de Hammamet et ceux en blanc dans la lagune de Bizerte.

Cette forte différenciation reste à confirmer avec un échantillonnage plus important sur les côtes tunisiennes, de part et d'autre du cap Bon déterminant le détroit de Sicile qui pourrait s'avérer être une limite biogéographique pour cette espèce.

En bref

L'huître plate européenne, *Ostrea edulis*, est l'espèce d'huîtres endémique des côtes européennes mais a été introduite dans le monde entier pour son intérêt aquacole en particulier au cours du XX^{ième} siècle. Les marqueurs moléculaires développés chez cette espèce peuvent permettre de l'identifier (marqueurs mitochondriaux) et de pouvoir retracer des introductions (marqueurs microsatellites) grâce à la caractérisation génétique des populations existantes. Chez cette espèce comme chez *O. stentina*, les échantillonnages nécessitent d'être poursuivis afin d'améliorer la caractérisation génétique des populations, vers la Méditerranée est et la Mer noire pour *O. edulis*, et sur toutes les côtes nord-africaines pour *O. stentina*, côtés Atlantique et Méditerranée.

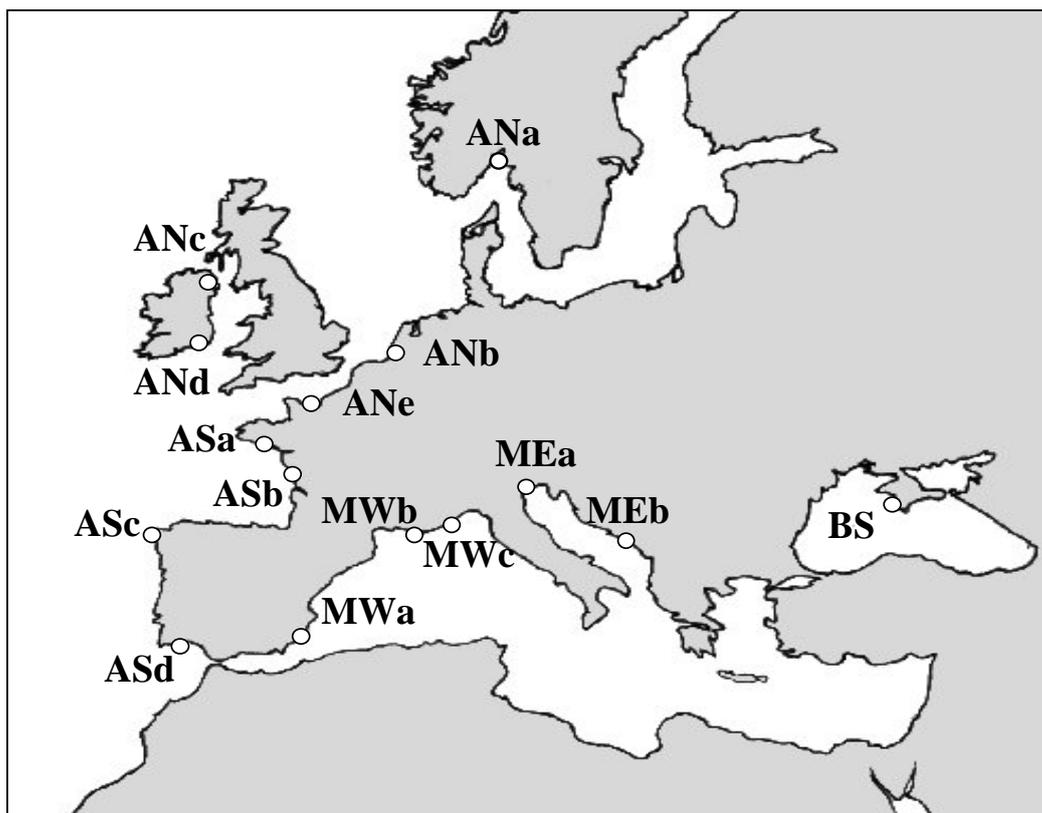


Figure 1.8. Localisation des 15 populations d'huîtres plates étudiées. A fait référence à Atlantique, M à Méditerranée, BS à Mer Noire, et N, W, S, et E respectivement à Nord, Ouest, Sud et Est.

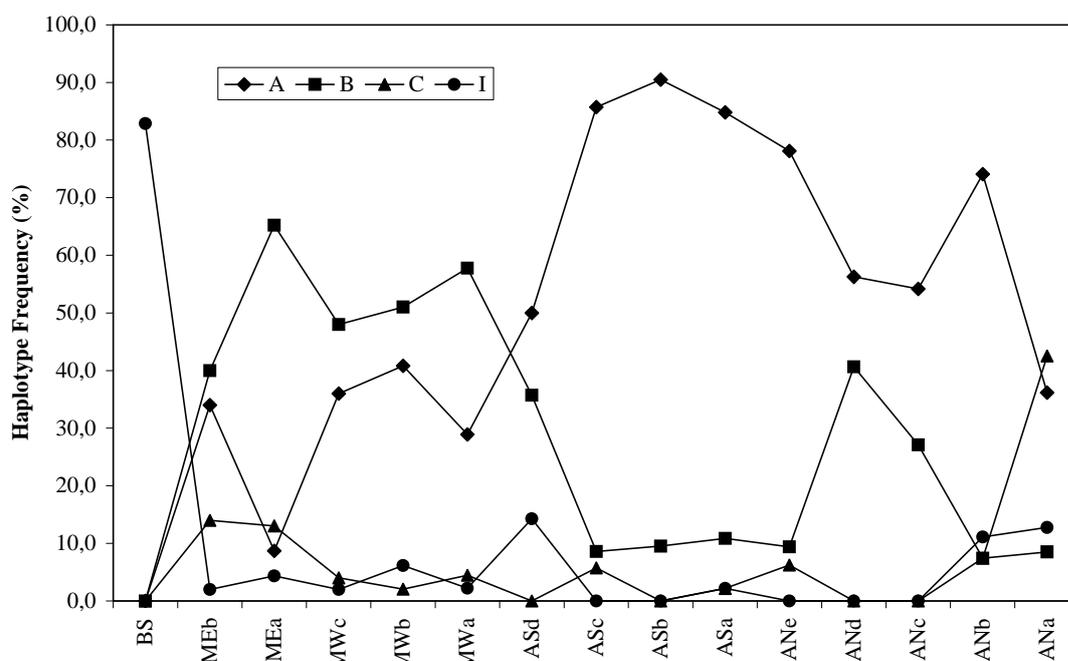


Figure 1.9. Fréquence des 4 principaux haplotypes dans les populations.

3) Structure génétique des populations européennes

Durant la dernière décennie, la diversité génétique nucléaire et la structure génétique des populations de *O. edulis* ont été étudiés, principalement en utilisant des allozymes (Jaziri 1990; Saavedra et al. 1993; Saavedra et al. 1995). Ces études ont révélé une différenciation modérée entre les populations de l'Atlantique et de la Méditerranée. Jaziri (1990), en se basant sur une plus faible diversité génétique des populations de l'Atlantique, a considéré que ces populations avaient pour origine la Méditerranée après la dernière glaciation quaternaire. Saavedra et al. (1995) ont quant à eux interprété les profils de fréquences alléliques en forme de clines comme le résultat d'un contact secondaire interglaciaire entre les stocks de l'Atlantique et de la Méditerranée.

La question de cette discontinuité entre les deux côtés du détroit de Gibraltar a ensuite été ré-analysée avec des marqueurs microsatellites (Launey et al. 2002). Les profils de structuration des populations se sont avérés en accord avec les études allozymiques précédentes sans toutefois observer la structure clinale de chaque côté du détroit. Cette étude a également montré une bonne corrélation entre distances génétique et géographique pour les deux types de marqueurs, en accord avec un modèle de dispersion d'isolement par la distance.

La diversité génétique et la structure des populations d'huîtres plates restaient à étudier avec un marqueur mitochondrial, ce que nous avons réalisé dans une étude qui a donné lieu à la publication n° 9. En effet, étant donné que ce génome mitochondrial est hérité par la voie femelle, la dérive a souvent un effet plus marqué sur lui, ce qui pourrait permettre d'avoir une image plus précise des facteurs influençant la variabilité génétique chez cette espèce. Pour cela nous avons échantillonné de 14 à 50 individus dans les mêmes 15 populations (Figure 1.8) que dans l'étude de Launey et al. (2002), et caractérisé la diversité génétique de ces populations pour un fragment de 313 pb du gène mitochondrial 12S par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) puis séquençage. Nous avons détecté 14 haplotypes dont les plus fréquents sont les haplotypes A et B, A étant plus fréquent en Atlantique et B en Méditerranée (Figure 1.9). Les populations de Mer Noire (BS) et de Norvège (Ana) ont des compositions haplotypiques particulières avec l'haplotype I largement majoritaire (84%) en Mer Noire et l'haplotype C très fréquent (45%) en Norvège.

Il est intéressant de noter que l'arbre neighbor-joining des haplotypes (Figure 1.10) a regroupé ces deux haplotypes I et C avec d'autres haplotypes rares. Par ailleurs, deux autres groupes ont été mis en évidence : celui incluant B et des haplotypes plus rares, et l'autre incluant A et également des haplotypes plus rares, avec cependant dans ce cas un groupe moins bien défini sans racine.

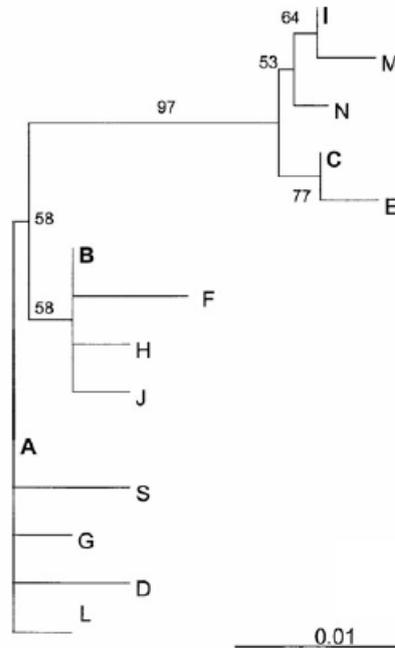


Figure 1.10. Arbre neighbor-joining basé sur les séquences des fragments du gène 12S.

La diversité génétique observée pour le fragment 12S est apparue très variable entre les populations avec en particulier une variabilité plus faible en général dans les populations de l'Atlantique et de la Mer Noire que dans celles de la Méditerranée (Figure 1.11).

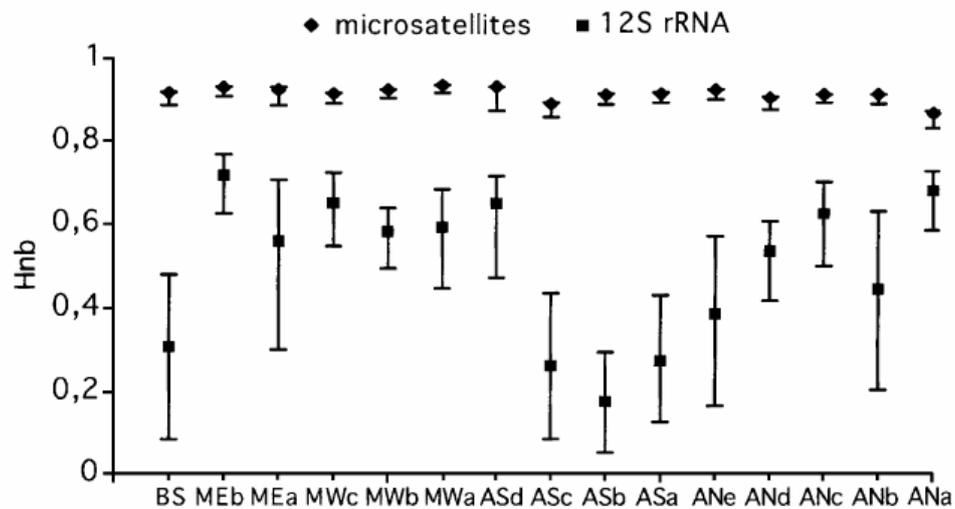


Figure 1.11. Diversités de Nei calculées à partir des données microsatellites et mitochondrial.

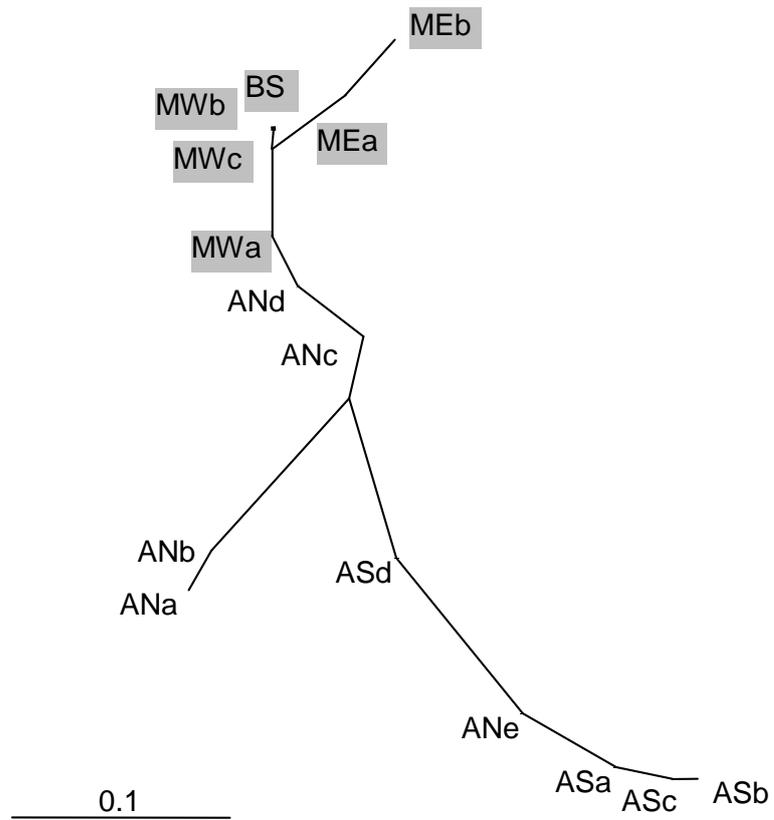


Figure 1.12. Arbre neighbor-joining basé sur les distances génétiques de Reynolds entre populations. Sont surlignées les populations de Méditerranée et de Mer Noire.

Ce phénomène n'est pas observé dans le cas de marqueurs microsatellites.

L'arbre de distances génétiques entre les populations (Figure 1.12) a mis en évidence une différenciation globale entre populations de l'Atlantique et de la Méditerranée comme dans le cas des autres marqueurs, ainsi qu'une corrélation faible mais significative entre distances génétique et géographique, même si l'on enlève les deux points les plus externes de la distribution aux compositions haplotypiques particulières, Norvège et Mer Noire (Figure 1.13).

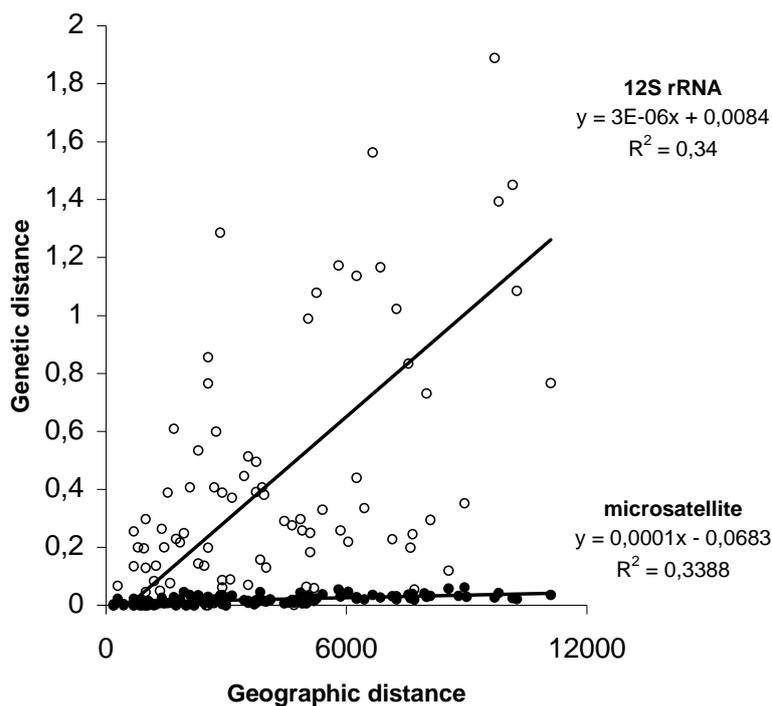


Figure 1.13. Régression entre les distances génétique et géographique pour les données microsatellites (points blancs) et mitochondrial (points noirs).

Ainsi, une différence d'un ordre de grandeur de 10 existe entre la différenciation, estimée par θ , (Weir et Cockerham 1984), observée avec les données microsatellites ($\theta = 0.019$) et mitochondrial ($\theta = 0.244$). Ceci pourrait être dû à :

- une sex-ratio déséquilibrée. En effet, dans une saison de reproduction, les mâles peuvent être jusqu'à trois fois plus nombreux que les femelles, celles-ci développant de surcroît leurs gonades plus lentement et en second (espèce protandre) en partie à cause du coût énergétique lié à la production de gamètes femelles.
- et/ou à une différence de succès reproducteur entre mâles et femelles. En effet une variance du succès reproducteur femelle peut largement influencer la taille efficace mitochondriale. Cette variance est importante chez les bivalves (Hedgecock 1994) et a été montré comme étant plus forte chez les

femelles que chez les mâles de l'huître creuse par exemple (Boudry et al. 2002).

En bref

Les données mitochondriales de diversité et de structure des populations d'huîtres plates européennes ont globalement confirmé celles obtenues précédemment avec des marqueurs allozymiques et microsattellites. Cependant, la variabilité observée entre les populations pour la diversité génétique et la forte différence d'ordre de grandeur observée sur le paramètre de différenciation, nous ont amené à formuler des hypothèses concernant la variabilité du succès reproducteur chez l'huître plate et à nous intéresser par conséquent de plus près à la dynamique au sein des populations en considérant la période de recrutement des larves et celle même de la fécondation.

4) L'hypothèse de « loterie » dans la variance du succès reproducteur

De nombreuses espèces d'invertébrés et de poissons marins sont abondantes et ont une large distribution, en particulier grâce à des formes de dispersion planctoniques (gamètes et larves). Aussi, il est souvent présumé que leurs populations sont très larges et bien mélangées. Si de nombreuses études se sont intéressées à la description spatiale de la variation entre et à l'intérieur des populations, beaucoup moins ont cherché à déterminer si un grand nombre d'adultes contribuent régulièrement au pool de larves, puis de cohortes qui donnent la génération suivante, autrement dit à la génétique de la dynamique de ces populations. Or, il a déjà été observé des cas de structures génétiques « chaotiques » à des échelles de temps et d'espace limitées, indiquant qu'une large taille de populations n'est pas forcément la règle chez ces espèces. Au contraire, la forte fécondité et les mortalités importantes dès les stades larvaires rendent possible l'existence d'une variance pour le succès reproducteur (contribution d'un individu à la génération suivante déterminée par le nombre de descendants produits) analogue à une loterie où il y a de nombreux participants mais seulement quelques vainqueurs de sommes importantes et de nombreux perdants (Hedgcock 1994; Waples 2002; Hedrick 2005). L'implication d'une telle variance du succès reproducteur pourrait être une taille efficace réduite de certaines populations à une période donnée. La dérive, considérée comme négligeable dans ces espèces marines abondantes, pourrait alors jouer un rôle dans l'évolution de ces espèces. De tels exemples de variance temporelle dans la structure génétique ont déjà

été observé chez des invertébrés ou des poissons marins (Hedgecock 1994; Turner et al. 2002; Arnason 2004). Cette hypothèse prédit également une diversité plus faible à l'intérieur des cohortes de larves et d'animaux recrutés (fixés chez les huîtres) et une hétérogénéité plus grande entre ces cohortes que dans et entre les populations d'adultes à certaines échelles spatiales. Plusieurs études ont déjà vérifié ces prédictions chez la morue (Ruzzante et al. 1996), la spisula (David et al. 1997), l'huître creuse (Li et Hedgecock 1998), le sar (Planes and Lenfant 2002), ou les oursins (Moberg et Burton 2000). Cependant, Flowers et al. (2002) n'ont pas observé de diminution de la diversité haplotypique chez les cohortes d'oursins par rapport aux adultes dans leur étude. Cette variance du succès reproducteur pourrait ainsi être également soumise à une forte variance.

Ostrea edulis est une espèce pour laquelle ce phénomène est tout à fait susceptible de se produire. En effet, il s'agit d'une espèce hermaphrodite alternée, chaque individu passant de mâle à femelle au cours du temps. Les individus peuvent se reproduire dès l'âge d'un an, ce qui conduit à la possibilité de croisements inter générations. De plus, un même individu peut se reproduire (comme mâle et/ou femelle) plusieurs fois au cours d'une même saison. La fécondité est très élevée : les femelles âgées d'un an peuvent déjà produire jusqu'à 1 million de larves, et les plus âgées plusieurs millions. Cette très forte fécondité peut accentuer la variance du succès reproducteur individuel. La biologie reproductive de cette espèce est caractérisée par une phase d'incubation : la fécondation a lieu à l'intérieur de la cavité palléale des femelles qui gardent leurs larves 8 à 10 jours avant de les expulser pour une phase libre pélagique de 8 à 10 jours avant métamorphose puis fixation. Pour une telle espèce, la synchronisation de la maturation des parents pendant la saison de reproduction est donc essentielle pour leur succès reproducteur.

Variance du succès reproducteur observée dans des cohortes de fixation

Afin de tester cette hypothèse de variance du succès reproducteur nous avons réalisé deux études visant à comparer les diversités génétiques entre cohortes de fixation et la population d'adultes locale. La première a consisté en l'analyse avec 4 microsatellites d'un échantillon de 185 individus d'une cohorte recrutée au large de Sète, et de deux échantillons des populations adultes de Port Saint Louis (50 individus) et de l'étang de Thau, près de Sète (49 individus), qui ont été regroupés par la suite étant donné leur homogénéité en fréquences alléliques. Ce travail a donné lieu à la publication n° 19. L'hétérozygotie observée (H_o) était identique chez les adultes et le naissain (Tableau 1.2), de même que l'hétérozygotie attendue (H_e).

Locus	Parameter	Juvenile	Adults
<i>OeduH15</i>	Sample size	171	94
	n_a	11	16
	H_o	0.678	0.702
	H_e	0.841	0.893
	F_{IS}	0.194***	0.215***
<i>OeduJ12</i>	Sample size	183	96
	n_a	16	25
	H_o	0.918	0.885
	H_e	0.895	0.929
	F_{IS}	-0.26	0.047*
<i>OeduO9</i>	Sample size	179	95
	n_a	16	24
	H_o	0.961	0.916
	H_e	0.906	0.895
	F_{IS}	-0.062**	-0.023
<i>OeduT5</i>	Sample size	181	93
	n_a	12	27
	H_o	0.873	0.925
	H_e	0.843	0.933
	F_{IS}	-0.036	-0.009

Tableau 1.2. Variabilité génétique dans les échantillons de juvéniles et d'adultes d'huîtres plates. n_a est le nombre d'allèles, et H_o et H_e les hétérozygoties respectivement observées et attendue. F_{IS} estime la déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Cependant, malgré sa taille supérieure, l'échantillon des juvéniles a montré un nombre moyen d'allèles par locus inférieur à celui de l'échantillon d'adultes (13.75 contre 23). Parmi les 95 allèles détectés dans l'étude, 52 étaient présents chez les deux groupes (adultes et juvéniles), et 40 seulement chez les adultes. Seuls trois allèles se sont avérés seulement présents chez les juvéniles. Ceci revient à dire que l'échantillon de juvéniles avait seulement 60% de la diversité génétique des adultes. La différenciation entre les deux groupes était significative ($F_{st} = 0.041$, $p < 0.0001$). Les estimations du nombre de parents efficaces par quatre méthodes (temporelle, déséquilibre de liaison, excès d'hétérozygotes, et raréfaction de la diversité allélique) ont suggéré que 10 à 20 adultes environ avaient produit cette cohorte. Cette observation, ainsi que l'analyse du déséquilibre de liaison entre marqueurs, supporte l'hypothèse de loterie dans la variance du succès reproducteur et suggère que des croisements

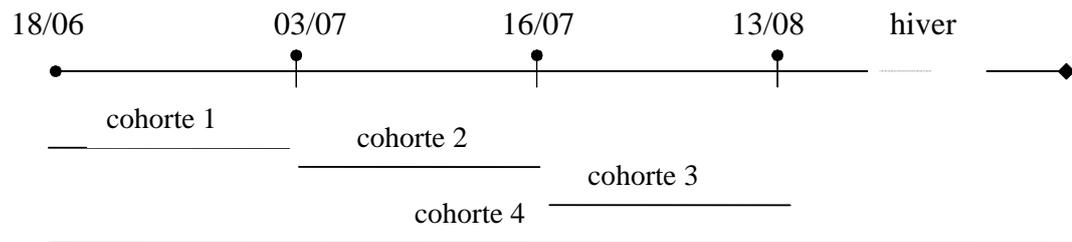
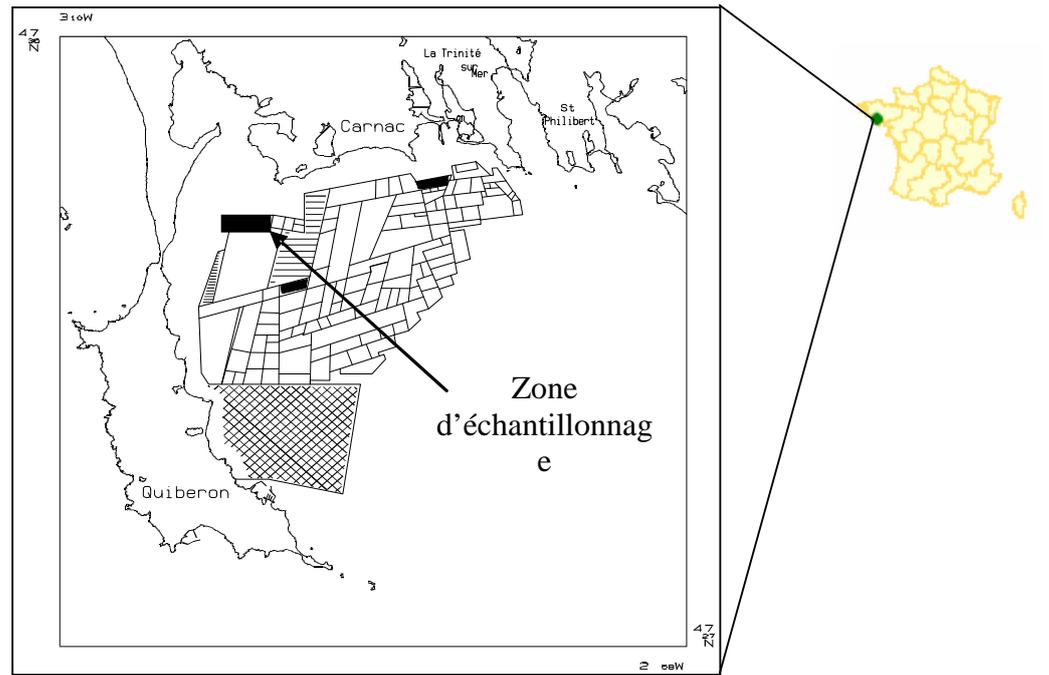


Figure 1.14. Localisation et méthode d'échantillonnage.

consanguins sont susceptibles de se produire. En effet, des relations de pleins-frères et demi-frères sont apparues plus probables (respectivement 28% et 26%) chez les juvéniles que chez les adultes (respectivement 5% et 2.8%).

Dans le cadre d'une seconde étude qui s'est intéressée à des cohortes recrutées en Bretagne, nous n'avons pas obtenu le même type de résultats (Publication n° 25). Nous avons disposé 3 lots de collecteurs à des périodes successives de l'été 2001, et un lot sur toute la période, qui ont permis de recueillir 4 cohortes de 672 animaux au total. Ce même été, 68 adultes ont été échantillonnés dans cette même zone bretonne de Quiberon (Figure 1.14). Notre but était de tester deux prédictions de l'hypothèse de loterie dans la variance du succès reproducteur dans cette population de la côte Atlantique : (1) les échantillons des cohortes ont des diversités génétiques réduites par rapport à l'échantillon adulte, (2) les cohortes sont génétiquement différenciées entre elles. Nous avons réalisé cette étude avec 4 marqueurs microsatellites et la séquence d'un fragment du gène mitochondrial 12S. Les marqueurs microsatellites n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les richesses alléliques des différents groupes (valeurs comprises entre 20 et 22), ni de différenciation entre les cohortes ni entre les cohortes et les adultes. Cependant, les données du fragment mitochondrial ont mis en évidence une différence significative entre la cohorte 1 et la cohorte 4 ($F_{st} = 0.052$) et entre la cohorte 1 et les adultes ($F_{st} = 0.058$). Cette différence entre les deux types de données a été interprétée comme résultant du plus faible effectif efficace du génome mitochondrial, plus sensible à la dérive que le génome nucléaire. Le signal donné par les données mitochondriales pourrait indiquer une certaine limitation dans le nombre de parents femelles ayant contribué à la constitution de ces cohortes (au moins la cohorte 1). Le phénomène de loterie dans la variance du succès reproducteur décrit par Hedgecock apparaît probablement comme une loterie lui-même se produisant avec une variance importante résultant de l'interaction entre la biologie de la reproduction de cette espèce et les conditions environnementales locales.

Variance du succès reproducteur observée dans des descendances de femelles incubantes

Pour aller plus loin dans notre étude de cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à la variance du succès reproducteur en populations naturelles mais en étudiant cette fois la diversité génétique de descendants de femelles incubantes, mais aussi en conditions expérimentales en étudiant la diversité génétique de pontes en masse d'un lot de géniteurs potentiels tous connus, ce qui n'est pas possible en conditions naturelles.

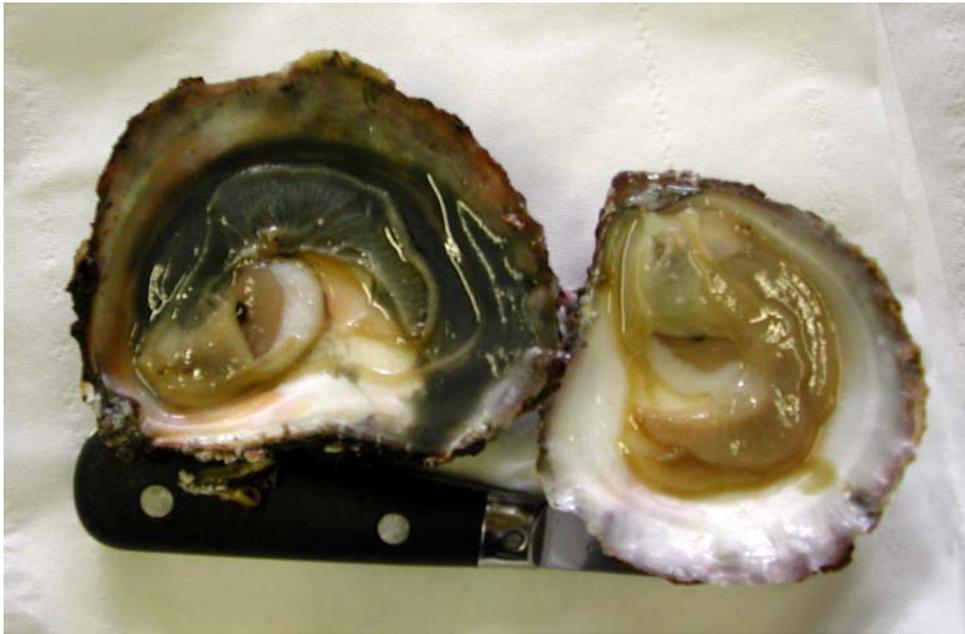


Figure 1.15. Huître plate ardoisée à gauche et non ardoisée à droite.

Tout d'abord, de juin à septembre 2001, 13 huîtres plates femelles « ardoisées » ont été échantillonnées parmi la population de Quiberon en Bretagne. Ce caractère ardoisé correspond à la présence dans leur cavité palléale de larves de moins de 10 jours non encore émises dans le milieu naturel (Figure 1.15).

Les femelles F1 et F2 ont été échantillonnées le 26 juin, F4, F5, F6, F7 et F8 le 10 juillet, F9 et F10 le 17 juillet, F21 le 8 août, et F22, F23 et F24 le 14 août. Trois ou quatre marqueurs microsatellites ont été utilisés pour génotyper 80 larves par femelle. Le nombre moyen d'allèles par locus s'est avéré très variable : de 4.3 pour F7 à 18.5 pour F10 (Tableau 1.3)

Femelle	N _a				Moyenne
	J12	U2	H15	T5	
F1	18	18	10	-	15.3
F2	19	15	9	-	14.3
F4	11	15	10	17	13.3
F5	7	9	5	-	7
F6	14	16	6	12	12
F7	5	4	4	-	4.3
F8	8	9	7	6	7.5
F9	11	13	11	14	12.3
F10	21	23	11	19	18.5
F21	4	5	4	4	4.3
F22	17	25	10	18	17.5
F23	20	23	10	17	17.5
F24	7	8	6	9	7.5

Tableau 1.3. Polymorphisme allélique et analyses de paternité pour les larves échantillonnées des 13 femelles incubantes. N_a est le nombre d'allèles dans les quatre locus étudiés. Sont en gras les locus utilisés pour l'analyse de paternité.

L'analyse de parenté avec une méthode Bayésienne (logiciel Parentage) a mis en évidence un nombre très variable de pères selon les descendance des différentes femelles, allant de 1 à 40. Pour affiner cette première analyse, les descendance de 5 femelles (en gris dans le tableau 1.2) ont été choisies pour réaliser des analyses de paternité étant donné le nombre peu élevé d'allèles présents. Ceci a été réalisé avec la méthode de reconstruction parentale (Jones, 2001) et le logiciel Gerud1.0 (Figure 1.16). Le premier mâle (first male) représente le mâle ayant la plus forte contribution dans la descendance et ainsi de suite. Pour chaque femelle, les premiers aux cinquièmes mâles sont différents des autres.

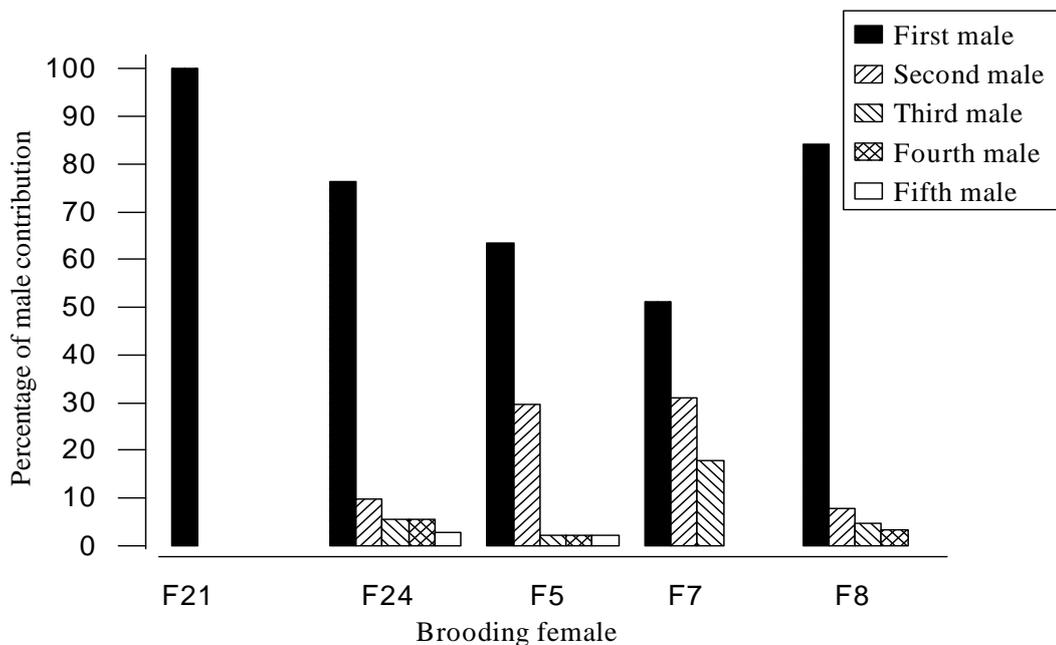


Figure 1.16. Contributions paternelles pour la descendance de 5 femelles incubantes.

Cette analyse met en évidence la variance du succès reproducteur mâle puisque les mâles ayant la plus forte contribution ont engendré entre 51% et 100% des larves selon les familles. La contribution des autres mâles quand il y en a va de quelques pourcents à 20-30%. Ces analyses sont restées limitées en l'absence de la connaissance des génotypes des pères potentiels.

Aussi, en 2002, 63 adultes ont été échantillonnés toujours à Quiberon et mis en stabulation dans l'écloserie de La Tremblade puis mis en maturation au printemps 2003. Six pontes ont été recueillies entre le 14 et la 30 mars et les larves échantillonnées. Trois marqueurs microsatellites ont été utilisés pour génotyper 80 larves par ponte. Le nombre moyen d'allèles pour chaque ponte a été significativement plus faible (14.3 à 18.3) que celui de la population d'adultes les ayant produites (24.3). La différenciation génétique a été calculée pour chaque paire de pontes et entre pontes et adultes et s'est avérée significativement différente de 0 dans tous les cas (Tableau 1.4a), allant de 0.7% à 11.9%. La différenciation génétique a également été calculée entre la population d'adultes et les pontes regroupées successivement, mettant en évidence une absence de différenciation entre la population d'adultes et l'ensemble des pontes (Tableau 1.4b).

(a)

	14/03/03	17/03/03	20/03/03	22/03/03	28/03/03	30/03/03
Adultes	3 ^{***}	5.5 ^{***}	3.1 ^{***}	1.5 ^{***}	1.3 ^{***}	1.2 ^{***}
14/03/03	-	11.9 ^{***}	7.1 ^{***}	5.9 ^{***}	5 ^{***}	5.1 ^{***}
17/03/03	-	-	9.8 ^{***}	6.8 ^{***}	7.9 ^{***}	7.8 ^{***}
20/03/03	-	-	-	0.7 ^{**}	4.2 ^{***}	4.5 ^{***}
22/03/03	-	-	-	-	3 ^{***}	3 ^{***}
28/03/03	-	-	-	-	-	1.8 ^{***}

(b)

	14	14+17	14+17+20	14+17+20+22	14+17+20+22+28	14+17+20+22+28+30
Adultes	3 ^{***}	1.1 ^{***}	0.6 ^{**}	0.6 ^{**}	0.3 [*]	0.2 ^{NS}

Tableau 1.4. (a) Différenciation génétique entre les différents groupes. (b) Différenciation génétique entre les adultes et les 6 pontes regroupées successivement. Les valeurs de F_{st} par apaire de populations (Weir et Cockerham 1984) sont exprimées en pourcentage et la significativité a été testée après 1000 permutations: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; NS non significatif.

Le nombre de femelles ayant contribué aux différentes pontes est également variable dans cette expérience (Figure 1.17). Cette analyse met en évidence que des femelles participent à une ou plusieurs pontes, mettant en évidence qu'elles vont relâcher dans le milieu leurs œufs de façon brève ou plus continue.

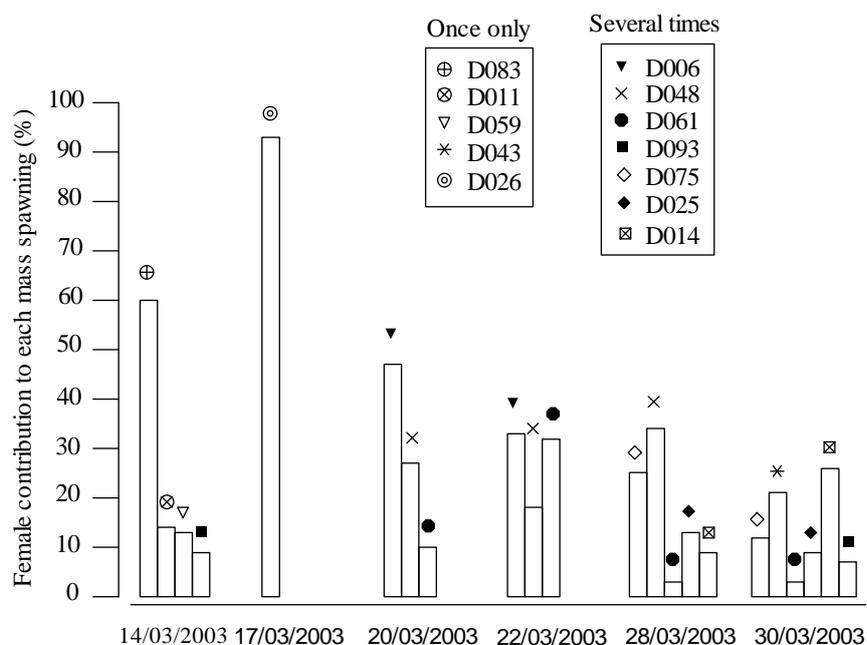


Figure 1.17. Contribution des femelles à chaque ponte. Chaque femelle (D0XX) est indiquée par un symbole.

L'estimation des tailles efficaces (Tableau 1.5) des différentes pontes montre qu'un nombre relativement important de parents ont contribué à ces pontes.

	Ne (temporal method)
14/03/03	21.0 [12.4 36.2]
17/03/03	12.5 [7.8 19.6]
20/03/03	21.0 [12.3 36.5]
22/03/03	22.3 [12.9 39.6]
28/03/03	33.2 [17.8 70.1]
30/03/03	29.6 [16.3 58.9]

Tableau 1.5. Taille efficace pour chaque ponte.

Cela se traduit par un nombre pères variable mais relativement important (Figure 1.18) ayant contribué aux pontes (logiciel PAPA, Duchesne et al. 2002).

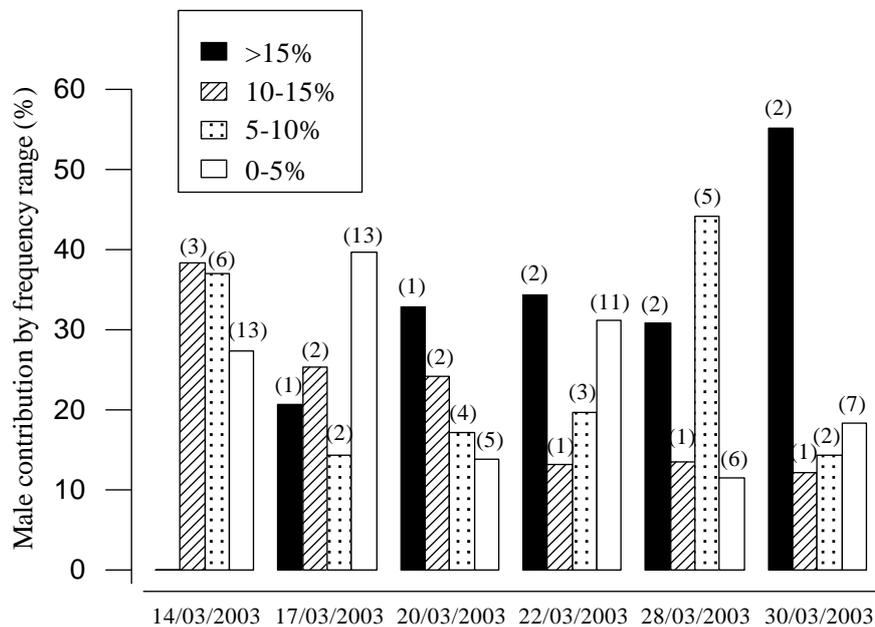


Figure 1.18. Contribution paternelle à chaque ponte. Les mâles ont été regroupés par classe de fréquence. Par exemple, pour la ponte du 14 mars, trois mâles ont contribué chacun en fréquence de 10 à 15%, 6 entre 5 et 10% et 13 entre 0 et 5%. Les mâles majoritaires sont représentés dans les histogrammes noirs.

Ces résultats confirment les résultats obtenus avec les cohortes en mettant en évidence une forte variance du succès reproducteur mais aussi le fait que même si des pontes différenciées

au départ peuvent devenir des cohortes différentes de juvéniles fixées, les conditions environnementales peuvent faire que cette structure va persister ou bien disparaître sur l'ensemble d'une saison de ponte comme cela est montré dans le cas de notre étude expérimentale.

En bref

Les données obtenues à partir de cohortes ou de femelles incubantes dans le milieu naturel ou bien de pontes obtenues en milieu contrôlé mettent en évidence qu'une forte variabilité du succès reproducteur existe et est susceptible d'entraîner des structures génétiques particulières par effet de la dérive génétique à une échelle spatiale et temporelle réduite. Les conditions environnementales peuvent alors jouer alors un rôle important. Ces études restent difficiles à réaliser en particulier en milieu naturel où la caractérisation de tous les géniteurs potentiels est impossible. Les estimations des tailles efficaces des populations restent à fiabiliser avec l'utilisation d'un nombre plus important de marqueurs génétiques.

Conclusion

L'apport majeur de l'ensemble de ces travaux est d'avoir considéré les huîtres plates depuis les populations jusqu'à l'individu même à un stade peu développé qu'est la larve. En effet, pour bien comprendre la structure de la diversité génétique observée actuellement, il est nécessaire de comprendre la dynamique de ces populations. Ainsi, il apparaît que, malgré une forte fécondité et un nombre abondant d'animaux (même encore pour l'huître plate malgré la surexploitation et les épizooties subie), des réductions de la taille efficace des populations peut avoir lieu à des échelles temporelles et spatiales réduites, qui peuvent laisser des traces durables dans la structure des populations comme mis en évidence lors de la comparaison de la structure avec les marqueurs microsatellites et le marqueur mitochondrial. Le développement de marqueurs moléculaires (microsatellites et ADN mitochondrial) a été crucial pour ces aspects ainsi que pour l'identification d'espèces ou la mise en évidence d'introductions. De nouveaux marqueurs restent cependant à développer comme nous sommes en train de le faire avec des AFLPs (voir chapitre 3) ou de nouveaux marqueurs microsatellites (nouveau projet du Groupe Aquacole de l'Arc Atlantique), afin de mieux estimer les paramètres de diversité et de structure génétique.

CHAPITRE 2 - L'ANEUPLOÏDIE, PREUVE D'UNE GRANDE PLASTICITE DU GENOME DE L'HUITRE CREUSE

1) L'aneuploïdie

L'aneuploïdie caractérise une cellule qui ne possède pas le nombre normal de chromosomes. Une cellule diploïde possède deux copies de chaque chromosome présent dans le noyau, soit 20 chromosomes chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Une cellule aneuploïde aura donc un nombre anormal de chromosomes. Elle pourra en avoir par exemple 19 ou 21 au lieu de 20.

On distingue deux types d'aneuploïdie :

- * l'aneuploïdie par défaut, encore appelée monosomie, et qui correspond à la perte d'un ou plusieurs chromosomes : 1, 2 ou 3.

- * l'aneuploïdie par excès, qui correspond au gain d'un ou plusieurs chromosomes. Chez l'huître cette aneuploïdie est particulièrement rare mais a pu être observée.

Dans le cas de l'huître, par simplification de langage, nous parlerons d'aneuploïdie pour faire référence à l'aneuploïdie par défaut correspondant à un pourcentage de cellules chez un individu comprenant 17, 18 ou 19 chromosomes (Figure 2.1).

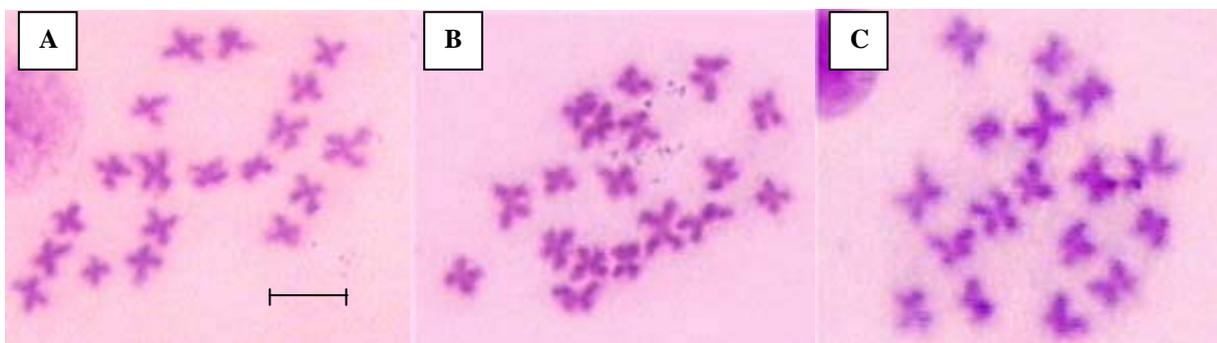


Figure 2.1. Métaphases aneuploïdes de *Crassostrea gigas* avec (A) $2n=19$, (B) $2n=18$ et (C) $2n=17$ chromosomes. Echelle = 7 μm .

Dans le cas d'une disjonction normale, les chromatides d'un chromosome se séparent à chaque pôle cellulaire pendant la division mitotique, mais parfois, une mauvaise ségrégation chromosomique peut se produire et amener à l'observation du phénomène de l'aneuploïdie. La non-disjonction des chromosomes pendant la mitose ou la méiose est l'origine principale de l'aneuploïdie (Bond et Chandley 1983; Martin et Rademaker 1990). Toutefois, un autre processus peut aussi amener à l'aneuploïdie : le phénomène de retard dans l'ascension

Famille	Espèce	stade	Aneuploïdie moyen (%)	Variabilité individuelle (%)	Références
OSTREIDAE	<i>Crassostrea gigas</i>	œufs et embryons	-	-	Ahmed et Sparks 1967 ; Longwell et al. 1967
		juvéniles		9 - 26	Thiriot-Quiévreux 1986 Guo et Allen 1994
	<i>Crassostrea gigas</i> 3n		20		Wang et al. 1999
MYTILIDAE	<i>Ostrea edulis</i>	juvéniles		12 - 34	Thiriot-Quiévreux 1986
	<i>Ostrea angasi</i>	adultes	7,62		Li et Havenhand 1997
	<i>Mytilus edulis</i>	œufs et embryons		5 - 10	Ahmed et Sparks 1970
	<i>Mytilus californianus</i>				
	<i>Mytilus edulis</i>	embryons		8 - 26	Dixon 1982
PECTINIDAE	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	adultes		23 - 32	Martínez-Expósito et al. 1992
	<i>Chlamys farreri</i> 3n et 4n	œufs et embryons		5 - 32	Beaumont et Gruffydd 1974 Yang et al. 2000

Tableau 2.1. Etudes de l'aneuploïdie réalisées chez différents mollusques et crustacés.

anaphasique lorsqu'un chromosome ou une chromatide reste en arrière (Seoane et al. 2000; Kirsch-Volders et al. 2002). Ainsi, à la différence des altérations chromosomiques structurales (telles que délétions, duplications, inversions et translocations), les aberrations numériques sont habituellement causées par des dommages infligés sur l'appareil microtubulaire menant à la perte ou au gain de chromosomes durant la division cellulaire (Dixon et Wilson 2000).

L'aneuploïdie a été étudiée au niveau embryonnaire, larvaire ou au stade adulte chez de nombreux mollusques et crustacés et en particulier chez les huîtres de la famille des Ostreidae. C'est un phénomène quantitativement non négligeable (Tableau 2.1) mais cependant très mal connu quand à ses mécanismes, son évolution au cours de la vie de l'huître, les différents facteurs l'influençant. Dans l'ensemble de ce chapitre nous parlerons de taux d'aneuploïdie d'une population ou d'un groupe d'individus, en le définissant comme le pourcentage de cellules aneuploïdes estimé dans un échantillon de 30 métaphases provenant de cellules somatiques (branchies) chez 30 individus.

2) L'aneuploïdie dans les populations des bassins de Marennes-Oléron et d'Arcachon

Impact des sites et des années de recrutement

Le taux d'aneuploïdie a été mesuré de 1998 à 2000 sur les sites de captage français, notamment sur quatre sites de captage de Charente Maritime (Bonne-Anse, Seudre, Charente, et Fouras) et un site du bassin d'Arcachon. De plus, trois sites de captage du bassin d'Arcachon ont à nouveau été étudiés en 2001 (Nord de l'île aux oiseaux, Sableyre de Comprian, Villa Algérienne). Les taux observés sur du naissain issu de captage naturel sont résumés sur les figures 2.2 et 2.3. Ils varient en général entre 10 et 12 %, ce qui correspond à une valeur moyenne par rapport aux différentes populations naturelles ou d'écloserie étudiées au cours des dix dernières années. Le suivi réalisé pendant 3 ans sur le site de Fouras montre une stabilité du phénomène à cet endroit. Il en est de même à Arcachon où le taux d'aneuploïdie de 12% est à peu près le même en 1998 est sur la moyenne des trois sites étudiés en 2001.

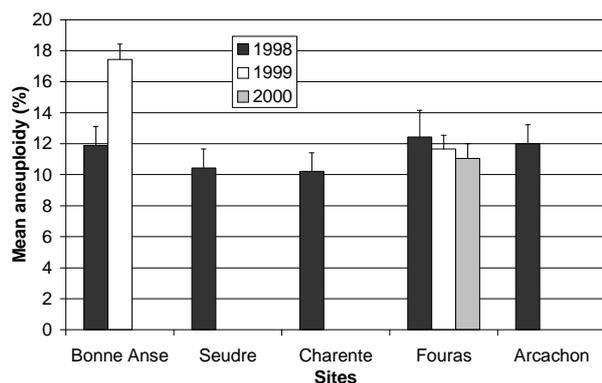


Figure 2.2. Taux d'aneuploïdie de sites de captage du Bassin de Marennes-Oléron et d'un site du bassin d'Arcachon sur trois années.

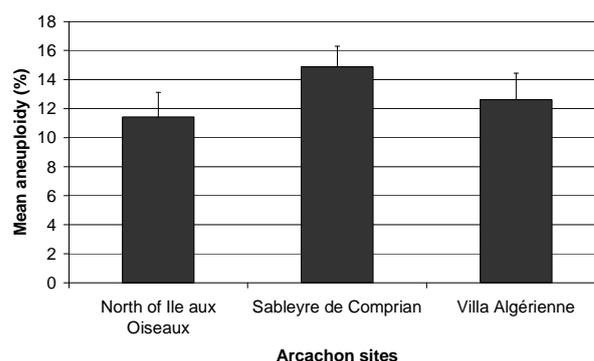


Figure 2.3. Taux d'aneuploïdie de trois sites de captage du bassin d'Arcachon en 2001.

Cependant, le taux d'aneuploïdie était de 11,9 % en 1998 mais de 17,4 % en 1999 à Bonne-Anse. Ce dernier chiffre correspond à une moyenne. Or, si l'on s'intéresse aux « petites » et « grandes » huîtres de cette population, les deux groupes ont des taux d'aneuploïdie différents. En moyenne, les « grandes » huîtres ont un taux d'aneuploïdie de 15,4 % et les « petites » de 19,4 %.

En bref

Il apparaît donc que l'aneuploïdie est un phénomène que l'on retrouve globalement dans les huîtres du Bassin de Marennes-Oléron et d'Arcachon mais à des taux qui ne sont pas alarmants (10-12%). Par contre les résultats sur Bonne Anse posent plus de questions compte tenu des taux atteignant jusqu'à près de 20 %. Ce site est par ailleurs connu pour être soumis à des pollutions importantes, ce qui nous a amené à travailler sur les facteurs de qualité du milieu. Il s'agit en effet, avec le facteur génétique, d'une des causes possibles de l'aneuploïdie.

Suivi de la vasière de Brouage sur une année

La vasière de Brouage a été le site expérimental du Programme Environnement, Vie et Sociétés intitulé «Impact des micropolluants (métaux lourds et phytosanitaires) sur le fonctionnement d'un écosystème : application sur la vasière de la zone intertidale du bassin de Marennes-Oléron». Cette analyse dans le milieu naturel, sur un même site, faisait naturellement suite aux études précédentes afin de savoir si le taux d'aneuploïdie des huîtres pouvait évoluer au cours d'une année. Nous avons eu par ailleurs quelques informations sur la

teneur en différents pesticides sur ce site puisque le but principal du projet était d'étudier l'impact de polluants sur le fonctionnement d'un écosystème, mais malheureusement pas au moment des prélèvements que nous avons réalisés. Quatre prélèvements d'huîtres ont ainsi été réalisés les 5 mars (PEVS 1), 17 juin (PEVS 2), et 30 septembre 2003 (PEVS 3), et le 9 février 2004 (PEVS 4). A chaque prélèvement, une centaine d'huîtres juvéniles de taille approximativement équivalente, provenant de captage naturel, a été conservée. Après 3 à 4 semaines de conditionnement (augmentation de température jusqu'à 15°C et addition de nourriture), les huîtres ont été disséquées et 35 branchies d'huîtres ont été fixées par prélèvement. Les huîtres des deux premiers prélèvements étaient très riches en métaphase et 30 individus par prélèvement ont pu être analysés. Par contre, l'index mitotique de celles de septembre était très faible et seulement 10 individus ont pu être analysés pour l'estimation de l'aneuploïdie. Une analyse de variance a montré qu'il existait des différences significatives entre les différents points de prélèvements (Figure 2.4).

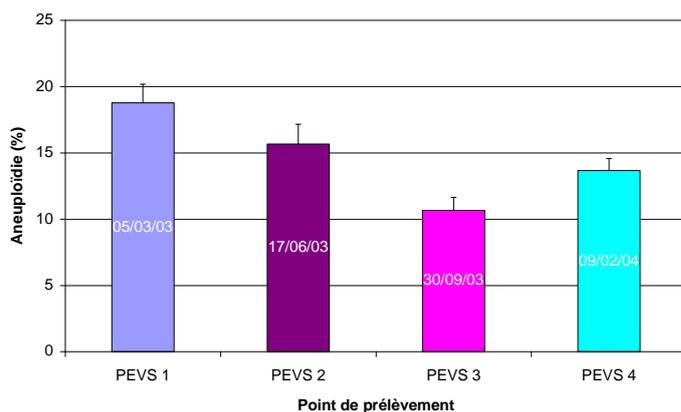


Figure 2.4. Pourcentage d'aneuploïdie des huîtres de la vase de Brouage à différents points de prélèvements.

Une analyse statistique plus poussée a révélé une différence significative entre mars et septembre 2003 et les mois de mars 2003 et février 2004; mais pas entre les autres points de prélèvement. Au cours de l'année 2003, le taux d'aneuploïdie a diminué. Le plus fort taux d'aneuploïdie observé était de 18,78% en mars 2003. Au début de l'année 2004, le taux d'aneuploïdie a été plus faible que l'année précédente en période hivernale.

Munaron et al. (2003) ont montré, dans une étude portant sur l'estimation des apports d'herbicides dans le bassin de Marennes-Oléron pour l'année 2001, que les produits phytosanitaires se trouvaient en plus grande quantité en hiver (ruissellement plus important) et au printemps (période d'épandage d'avril à juillet). Ainsi, les résultats observés auraient pu s'expliquer en partie avec les quantités d'atrazine retrouvées dans le milieu. Cependant, les

analyses de pesticides au niveau de l'eau interstitielle des sédiments sur la vasière de Brouage réalisées par le CEMAGREF de Bordeaux-Cestas ont montré que l'atrazine, un herbicide particulièrement étudié par cette équipe, était très peu présent sur ce site au moment du prélèvement (seulement $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$) et en faible quantité même au niveau du canal de Montportail, à l'est de la radiale du PEVS, à la sortie d'une parcelle agricole drainée ($0,15 \mu\text{g l}^{-1}$). Malheureusement, nous n'avons aucune donnée sur les teneurs en pesticides dans l'eau au moment des prélèvements. Le plus faible taux d'aneuploïdie observé en février 2004 par rapport à mars 2003 pourrait peut-être s'expliquer par des précipitations plus faibles pendant l'hiver 2004 (et donc un apport plus faible en herbicides) et/ou par une diminution des quantités de pesticides (et en particulier l'atrazine) utilisées par les agriculteurs.

En bref

Cette étude nous a permis de déterminer que le taux d'aneuploïdie d'une population d'huîtres creuses du bassin de Marennes-Oléron fluctuait au cours d'une année, soit d'un cycle de reproduction pour l'huître. Les données environnementales relevées n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une corrélation claire entre un facteur, un polluant par exemple, et la modification du taux d'aneuploïdie. Par ailleurs, la saisonnalité jouant un rôle très important à plusieurs niveaux (physiologie de l'huître, température, pluviométrie, période d'épandage de pesticides,...), cette étude souligne la difficulté de l'étude du phénomène d'aneuploïdie sur des populations d'huîtres soumises à de nombreuses contraintes.

Impact des conditions d'élevage

Le projet DYNAMO (DYNAmique des MOrtalités) faisait partie intégrante du programme MOREST (2000-2005) qui a étudié la dynamique de la mortalité printanière et estivale de *Crassostrea gigas* dans des environnements discriminants par rapport à la mortalité (distance par rapport au sédiment, positionnement dans la colonne d'eau et environnement peu sensible). Ce projet a été pour nous le cadre d'étude de l'impact de conditions d'élevage différentes sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses.

Une population avec une variabilité génétique assez large a été utilisée afin de réaliser cette étude. Les 3 conditions expérimentales proposées sont des élevages sur tables ostréicoles et en poches traditionnelles : élevage sur estran à proximité du fond (15 cm du fond) sur le site atelier de Perquis, élevage sur estran à 70 cm du fond sur ce même site, et élevage en marais

sur le site d'Artouan. Trois prélèvements d'animaux ont été réalisés (Point 0 le 13 mars 2002 lors de la sortie de nurserie de Bouin, Point 1, le 27 mai 2002, Point 2, le 3 juillet 2002). La mortalité a été étudiée à partir de 3 poches ostréicoles contenant chacune 200 huîtres au départ pour chaque site. Un fort taux de mortalité est tout d'abord apparu à Artouan puis plus tardivement à Perquis 15.

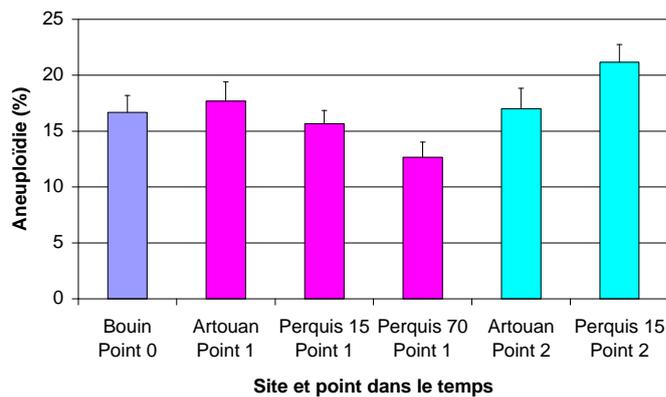


Figure 2.5. Pourcentage d'aneuploïdie d'huîtres creuses pour chaque site en fonction du point d'échantillonnage temporel et spatial.

Dans la figure 2.5, il apparaît que l'échantillon Perquis 70 point 1 a un taux d'aneuploïdie significativement plus faible que les autres échantillons. Cependant, pour des raisons techniques, le point Perquis 70 n°2 n'a pu être analysé, ce qui ne permet pas de conclure de façon certaine à un impact négatif du mode d'élevage bas (15cm) sur l'aneuploïdie des huîtres. Il est cependant à noter que ce mode d'élevage bas a eu globalement des effets négatifs sur les huîtres (Soletchnik et al. 2005).

En bref

Dans le cadre de cette étude, nous avons observé des différences de taux d'aneuploïdie chez des huîtres selon divers modes de culture. A long terme, le site pourrait jouer sur le patrimoine génétique global de la population (par sélection, ...). L'élevage en poches sur des tables ostréicoles placées à 70 cm du sol semble être le meilleur mode de culture car c'est dans ces conditions que nous avons observé le plus faible taux d'aneuploïdie. Il s'agit du mode de culture principal utilisé en ostréiculture.

3) Les polluants, facteurs importants de l'environnement ostréicole

La Charente est le fleuve constituant le principal apport d'herbicides au bassin de Marennes-Oléron. En 2001 et 2002, des études ont montré que parmi les herbicides recherchés, la Charente apporte jusqu'à 90% de triazines jusqu'à son estuaire, avec, de façon chronique l'**atrazine** et son principal métabolite, la déséthylatrazine (DEA) (Munaron et al. 2003; Munaron et al. 2004). Des phényl-urées (dont le diuron) étaient aussi présentes et au regard des concentrations retrouvées, il apparaît qu'elles sont de plus en plus utilisées. En se basant sur le modèle hydrodynamique Mars2D, ces auteurs ont pu montrer que, hors périodes d'épandage de l'atrazine, les niveaux d'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron étaient relativement faibles et généralement proches de $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$. Ils ne dépassaient que rarement les $0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ (périodes de crues) et pouvaient localement dépasser les $0,12 \mu\text{g l}^{-1}$ (en mai-juin, lors des périodes d'épandage). La figure 2.6 représente la visualisation de l'emprise maximale du panache d'atrazine lors de la modélisation de la crue importante de mai 2001 (jusqu'à $300 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) lors des étales de haute et basse mer respectivement. Ces figures correspondent au pire cas obtenu durant les deux années de suivi des niveaux d'atrazine présents dans les eaux littorales (Munaron et al. 2006).

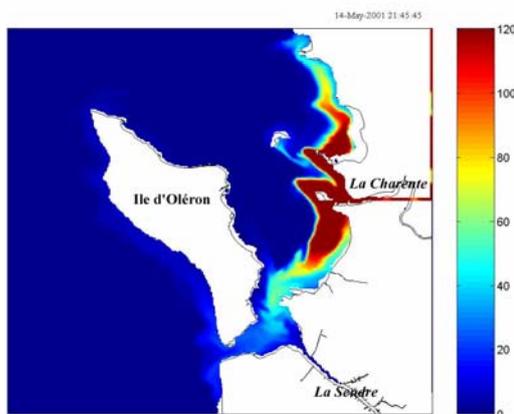


Figure 2.6. Visualisation du panache d'atrazine (concentrations en ng l^{-1}) dans le bassin de Marennes-Oléron au 14 mai 2001 (étale de haute mer), d'après la simulation Mars2D du mois de mai 2001 (Munaron, 2004).

Les fortes crues de la Charente auraient pour conséquence de chasser l'atrazine plus loin et plus vite dans le bassin mais aussi de raccourcir la durée de présence des fortes teneurs en atrazine dans le bassin. A l'inverse, en période de faible débit de la Charente, les importantes teneurs en atrazine resteraient confinées dans l'estuaire en raison du va-et-vient dû à la marée et l'exutoire de la Charente serait alimenté plus longtemps par les apports d'atrazine. De nombreuses études ont déjà montré des effets létaux ou sub-létaux sur des organismes aquatiques : grenouille (Hayes et al. 2002), phytoplancton (Robert et al. 1986) ou mollusques (His et Robert 1986; Moraga et Tanguy 2000; Munoz et al. 2001). De plus, des conséquences

au niveau génétique ont aussi été observées chez plusieurs organismes : hamster (Biradar et Rayburn 1995), moule (Steinert et al. 1998). Ainsi, l'atrazine est capable d'induire des dommages chromosomiques structuraux et numériques chez divers organismes, mais ce produit chimique ne semble pas induire de mutations.

Le **cadmium** a été découvert en 1817 et sa production industrielle remonte à 1829. Le cadmium est un sous-produit de l'extraction du zinc et accessoirement du plomb. Le bassin de Marennes-Oléron est soumis à des apports de cadmium provenant du panache de la Gironde. Le cadmium présent dans la Gironde provient de rejets d'une ancienne mine de blende (minerai permettant d'obtenir du zinc), située à Decazeville, dans l'Aveyron, à plus de 300 km en amont. Cette usine, fermée en 1986, a rejeté pendant des décennies de très grandes quantités de cadmium dans la rivière (60 kg par jour). La pollution de l'estuaire de la Gironde se produit par apports de particules contaminées, dus à l'érosion des fonds. Au contact des eaux salées, le cadmium fixé sur les particules se désorbe et passe à l'état dissous. De ce fait, dans le panache de la Gironde, ce métal est majoritairement sous cette forme biodisponible pour les êtres vivants. Les flux sont actuellement estimés de 4 à 5 tonnes par an, dont environ 500 kg pénétreraient par le jeu des courants dans le bassin de Marennes-Oléron (Miramand et al. 1999).

Une étude réalisée sur 110 espèces dans le bassin de Marennes-Oléron a montré que seules certaines espèces appartenant toutes à l'embranchement des Mollusques concentrent fortement ce métal (Miramand et al. 2000). De nombreuses études ont évalué la toxicité du cadmium, et en particulier chez les huîtres (Robert et His 1985; Amiard-Triquet et al. 1998; Gagnaire et al. 2004). De plus, le chlorure de cadmium est capable d'induire des dommages chromosomiques (Natarajan et al. 1993), mais a aussi des propriétés aneugènes (Seoane et al. 2000).

Depuis le 30 septembre 2003, l'utilisation de l'atrazine est interdite en France mais d'autres pesticides sont de plus en plus présents dans nos cours d'eau et sont donc acheminés jusqu'au milieu marin. Le **diuron** est un herbicide de la famille des urées substituées retrouvé en quantités de plus en plus importantes malgré sa limitation en France depuis 1999. C'est un produit légèrement toxique chez les mammifères et les oiseaux et modérément toxique chez les invertébrés aquatiques (Giacomazzi et Cochet 2004).

En bref

Avant cette étude, aucune recherche n'avait été effectuée sur l'influence d'un polluant sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas*. Il était donc intéressant d'étudier la possibilité d'une cause environnementale pour l'aneuploïdie chez les huîtres creuses. Nous avons choisi trois sources de pollution différentes, deux pesticides (l'atrazine et le diuron) et un métal lourd (le cadmium) afin d'évaluer leur effet sur le génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas* car ces produits chimiques étaient très présents sur le bassin de Marennes-Oléron et des propriétés génotoxiques leur étaient déjà connues.

4) Impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie

Pour évaluer l'impact de l'atrazine sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses *C. gigas*, il est impératif de travailler tout d'abord en milieu contrôlé, donc dans des conditions *in vivo*, ceci afin de contrôler différents paramètres. Dans un premier temps, nous avons exposé à l'atrazine des huîtres à différents stades de développement (publication n° 5), puis, dans un second temps, nous avons cherché à savoir, dans le cas où un effet est observé, si celui-ci pouvait persister dans le temps (même après retour dans des conditions non polluées) et entre les générations (publication n° 8). Enfin, dans un troisième temps, nous avons cherché à identifier les chromosomes manquants dans ces métaphases aneuploïdes (publication n° 11).

Impact à différents stades de développement

Des huîtres adultes et juvéniles ont été exposées à de l'atrazine dilué dans de l'eau de mer directement pompée à partir du bassin de Marennes-Oléron. La solution mère d'atrazine a été fournie par l'Institut National de la Recherche Agronomique INRA (Saint-Laurent-de-la-Prée, Charente-Maritime, France) sous la forme d'une solution commerciale : Techn'atral 50 liquide de concentration 500 g l⁻¹. De l'eau de mer provenant du bassin de Marennes-Oléron a été utilisée comme contrôle (traitement 1). Les traitements d'atrazine appliqués représentent une valeur pic retrouvée dans un environnement très pollué (10 µg l⁻¹ ; traitement 2) (Munsch 1995) et une valeur dix fois supérieure (100 µg l⁻¹ ; traitement 3). Pour chaque concentration et le contrôle, des réplicats (A et B) ont été réalisés.

Notre étude a permis de montrer un effet dose-dépendant de l'atrazine sur le taux d'aneuploïdie des huîtres creuses. Selon nos données, une corrélation positive entre les

concentrations en atrazine et le taux d'aneuploïdie a clairement été montrée (Figure 2.7). De plus, une augmentation significative du taux d'aneuploïdie a été observée à une concentration retrouvée dans des environnements très pollués ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) comparé aux témoins (sans atrazine). En parallèle, une étude immunologique a été menée et au bout de trois semaines d'exposition, aucun effet n'a été observé sur la viabilité des hémocytes, diverses activités enzymatiques, l'activité de phagocytose et le pourcentage de hyalinocytes (publication n° 4 non détaillée ici).

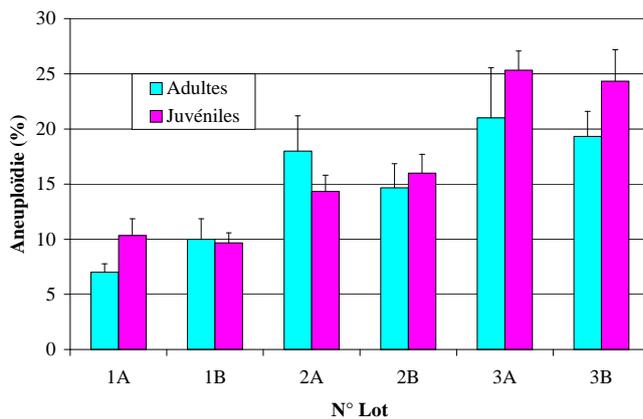


Figure 2.7. Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes et juvéniles exposées à différentes concentrations d'atrazine pendant 3 semaines: lots 1A, 1B (contrôle $0 \mu\text{g l}^{-1}$), lots 2A, 2B ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) et lots 3A, 3B ($100 \mu\text{g l}^{-1}$).

L'atrazine étant épandu pendant la période de reproduction des huîtres, nous avons également réalisé une exposition à l'atrazine pendant un élevage larvaire. Nous n'avons pas observé d'effet sur le pourcentage d'éclosion, la croissance ou la survie larvaire des larves. Il aurait été intéressant d'étudier l'aneuploïdie au stade larvaire mais le protocole mis au point à ce stade de développement ne nous permettait pas l'analyse d'un nombre suffisant de métaphases. Une taille minimale étant nécessaire pour réaliser les analyses au stade juvénile, l'exposition à l'atrazine pendant trois semaines a donc été suivie d'une période en milieu non pollué pendant six mois. De plus forts taux d'aneuploïdie ont été observés seulement pour les lots exposés à $10 \mu\text{g l}^{-1}$ d'atrazine. Nous aurions pu penser que cette concentration était une dose seuil au-delà de laquelle un impact pouvait être observé. Or, nous n'avons pas observé cette hausse du taux d'aneuploïdie pour les lots de plus forte concentration ($100 \mu\text{g l}^{-1}$). Nous pouvons suggérer que les larves exposées à la plus forte concentration d'atrazine aient été plus aneuploïdes, les plus aneuploïdes étant mortes. Ceci est une supposition étant donné qu'à l'heure actuelle, aucune relation entre mortalité et aneuploïdie n'a été établie. Il serait très intéressant de savoir si au-delà d'un certain seuil d'aneuploïdie, les animaux meurent. Il est difficile de répondre à cette question étant donné que 1) nous ne pouvons analyser que du

matériel vivant, en activité mitotique et 2) la technique étant létale, nous ne pouvons faire de suivi individuel dans le temps.

Persistence de l'effet

L'effet de l'atrazine sur l'aneuploïdie d'huîtres adultes et juvéniles ayant été démontré précédemment, il était intéressant de voir si cet effet persistait entre les générations et dans le temps. En effet, l'atrazine est retrouvé tout au long de l'année dans les zones adjacentes aux terrains agricoles et en particulier pendant la période d'épandage, donc cela peut avoir un impact négatif sur les organismes aquatiques pendant leurs périodes de reproduction. Nous avons tout d'abord étudié la descendance des huîtres adultes exposées à l'atrazine. Ensuite, nous avons transféré le reste des huîtres adultes et juvéniles dans des conditions non polluées pendant des périodes plus ou moins longues afin d'observer ou non la réversibilité du phénomène.

Dans notre étude, la présence d'atrazine dans l'environnement des parents a eu un effet sur le taux d'éclosion de leur descendance, mais pas sur la croissance larvaire.

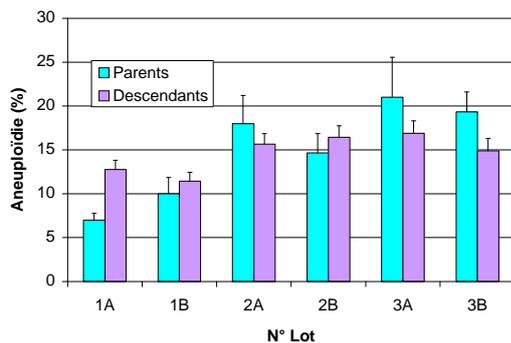


Figure 2.8. Taux d'aneuploïdie des huîtres *C. gigas* exposées à l'atrazine (parents) et de leurs descendants en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle $0 \mu\text{g l}^{-1}$), lots 2A, 2B ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) et lots 3A, 3B ($100 \mu\text{g l}^{-1}$).

Cependant, la descendance issue de parents exposés à l'atrazine a aussi montré des taux d'aneuploïdie plus élevés que la descendance issue des témoins (Figure 2.8). Ce résultat montre clairement que l'impact observé de l'atrazine sur l'aneuploïdie chez *C. gigas* persiste à la génération suivante. Deux hypothèses peuvent être suggérées : il s'agit d'un effet héréditaire induit, ou bien cet effet négatif a été transmis via les réserves maternelles pendant le développement larvaire. Nos résultats supportent l'hypothèse d'une base génétique pour le contrôle de l'aneuploïdie chez l'huître creuse. En effet, les parents provenant du lot ayant le plus fort taux d'aneuploïdie ont une descendance avec un taux d'aneuploïdie plus élevé.

Cette étude nous a aussi permis de montrer que les effets de l'atrazine persistaient après un retour dans des conditions non polluées de deux mois et demi. En effet, les taux d'aneuploïdie d'un échantillon de la population de juvéniles précédemment exposés à l'atrazine puis

transférés dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle de deux mois et demi sont restés significativement différents selon les traitements appliqués (Figure 2.9). Ce résultat pourrait indiquer que les dommages génétiques causés par l'exposition à l'atrazine sont irréversibles. Cependant, nous avons seulement laissé les huîtres juvéniles dans des conditions non polluées pendant deux mois et demi, une période plus longue dans un environnement « propre » pourrait peut-être nous montrer si la réversibilité de l'aneuploïdie augmente étant donné que les cellules sont renouvelées. Cependant, si les huîtres bioaccumulent l'atrazine mais ne possèdent pas de mécanismes de détoxification, il se pourrait que les dommages génétiques ne puissent pas être réparés même si les cellules sont renouvelées.

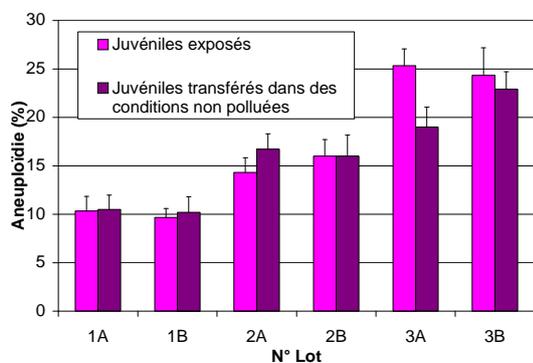


Figure 2.9. Taux d'aneuploïdie des huîtres juvéniles exposées à l'atrazine et d'un échantillon de la même population transféré dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle de deux mois et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle $0 \mu\text{g l}^{-1}$), lots 2A, 2B ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) et lots 3A, 3B ($100 \mu\text{g l}^{-1}$).

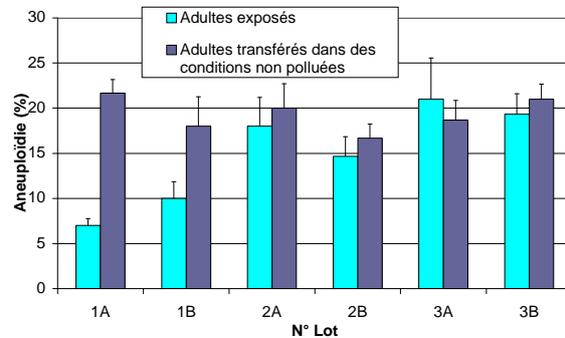


Figure 2.10. Taux d'aneuploïdie des huîtres adultes exposées à l'atrazine et d'un échantillon de la même population transféré dans des conditions non polluées pendant une période additionnelle d'un an et demi en fonction du lot : lots 1A, 1B (contrôle $0 \mu\text{g l}^{-1}$), lots 2A, 2B ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) et lots 3A, 3B ($100 \mu\text{g l}^{-1}$).

Les résultats obtenus pour les adultes apparaissent cependant différents (Figure 2.10). En effet, les taux d'aneuploïdie observés pour les lots témoins sont aussi élevés que ceux observés dans le lot ayant reçu la plus forte concentration d'atrazine et après retour dans des conditions non polluées. Ce fort taux d'aneuploïdie est-il dû à des conditions environnementales particulières? Il est difficile de statuer sur les conditions d'un environnement naturel car de nombreux polluants peuvent y être présents en quantité plus ou moins faible. Le groupe d'adultes qui avait été remis dans des conditions supposées non polluées avait par ailleurs un indice mitotique plus faible que lors de la première expérience. Cette faible activité mitotique a-t-elle pu avoir une influence sur le taux d'aneuploïdie observé ?

Identification des chromosomes manquants

Une perte préférentielle de certains chromosomes dans les cellules aneuploïdes d'huîtres *Crassostrea gigas* a déjà été montrée par (Leitao et al. 2001b) par la technique de marquage en bandes G. En effet, seulement 4 parmi les 10 paires de chromosomes de *C. gigas* (1, 5, 9 et 10 avec des pourcentages de 56, 19, 33 et 43 respectivement) sont affectées par la perte d'un des deux homologues. Nous souhaitons savoir si les mêmes chromosomes sont affectés lorsqu'un facteur environnemental précis intervient. En d'autres termes, nous voulions savoir si l'aneuploïdie agit toujours sur les mêmes chromosomes ou bien si certains facteurs agissent sur différents chromosomes cibles. Pour cela, les chromosomes manquants dans des caryotypes aneuploïdes, obtenus à partir d'une expérience où l'atrazine a induit le phénomène de l'aneuploïdie, ont été déterminés. Grâce à une collaboration franco-portugaise, ces analyses ont pu avoir lieu au Centro de Genética e Biotecnologia de l'Universidade de Trás-os-Montes et Alto Douro CGB-UTAD à Vila Real (Portugal) en utilisant la technique de marquage avec des enzymes de restriction.

L'analyse de tous les caryotypes aneuploïdes des huîtres étudiées a montré que seulement 4 des 10 paires de chromosomes (1, 5, 9 et 10) étaient affectées par la perte d'un chromosome. L'absence des deux chromosomes homologues dans une paire chromosomique n'a jamais été observée. Ainsi, une, deux ou trois paires peuvent être affectées par la perte d'un chromosome dans un caryotype (Figure 2.11). Il est intéressant de noter que la paire de chromosomes 1 a été préférentiellement perdue seule en comparaison avec les paires 9 et 10, et que la perte de chromosome 5 n'a jamais été perdue seule (Figure 2.12).

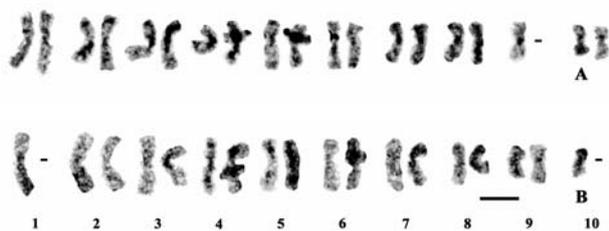


Figure 2.11. Caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III chez des huîtres contaminées indirectement par l'atrazine. (A) Perte d'un chromosome dans la paire 9. (B) Perte de deux chromosomes dans les paires 1 et 10. Echelle = 5 µm.

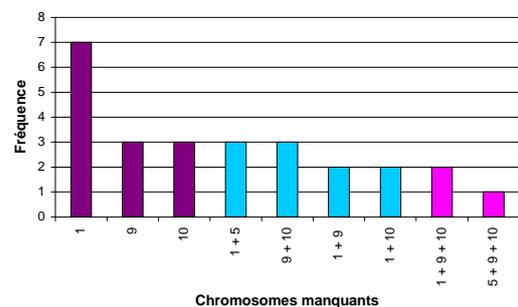


Figure 2.12. Nombre et nature de chromosomes manquants dans les 26 caryotypes aneuploïdes marqués avec l'enzyme de restriction *Hae* III réalisés à partir de la descendance d'huîtres exposées à l'atrazine.

Ce résultat est identique à celui observé par (Leitao et al. 2001b) dans un cas d'aneuploïdie « naturelle » à partir de 95 caryotypes marqués avec des bandes G. Par conséquent, aucun effet spécifique de l'atrazine sur la perte chromosomique n'a été observé. On pourrait alors envisager que les mécanismes mis en jeu soient les mêmes.

Par ailleurs, le marquage par digestion enzymatique est plus fiable que le marquage en bandes G et permet une meilleure préservation de la morphologie des chromosomes, ce qui représente un avantage supplémentaire pour l'identification des chromosomes chez les huîtres étant donné qu'il est toujours impossible de réaliser des cultures de tissus chez cette espèce.

En bref

Pour la première fois, une cause environnementale pour l'aneuploïdie chez les huîtres a pu être établie. En effet, nos études ont montré une corrélation positive entre la présence d'atrazine et le taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, à des stades juvénile et adulte. Au stade larvaire, l'étude n'a malheureusement pas pu être réalisée. De plus, l'impact de l'atrazine sur l'aneuploïdie persiste à la génération suivante, ce qui semble confirmer l'hypothèse d'une base génétique dans la détermination de ce phénomène. Après une courte période de deux mois et demi dans des conditions non polluées, les huîtres juvéniles qui avaient été exposées à l'atrazine ont continué à montrer un taux d'aneuploïdie significativement différent selon les traitements. Ainsi, l'impact observé persisterait dans le temps. Une période de « décontamination » plus longue d'un an et demi n'a malheureusement pas pu confirmer cet effet à cause d'un fort taux d'aneuploïdie retrouvé même chez les témoins. Par contre, l'atrazine n'a pas eu d'effet spécifique sur l'identité des paires de chromosomes absentes dans les cellules aneuploïdes.

De fortes quantités d'atrazine sont donc susceptibles d'influencer le taux d'aneuploïdie chez *C. gigas*, mais la concentration intermédiaire testée dans notre étude est tout de même très rare dans les environnements marins et estuariens. L'effet de l'atrazine n'est pas à négliger mais il n'est probablement pas le seul contaminant à pouvoir intervenir dans les variations du taux d'aneuploïdie rencontrées dans le milieu naturel.

Ainsi, nous avons pu montrer que cet herbicide pouvait causer des dommages génétiques importants chez l'huître creuse. Nos résultats supportent donc la législation qui a interdit l'utilisation en France de l'atrazine depuis le 30 septembre 2003.

5) Impact du cadmium sur l'aneuploïdie

Pour évaluer l'impact du cadmium sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses, nous avons réalisé le même type d'expériences qu'avec l'atrazine : nous avons exposé au cadmium des huîtres à différents stades de développement, puis nous voulions savoir si cet effet persistait à la génération suivante (publication n° 14).

Impact à différents stades de développement

Des huîtres creuses, âgées de trois ans, ont été placées en quarantaine au laboratoire IFREMER de La Tremblade en mars 2002. Des huîtres juvéniles provenant d'un croisement réalisé au sein du laboratoire fin mars 2002 ont été mises dans la salle de maturation selon les mêmes conditions que les adultes. Ces huîtres adultes et juvéniles ont été exposées à du cadmium dilué dans de l'eau de mer directement pompée à partir du bassin de Marennes-Oléron. Le chlorure de cadmium a été choisi pour réaliser cette étude car, en milieu marin, le Cd est majoritairement sous forme dissous $CdCl_2$ (Miramand et al. 2000). Une forme solide de $CdCl_2$ (Sigma) a été utilisée afin de réaliser différentes solutions de cadmium. De l'eau de mer provenant du bassin de Marennes-Oléron a été utilisée comme témoin (traitement 1). Les traitements de cadmium appliqués représentent la valeur pic retrouvée au nord du bassin de Marennes-Oléron en 1991 par Boutier et al. (2000) (50 ng l⁻¹ ; traitement 2) et une valeur dix fois supérieure (500 ng l⁻¹ ; traitement 3). Pour chaque concentration et le contrôle, des réplicats (A et B) ont été réalisés. Chaque bac contenait 70 huîtres adultes et chaque aquarium 150 huîtres juvéniles.

En ce qui concerne les huîtres adultes, certaines avaient un faible indice mitotique et il a malheureusement été impossible de compter 30 métaphases dans certains individus. Donc, tous les lots avaient un effectif de 10 huîtres analysées sauf les lots 1B (6 huîtres analysées) et 3A (8 huîtres analysées). Les pourcentages d'aneuploïdie des lots adultes exposés au cadmium sont apparus plus élevés que ceux des lots témoins (Figure 2.13).

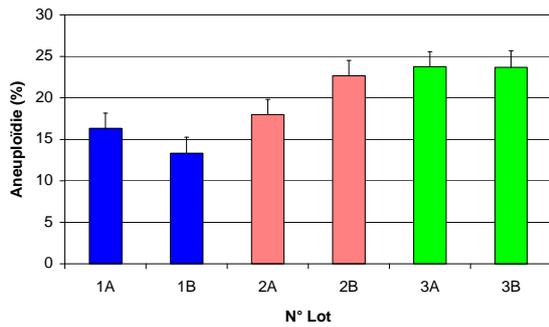


Figure 2.13. Taux d'aneuploïdie des huîtres adultes exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l⁻¹), lots 2A, 2B (50 ng l⁻¹) et lots 3A, 3B (500 ng l⁻¹).

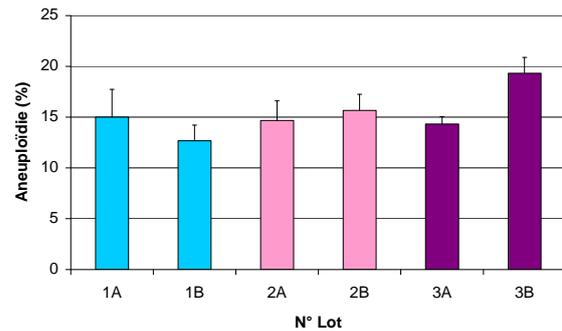


Figure 2.14. Taux d'aneuploïdie des huîtres juvéniles exposées à différentes concentrations de cadmium : lots 1A, 1B (contrôle 0 ng l⁻¹), lots 2A, 2B (50 ng l⁻¹) et lots 3A, 3B (500 ng l⁻¹).

Cependant, cet impact n'a pas été observé au stade juvénile (Figure 2.14) qui a pourtant été exposé plus longtemps au cadmium et donc où la bioaccumulation du cadmium dans les tissus était plus importante. Ce résultat contradictoire montrerait que les huîtres juvéniles sont moins sensibles au cadmium que les huîtres adultes. Généralement, c'est plutôt l'inverse qui est observé. Toutefois, de nombreux auteurs ont étudié la toxicité du cadmium chez les huîtres au stade larvaire mais n'ont observé des effets sur le développement qu'à des teneurs en cadmium plus fortes que celles étudiées. De plus, Robert et His (1985) n'ont constaté aucun effet sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* pour des teneurs en cadmium aussi élevées que 50 µg l⁻¹.

Persistence de l'effet entre générations

Pour chacun des 6 lots d'adultes, des fécondations ont été réalisées fin mai 2002. Les croisements provenant des lots 1A, 1B, 2A, 2B, 3A et 3B ont été dupliqués afin d'avoir un réplicat pour chaque lot et 12 lots ont donc été élaborés. La teneur en cadmium au sein des huîtres des 3 lots est statistiquement identique. Ce résultat est cohérent étant donné que le cadmium n'est pas bioaccumulé principalement dans la gonade mais plutôt dans la glande digestive.

Il semblerait que l'impact du cadmium sur l'aneuploïdie d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* observé chez des adultes n'ait pas persisté à la génération suivante. En effet, les taux d'aneuploïdie chez les descendants étaient en moyenne de l'ordre de 11,5% et plus faibles que ceux des parents. La non persistance de l'impact du cadmium sur la génération suivante semble confirmée par les teneurs en cadmium des descendants qui ne diffèrent pas de façon significative et qui sont plus faibles que celles des parents. Le cadmium, aux concentrations

testées, ne semblerait donc pas induire un dommage génétique transmissible d'une génération à l'autre, comme cela a été suggéré avec l'atrazine. Les mécanismes d'action de ces deux contaminants ne sont probablement pas les mêmes ou bien les sites d'accumulation différents.

En bref

Un impact du cadmium sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses n'a pu être démontré aux concentrations testées. En effet, bien qu'une augmentation du taux d'aneuploïdie chez des huîtres adultes exposées au cadmium ait été observée, ce résultat n'a pas été confirmé chez des juvéniles exposés aux mêmes concentrations pendant plus longtemps. Il aurait été intéressant de transférer les huîtres adultes exposées au cadmium en milieu non pollué afin de constater si le phénomène cytogénotoxique observé précédemment était réversible. Malheureusement, cette expérimentation n'a pas pu être réalisée à cause du taux de mortalité plus élevé qu'attendu. De plus, les descendants d'huîtres exposées au cadmium n'ont pas montré de différences significatives dans leur taux d'aneuploïdie. Ainsi, aux concentrations testées, le cadmium ne peut pas être considéré comme un contaminant influençant le taux d'aneuploïdie chez les huîtres *C. gigas*.

6) Impact du diuron sur l'aneuploïdie

Pour évaluer l'impact du diuron sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres creuses, nous avons réalisé le même type d'expériences qu'avec l'atrazine : nous avons exposé au diuron des huîtres adultes, puis nous voulions savoir si cet effet persistait à la génération suivante (publication n° 17).

Les huîtres creuses qui ont été utilisées pour cette étude étaient âgées de 3 ans. Elles ont été captées à Bonne Anse puis placées dans les parcs de Lamouroux et de Perquis-Ronce du bassin de Marennes Oléron avant d'arriver au sein de l'écloserie de l'Ifremer pour notre expérimentation. Cette population adulte d'huîtres creuses a été soumise en milieu contrôlé à différentes concentrations de diuron. Deux concentrations ont été testées : 300 ng/L qui correspondrait à la valeur pic susceptible d'être retrouvée dans le milieu littoral (les seules données existantes sont celles des analyses qui ont été effectuées par la DDASS du Morbihan et qui ont révélé une teneur maximale en diuron dans l'eau de la Vilaine à Férel (plus en amont) de 440 ng/L le 28 août 2003) ; et 3µg/L (concentration 10 fois supérieure). Six lots (trois lots différents et leurs répliques) ont été établis. Les lots 1 et 2 correspondant aux lots témoins, les lots 3 et 4 à 300 ng de diuron/L et les lots 5 et 6 à 3 µg de diuron/L. La

contamination au diuron a duré 11 semaines. Des fécondations ont été effectuées pour chacun des six lots à partir d'un pool de gamètes mâles et femelles. Le taux d'aneuploïdie de la descendance a été analysé à l'âge de 6 mois.

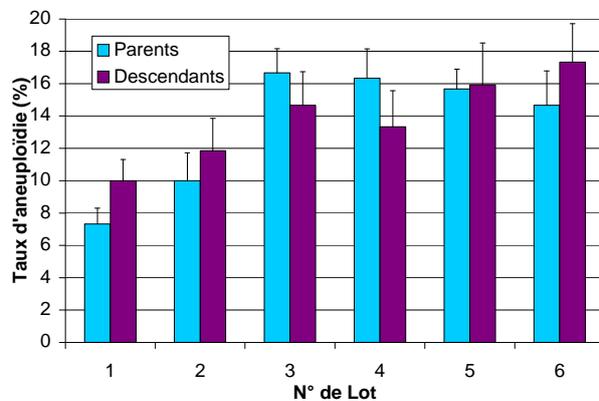


Figure 2.15. Taux d'aneuploïdie des huîtres *Crassostrea gigas* adultes exposées au diuron (parents) et de descendants de ce même lot d'animaux en fonction du lot : lots 1, 2 (témoin 0 ng/L), lots 3, 4 (300 ng/L) et lots 5, 6 (3 µg/L).

Le diuron a eu une influence sur le taux d'aneuploïdie d'huîtres *Crassostrea gigas* adultes et sur la descendance d'animaux de ce lot (Figure 2.15). En effet, une augmentation du taux d'aneuploïdie a été observée lorsque les huîtres adultes ont été exposées à différentes concentrations de diuron et aussi chez la descendance dont les parents avaient été exposés à la plus forte concentration de diuron (3 µg/L). De plus, une analyse statistique n'a pas révélé de différences significatives entre les parents et les descendants. Ce résultat montre clairement que l'impact observé du diuron sur l'aneuploïdie chez *C. gigas* persiste à la génération suivante. Le même résultat avait été observé avec l'atrazine (publication n° 8). Il semblerait donc possible que ces deux herbicides aient le même mécanisme d'action sur le génome de l'huître. Comme dans le cas de l'atrazine, deux hypothèses peuvent être suggérées pour expliquer cette persistance de l'effet observé à la génération suivante : il s'agit d'un effet héréditaire induit, ou bien cet effet négatif a été transmis via les réserves maternelles pendant le développement larvaire. Nos résultats supportent ici aussi l'hypothèse d'une base génétique pour le contrôle de l'aneuploïdie chez l'huître creuse *C. gigas* émise par Leitão et al. (2001b). En effet, les parents ayant le plus fort taux d'aneuploïdie ont une descendance avec un taux d'aneuploïdie plus élevé.

En bref

L'influence d'une pollution environnementale par les herbicides sur le taux d'aneuploïde d'huîtres creuses a été confirmée grâce à cette étude. Comme l'atrazine, le diuron peut causer des dommages génétiques importants chez l'huître à des concentrations environnementales. Les anomalies chromosomiques ont été observées comme persistant à la génération suivante.

Conclusion

L'apport majeur de notre travail a été de mettre en évidence l'effet de polluants sur le taux d'aneuploïdie des huîtres creuses mais aussi de montrer la variabilité de ce taux entre populations naturelles des grands bassins ostréicoles naisseurs français. Il aurait été intéressant d'étudier l'aneuploïdie à un stade plus précoce, en particulier au stade larvaire, afin de savoir à quel moment ce phénomène apparaît et essayer d'en cerner les mécanismes. On a vu en effet que certains polluants entraînent le même type de réponse et que les chromosomes manquants sont toujours les mêmes. L'impossibilité actuelle de réaliser l'analyse de comptage chromosomique sur un même individu dans le temps ne nous permet pas de savoir si nous sommes en présence d'un phénomène instantané ou durable. Les huîtres les plus aneuploïdes meurent-elles ou bien sont-elles conservées dans une population ? Dans quelle mesure participent-elles à la génération suivante ? Cette question mériterait également des analyses plus poussées sur les gamètes et les embryons que nous ne sommes pas en mesure de réaliser. Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces travaux confirme que l'aneuploïdie n'est pas un artéfact dû à une mauvaise qualité des métaphases observées comme suggéré par Gong et al. (2004). Ce critère, très descriptif, peut cependant être utilisé comme un indicateur de la santé des populations d'huîtres creuses, avec un intérêt ostréicole non négligeable puisque que le taux d'aneuploïdie est négativement corrélé à la croissance. Pour aller plus loin, nous avons clairement besoin de techniques moins laborieuses, permettant d'identifier rapidement et facilement les chromosomes et donc de pouvoir étudier plusieurs fois un même individu, plusieurs tissus et de nombreux individus. Les outils moléculaires en développement actuellement auront à faire leur preuve dans ce domaine.

Tableau 3.1. Schémas et marqueurs utilisés pour les cartes préliminaires de coquillages.

Espèce	Marqueurs	Schéma	Référence
<i>Penaeus japonicus</i> Kuruma prawn (n=43)	246 AFLP	Une famille de pleins frères (41).	Moore et al. 1999
	401 AFLP	Une famille F2	Li et al. 2003
<i>Penaeus monodon</i> Black tiger shrimp(n=44)	673 AFLP(116 en commun)	Trois familles de pleins-frères	Wilson et al. 2002
<i>Penaeus chinensis</i> Chinese shrimp (n=44)	501 AFLP	Une famille de pleins-frères	Li et al. 2006
<i>Penaeus vannamei</i> White shrimp (n=44)	741 AFLP	Une famille de pleins-frères (42)	Perez-Rostro et Ibarra 2003
<i>Haliotis discus hannai</i> Ino Pacific Abalone (2n=36)	Mâle : 135 AFLP Femelle : 230 AFLP 5 RAPD, 6 microsatellites	Une famille de pleins-frères (86)	Liu et al. 2006
<i>Strongylocentrotus</i> Sea urchin (n=21)	897 AFLP (446 mâle, 451 femelle)	Une famille F1 interspécifique	Zhou et al. 2006
<i>Crassostrea virginica</i> Eastern oyster (n=10)	Mâle : 153 AFLP, 2 EST, 3 microsatellites Femelle : 129 AFLP, 1 EST, 3 microsatellites	Une famille de pleins-frères (86)	Yu and Guo 2003
<i>Crassostrea gigas</i> Pacific oyster (n=10)	115 microsatellites	Trois familles: double hybrides	Hubert et Hedgecock 2004
	349 AFLPs	Une famille Backcross (73)	Li and Guo 2004
<i>Chlamys farreri</i> Zhikong scallop (n=19)	783 AFLP	Une famille de pleins-frères (51)	Wang et al. 2004
	667 AFLP	Une famille de pleins-frères (93)	Li et al. 2005
	603 AFLP	Une famille de pleins-frères (60)	Wang et al. 2005

CHAPITRE 3 – DEVELOPPEMENT DE CARTES GENETIQUES

1) Les cartes génétiques chez les coquillages

Une carte génétique consiste en une représentation de l'arrangement de marqueurs sur des groupes de liaisons, en se basant sur des fréquences de recombinaisons obtenues à partir de matériel ségrégeant à ces marqueurs. Afin de réaliser des cartes génétiques, différents types de matériels ségrégeants peuvent être produits. Les schémas les plus classiques utilisent des descendance de type F2 ou « back-cross ». Cependant ces schémas sous-entendent en théorie l'utilisation de lignées fixées pour au moins un caractère permettant ainsi une ségrégation maximale lors de la recherche de QTLs, ce qui est souvent très difficile à obtenir. Lorsque l'on ne dispose pas de telles lignées ou que l'on travaille avec des populations naturelles, on peut réaliser des familles biparentales à partir d'individus de ces populations. Dans ce cas, dans chaque famille, chaque paire de loci ségrégeant représente soit une F2 (lorsque les deux parents sont hétérozygotes pour cette paire) soit un backcross (si l'un des parents est hétérozygote et l'autre homozygote). Cette stratégie a déjà été utilisée dans plusieurs études chez des poissons et des coquillages et en particulier chez l'huître creuse (Hubert et Hedgecock 2004; Li et Guo 2004). De façon plus générale l'analyse de familles de pleins-frères est réalisée assez classiquement chez les coquillages (Tableau 3.1).

Chez les moules, il n'existe de pas de cartes génétiques mais chez les huîtres, une carte AFLP a été établie chez *Crassostrea virginica* (Yu et Guo 2003) et une carte microsatellites (Hubert et Hedgecock 2004) et une carte AFLPs (Li et Guo 2004) chez *Crassostrea gigas*. Si les microsatellites ont été très souvent utilisés en particulier chez des espèces de poissons, ce sont surtout les AFLPs qui ont permis de réaliser les premières cartes génétiques chez plusieurs espèces de coquillages d'intérêt aquacole (Tableau 3.1). En effet, même s'ils ont l'avantage d'être codominants et très polymorphes, les microsatellites sont coûteux à développer. Les AFLPs (Figure 3.1) sont quant à eux faciles à obtenir en grand nombre pour un coût beaucoup plus faible mais ont l'inconvénient d'être dominants. L'ADN est tout d'abord digéré par deux enzymes de restriction (*MseI* et *EcoRI* dans notre cas, qui sont aussi les plus fréquemment utilisées). Puis des adaptateurs sont liés à ces fragments, les séquences nucléotidiques complémentaires de ces adaptateurs servant d'amorces à la première étape d'amplification PCR. Cette amplification est présélective grâce à l'ajout d'une base en 3' des amorces, permettant de diminuer le nombre de bandes amplifiées. La seconde amplification est dite

	Eco+CAG FAM (blue)	Eco+ACG HEX (green)	Eco+AAC FAM (blue)	Eco+ACA NED (yellow)	Eco+ACT NED (yellow)
Mse+CGA	A1	B1	C1	D1	E1
Mse+CAA	A2	B2	C2	D2	E2
Mse+CTG	A3	B3	C3	D3	E3
Mse+CAT	A4	B4	C4	D4	E4
Mse+CTT	A5	B5	C5	D5	E5
Mse+ATC	A6	B6	C6	D6	E6
Mse+AGT	A7	B7	C7	D7	E7
Mse+CTC	A8	B8	C8	D8	E8
Mse+CTA	A9	B9	C9	D9	E9
Mse+CAC	A10	B10	C10	D10	E10
Mse+CAG	A11	B11	C11	D11	E11
Mse+CCT	A12	B12	C12	D12	E12

Tableau 3.2. Combinaisons des paires d'amorces utilisées lors de la PCR sélective pour la génération de marqueurs AFLPs.

sélective avec l'ajout de trois bases supplémentaires au niveau d'une des amorces afin de n'amplifier à nouveau que les fragments complémentaires. C'est à ce moment que l'on peut choisir le jeu de paires d'amorces qui va être utilisé pour l'étude (Tableau 3.2). Dans nos études, les 60 paires ont été utilisées chez l'huître et 36 (les deux premières colonnes et la dernière) chez la moule. Une amorce est marquée et les fragments observés après électrophorèse à travers des gels de polyacrylamide dénaturés ou bien des capillaires.

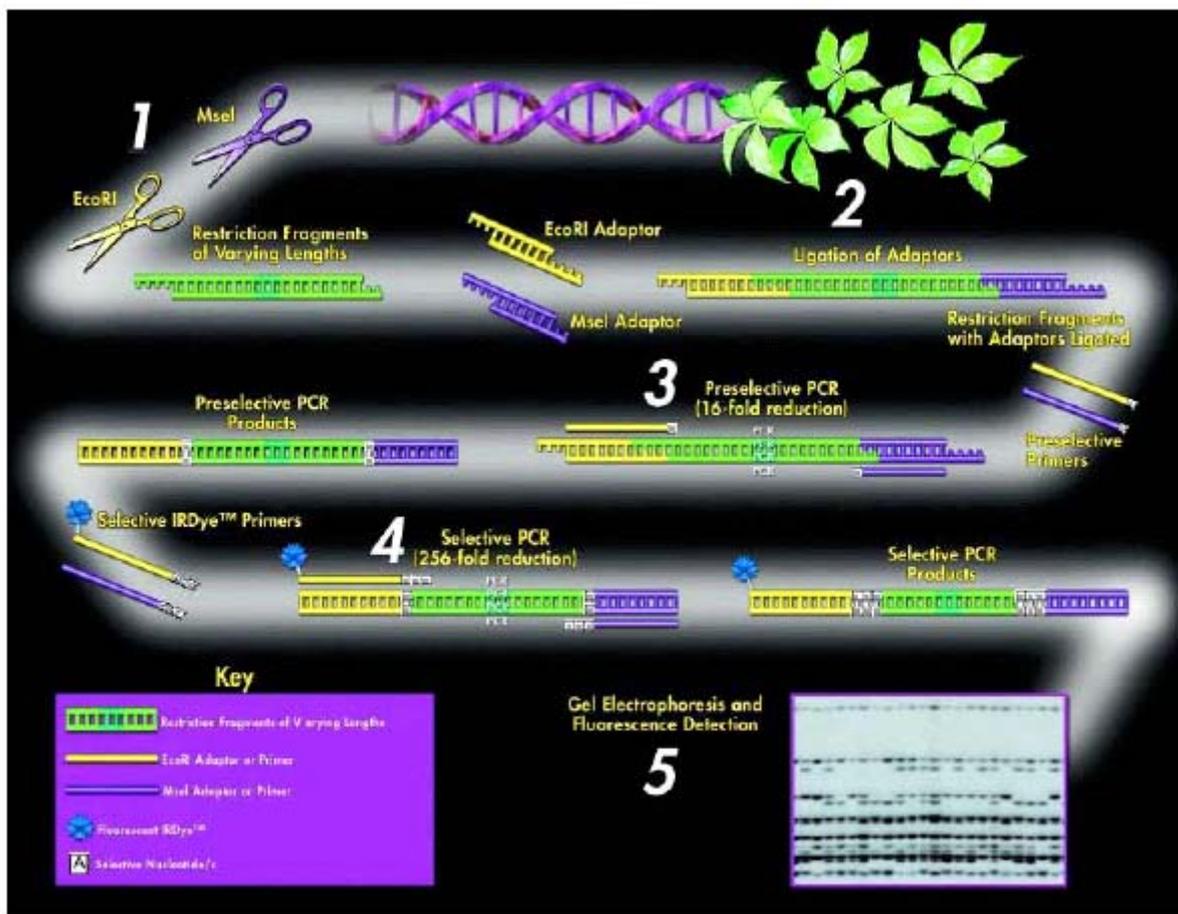


Figure 3.1. Méthodologie de la production de marqueurs AFLP (<http://www.licor.com/bio/SAGAMX/AFLP12.jsp>)

Les SNPs, en particulier caractérisés dans des ESTs, n'ont été jusqu'ici que très peu utilisés mais ils devraient rapidement participer eux aussi à la construction des cartes génétiques étant donné le nombre croissant de séquences d'ESTs disponibles dans les bases de données. Comme très peu de marqueurs microsatellites étaient disponibles chez la moule bleue et l'huître plate, nous avons choisi de développer des marqueurs AFLPs. En ce qui concerne l'huître creuse, notre objectif était à la fois d'augmenter la densité des cartes existantes et par ailleurs de cartographier des gènes d'intérêt en physiologie et pathologie de l'huître. C'est

pour cela que nous avons choisi de cartographier des SNPs déterminés dans des ESTs séquencés avec les marqueurs microsatellites existants.

En bref

Malgré leur importance économique, les travaux de cartographies génétiques restent encore peu nombreux chez les coquillages et plus particulièrement les huîtres, en comparaison avec les poissons. Cependant, les premières cartes et QTLs sur les mollusques ont vu le jour ces dix dernières années. Etant donné le peu de marqueurs disponibles chez les moules et les huîtres plates (de nombreux marqueurs microsatellites sont disponibles chez l'huître creuse), nous avons choisi de développer des marqueurs AFLPs faciles à obtenir en grand nombre pour un coût relativement faible, malgré l'inconvénient de leur caractère dominant. Ce sont des marqueurs de type SNPs que nous avons choisi de développer chez l'huître creuse à partir d'ESTs maintenant disponibles. Nous avons opté pour l'utilisation de descendance de type F2, ceci étant permis par le temps de génération rapide de ces animaux et leur fécondité importante. Même si nous ne disposons pas de lignées fixées ou haploïdes, des animaux issus de gynogenèse artificielle ont déjà été obtenus chez l'huître creuse (Guo et al. 1993) permettant d'imaginer la production d'un tel matériel haploïde à des fins de cartographie. Des animaux issus de gynogenèse méiotique permettraient en particulier de cartographier les centromères.

2) La production du matériel ségrégeant

Comme les projets concernant l'huître plate et l'huître creuse intégraient une recherche de QTLs, nous avons utilisé la stratégie classique de croisements de type F2, soit l'utilisation de trois générations : grand-parents (F0) différents pour le caractère d'intérêt, parents (F1) puis descendance (F2) par des croisements biparentaux entre frères et sœurs. Ainsi, il s'agissait de réaliser la cartographie génétique sur les familles servant à la recherche de QTLs. Dans le cas de la moule, notre objectif était de réaliser « seulement » une carte génétique, aussi nous avons préféré l'approche en famille de pleins-frères permettant de réaliser le panel à génotyper en une seule génération de reproduction.

Famille F1 de moules

Plusieurs familles (13) de pleins-frères de moules ont été produites en 2004 à l'Université de Bangor (Pays-de-Galles) avec qui nous avons collaboré dans le cadre de ce projet « AAAG », toujours dans le cadre de la thèse de Delphine Lallias qui a passé un tiers de son temps dans ce laboratoire. Les gamètes ont été émis de façon séparée (Figure 3.2) et mélangés ensuite pour les croisements biparentaux. Parmi les 13 familles produites, 4 ont survécu et ont été transférées à l'écloserie expérimentale de La Tremblade. Parmi celles-ci, une a été choisie sur la base du nombre important d'individus produits. Il est cependant à noter que parmi les 92 individus choisis au hasard dans cette famille pour la réalisation de la carte, 6 ont dû être écartés car ils présentaient des profils AFLPs incompatibles avec ceux de leurs parents supposés, mettant en évidence une probable contamination avec l'un des autres lots produits.

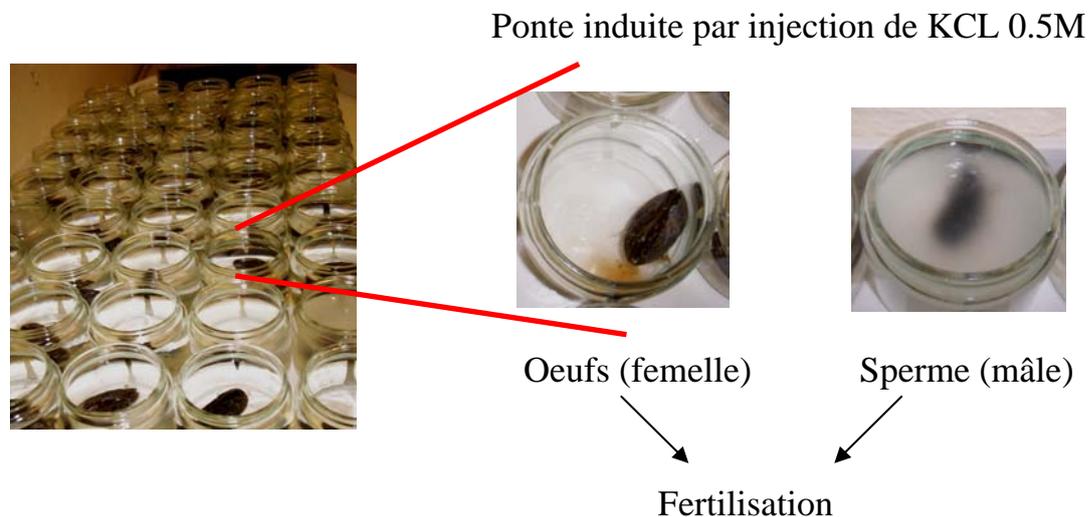


Figure 3.2. Obtention de la famille de pleins-frères de moules pour la cartographie

Familles F2-L chez l'huître plate

Chez l'huître plate, qui est une espèce incubante, la production de familles de pleins-frères est plus complexe. Notre technique consiste à faire mûrir les huîtres par couple dans des aquariums puis à récupérer les pontes dans des tamis (Figure 3.3).

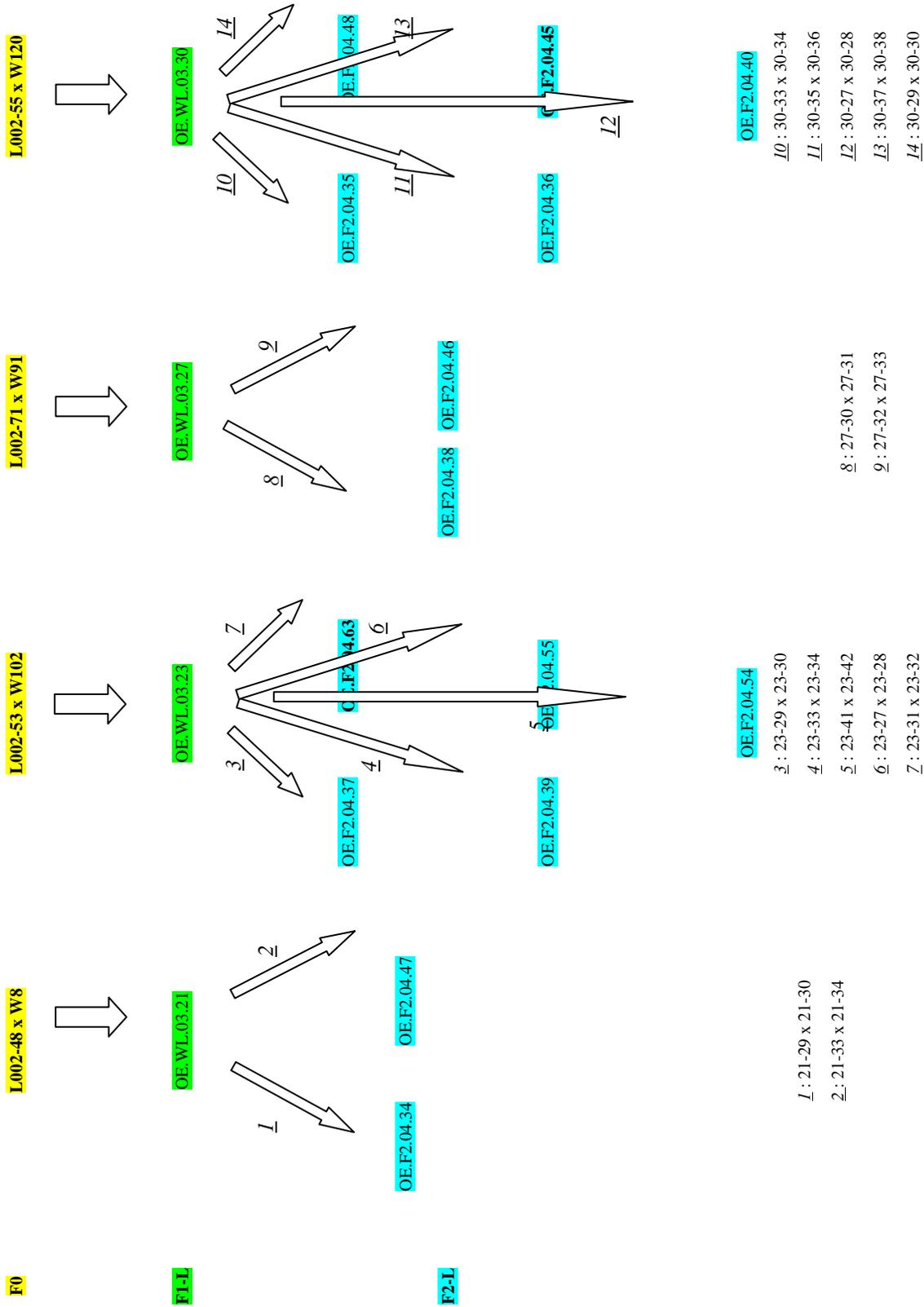


Figure 3.5. Production des familles ségrégeantes F2-L.

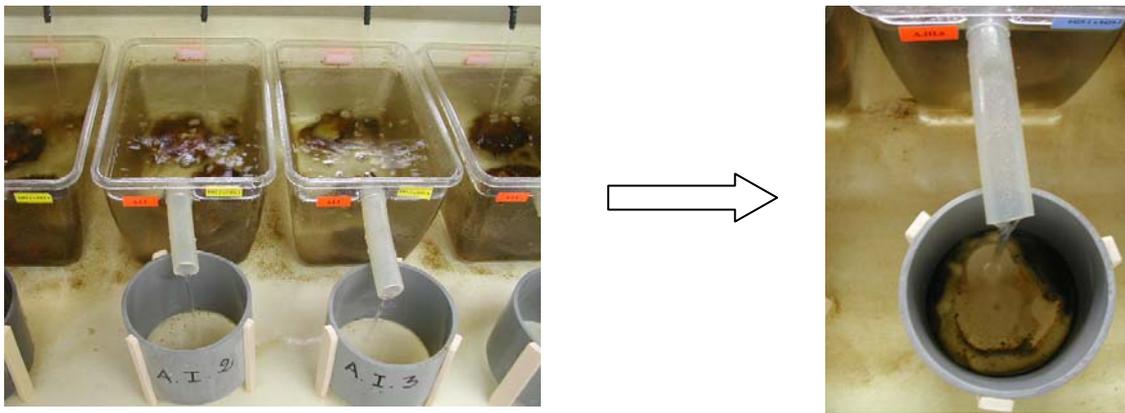


Figure 3.3. Obtention de familles de pleins-frères d'huîtres plates.

Plusieurs types de familles F2 ont été produits, selon les grands-parents utilisés dans les croisements initiaux pour produire les familles F1. Le premier type correspond à des familles F1-L obtenues à partir du croisement d'un individu sauvage et d'un individu issu d'une famille d'animaux consanguins du programme de sélection pour la résistance à la bonamiose (Figure 3.4). Cette famille Oe1-5-2-3-1 consanguine de cinquième génération (croisements frères-sœurs) s'est distinguée par son absence de mortalité aussi bien sur estran qu'en éclosure, malgré d'importantes mortalités survenues chez les autres familles et les animaux sauvages. La génération initiale de cette famille consanguine (famille 89i) correspond à une famille sélectionnée après inoculation du parasite en 1989.

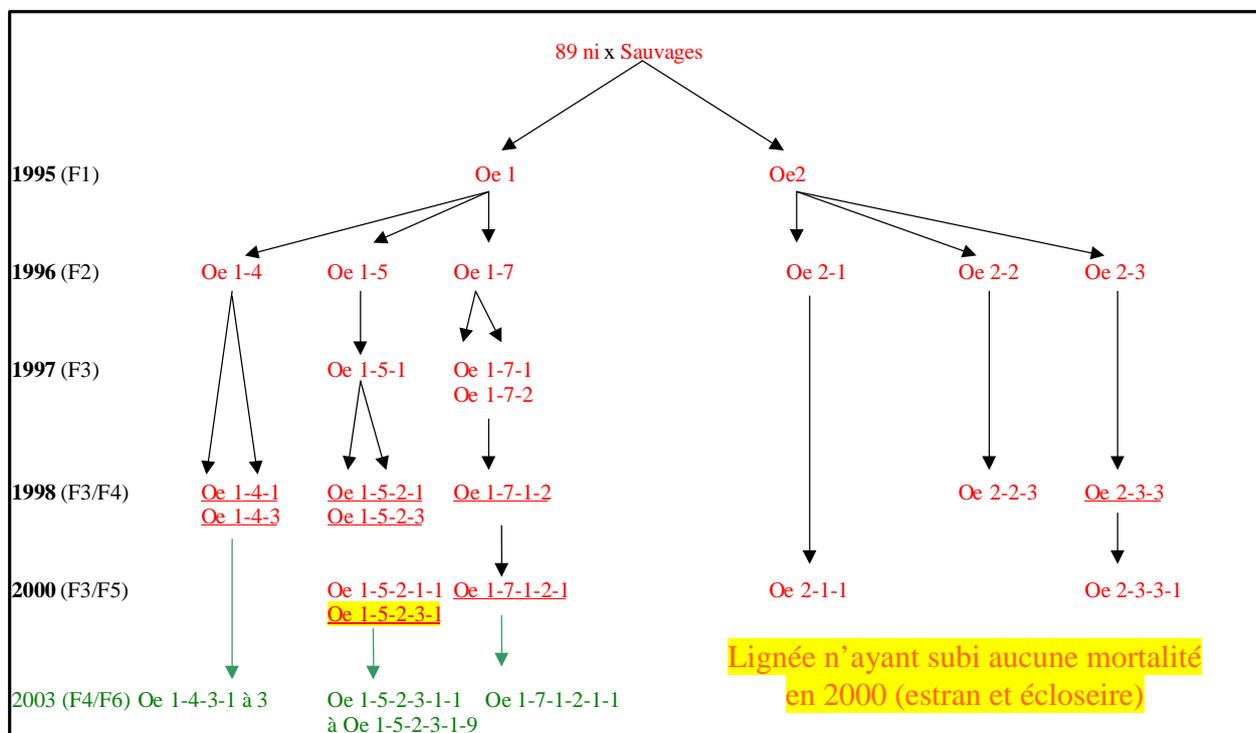


Figure 3.4. Généalogie des lignées consanguines issues du programme de sélection pour la résistance à la bonamiose.

Ainsi, 4 familles F1-L produites en 2003 ont permis de produire 14 familles F2-L (Figure 3.5). Le choix de la famille F2 d'huîtres utilisée pour la cartographie génétique a été basé sur le polymorphisme présent dans ces familles aux marqueurs utilisés ainsi que la quantité d'ADN extrait des individus à génotyper. Ainsi, tout d'abord, les 8 grands-parents F0 ont été génotypés avec 20 microsatellites et 60 paires d'amorces AFLPs, ce qui a permis d'identifier des marqueurs microsatellites (1) pleinement informatifs (FI), pour lesquels aucun allèle n'est en commun pour un couple de grands-parents et chacun de ces deux grands-parents est hétérozygote, (2) semi-informatifs (SI) lorsqu'un allèle est commun ou lorsque un grand-parent est hétérozygote et l'autre homozygote pour un troisième allèle, (3) non informatifs (NI) lorsque les deux grands-parents ont le même génotype.

Pour les marqueurs AFLPs, nous avons compté le nombre de marqueurs polymorphes pour chaque couple de grands-parents. Ainsi, les familles F1 les plus polymorphes ont été choisies comme étant celles ayant le plus grand nombre de marqueurs microsatellites pleinement informatifs et le maximum de marqueurs AFLPs polymorphes. La seconde étape a consisté dans le choix des familles F2. Les parents F1 des familles choisies précédemment ont ainsi été génotypés avec les 20 marqueurs microsatellites et les familles F2 ont été choisies sur la base du polymorphisme des marqueurs microsatellites des parents. Deux familles F2-L ont été retenues, OE.F2.04.36 et OE.F2.04.45 avec un léger avantage pour la famille OE.F2.04.36.

Cependant, à la fin septembre 2004, l'évaluation des stocks disponibles ont montré qu'une forte mortalité était survenue pour la famille OE.F2.04.36, seulement 2 poches de respectivement 231 et 257 huîtres étant encore disponibles. C'est donc la famille OE.F2.04.45 qui a été choisie et pour laquelle 1000 huîtres ont été échantillonnées au hasard. Cependant après analyse de parenté, il s'est avéré que cette famille était issue d'autofécondation, phénomène pour la première fois démontré de façon certaine. Nous avons donc choisi une seconde famille F2-L, OE.F2.04.63, d'après les critères précédemment décrits, tout en gardant la famille issue d'autofécondation OE.F2.04.45, afin de déterminer l'impact de l'autofécondation dans la construction de notre carte génétique.

En bref

Que ce soit pour la moule ou l'huître plate, il est à noter que la production de matériel adéquat est a priori relativement facilement réalisable étant donné la forte fécondité de ces espèces mais que la réalisation des croisements et la gestion des familles produites sont rendues difficiles par le caractère incubant de l'huître plate (production involontaire d'une famille issue d'autofécondation prouvée pour la première fois !) et la maîtrise encore aléatoire de la reproduction en écloserie de ces espèces. Des projets sont actuellement en cours pour tenter d'améliorer cela en particulier pour l'huître plate car il s'agit d'un passage obligatoire dont la maîtrise est nécessaire si l'on souhaite pouvoir s'orienter vers un programme de sélection fiable à l'échelle professionnelle.

3) La cartographie génétique de la moule bleue *M. edulis*

Ce travail a donné lieu à la publication n° 20.

Trente six paires d'amorces ont été utilisées pour génotyper les 86 individus F1 de cette famille, ainsi que les deux parents F0. Un total de 2354 marqueurs AFLPs ont été générés parmi lesquels 791 se sont avérés polymorphes, soit 34%. Les marqueurs ségrègent à travers le parent femelle (341 de type 1:1), le parent mâle (296 de type 1:1) ou les deux (154 de type 3:1).

Les marqueurs montrant de la distorsion de ségrégation ont été éliminés de l'analyse, soit 30% environ. La distorsion de ségrégation (vers un déficit en homozygotes) peut être expliquée par des artefacts techniques mais surtout par un lien de ces marqueurs avec des gènes délétères récessifs qui causent des mortalités liées au génotype. Ce fort fardeau génétique chez les bivalves a déjà été mis en évidence dans plusieurs études (Bierne et al. 1998), (Launey et Hedgecock 2001), et est en accord avec le modèle « Orme-huître » de (Williams 1975) qui indique que chez espèces à forte fécondité mais forte mortalité lors des jeunes stades de développement peuvent se rencontrer des corrélations entre des caractères liés à la valeur sélective et l'hétérozygotie des marqueurs moléculaires, comme déjà observé chez les moules (Beaumont et al. 1995) et d'autres bivalves (Alvarez et al. 1989; David et al. 1995; Bierne et al. 1998; Launey et Hedgecock 2001).

Le niveau de distorsion de ségrégation observé dans cette étude est similaire à ceux rencontrés pour l'huître creuse *C. gigas* dans plusieurs études : 31% (McGoldrick et Hedgecock 1997), 21% (Launey et Hedgecock 2001), 27% (Li et Guo 2004). Ce phénomène a été observé

Linkage group	Length (cM)	No. of framework markers	No. of associated markers	Average spacing (cM)	Largest interval (cM)
G1F	101.5	15	23	7.25	27.8
G2F	101.3	11	12	10.13	32.9
G3F	83.3	10	13	9.25	21.9
G4F	76.0	10	5	8.40	28.3
G5F	75.2	10	8	8.35	31.0
G6F	69.9	7	3	11.65	26.7
G7F	66.7	9	5	8.34	28.9
G8F	65.8	8	4	9.40	22.3
G9F	61.6	9	11	7.7	22.5
G10F	61.3	16	11	4.09	14.3
G11F	60.2	10	11	6.69	25.4
G12F	19.5	2	0	19.5	19.5
G13F	11.0	2	5	11.0	11.0
G14F	9.5	2	4	9.5	9.5
Total	862.8	121	115	8.06	32.9

Tableau 3.3. Caractéristiques des groupes de liaison de la carte femelle chez la moule.

Linkage group	Length (cM)	No. of framework markers	No. of associated markers	Average spacing (cM)	Largest interval (cM)
G1M	86.5	13	9	7.21	37.6
G2M	84.9	10	10	9.43	22.1
G3M	79.5	7	14	13.25	30.8
G4M	77.8	8	3	11.11	23.7
G5M	74.9	10	5	8.32	35.2
G6M	61.6	5	10	15.4	23.9
G7M	61.2	6	5	12.24	24.1
G8M	60.2	20	7	3.17	16.9
G9M	57.6	7	5	9.6	12.9
G10M	57.0	8	5	8.14	25.2
G11M	53.0	5	5	13.25	20.4
G12M	26.4	5	1	6.6	16.0
G13M	24.3	9	7	3.08	8.2
G14M	20.3	3	2	10.15	11.5
Total	825.2	116	88	8.09	37.6

Tableau 3.4. Caractéristiques des groupes de liaison de la carte mâle chez la moule.

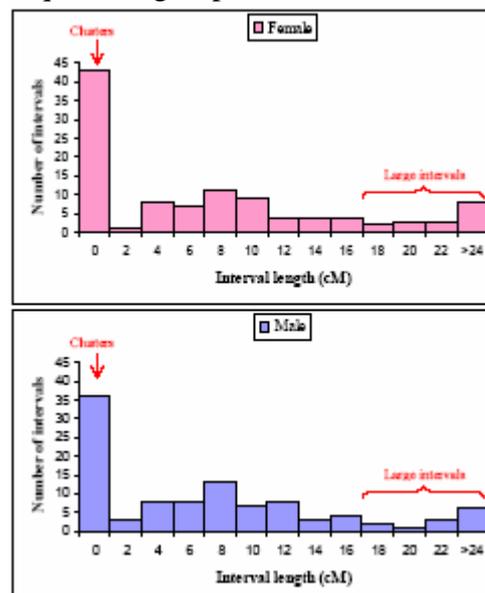


Figure 3.6. Distribution des tailles d'intervalle entre marqueurs adjacents.

également chez des poissons et des plantes et avec différents types de marqueurs. Ces observations parallèles supportent l'idée d'une origine biologique comme explication principale de la distorsion de ségrégation, c'est-à-dire un lourd fardeau génétique se manifestant par une sélection contre les génotypes homozygotes aux marqueurs liés à des gènes récessifs délétères. Afin d'éviter que ce phénomène ne trouble l'analyse de liaison faite lors de la construction des cartes, basée entièrement sur l'écart à la ségrégation Mendélienne, nous avons choisi de ne pas inclure les marqueurs « distordus » dans ces analyses. Il reste alors possible de les inclure a posteriori. Une façon de limiter ce phénomène est de génotyper les descendants à un stade très jeune (larves de quelques heures) comme réalisé par (Hubert et Hedgecock 2004) ce qui entraîne cependant des limitations en terme de nombre de marqueurs utilisés étant donné la faible quantité d'ADN extrait.

Des cartes spécifiques de chaque parent ont pu être construites. Pour la carte femelle, parmi les 243 marqueurs ségrégeants, seulement 121 marqueurs ont pu être positionnés de façon relative grâce au logiciel Mapmaker 3.0, 7 marqueurs n'ayant pu être liés, et 115 autres, seulement en tant que marqueurs associés. Quatorze groupes de liaison couvrant 863 cM ont été construits, comprenant de 2 à 16 marqueurs, avec une distance moyenne entre marqueurs de 8 cM (Tableau 3.3). Pour la carte mâle, parmi les 210 marqueurs ségrégeants, seulement 116 marqueurs ont pu être positionnés de façon relative, 6 marqueurs n'ayant pu être liés, et 88 autres, seulement en tant que marqueurs associés. Egalement quatorze groupes de liaison couvrant 825 cM ont été construits, comprenant de 3 à 20 marqueurs, avec une distance moyenne entre marqueurs de 8 cM (Tableau 3.4). En considérant tous les marqueurs, la longueur estimée du génome a été estimée à 1006 cM pour la carte femelle et 1087 cM pour la carte mâle soit un pourcentage de couverture de 86% pour les deux cartes.

Bien que préliminaires, ces deux cartes offrent une bonne représentation du génome de la moule bleue car :

- (1) Les deux cartes contiennent 14 groupes de liaison, ce qui correspond au nombre haploïde de chromosomes de cette espèce (Thiriot-Quévieux 1984).
- (2) La longueur totale des cartes est similaire à la longueur théorique en se basant sur 1.0 – 1.3 crossing over par chromosome.
- (3) Les ratios plus long : plus court groupe de liaison sont respectivement de 10.1 :1 et 4.3 :1 chez la femelle et le mâle. Ils sont plus importants que les ratios calculés à partir des données cytologiques (longueur du chromosome 1 : longueur du chromosome 14)

indiquant que des zones restent à couvrir. Cependant, ils sont du même ordre de grandeur que ceux calculés chez l'huître creuse (Hubert et Hedgecock 2004).

- (4) La couverture du génome estimée est relativement bonne avec 76% et 86% avec les marqueurs associés, du même ordre de grandeur que celles estimées pour *C. gigas* : 70-79% (Hubert et Hedgecock 2004) ou 81-92% (Li et Guo 2004) ; et pour *C. virginica* (Yu et Guo 2003). De plus, seulement 3% des marqueurs ne sont pas liés à d'autres marqueurs dans les deux cartes.

Il a été observé une distribution aléatoire de marqueurs générés par les trois types d'amorces (Eco+CAG, Eco+ACG et Eco+ACT) sur les 14 groupes de liaisons aussi bien de la carte femelle que mâle. Cependant, la distribution des tailles d'intervalles entre marqueurs adjacents a mis en évidence un nombre important de clusters, 43 pour la femelle et 36 pour le mâle. D'autre part, des zones restent à remplir car respectivement 16 et 12 intervalles chez la femelle et le mâle font plus de 18 cM. D'après la figure 3.6, la classe d'intervalles de longueur entre marqueurs adjacents la plus abondante est celle de 8 cM, ce qui correspond à l'intervalle moyen.

Si globalement les marqueurs AFLPs sont distribués au hasard dans les génomes des deux animaux étudiés, il apparaît cependant que le regroupement de marqueurs AFLPs est plus important sur la carte mâle que femelle, comme l'indique le coefficient de corrélation de Spearman entre longueur génétique et nombre de marqueurs par groupe significatif chez la femelle mais pas chez le mâle. Ceci a été confirmé par la comparaison des distributions de marqueurs AFLPs pour des intervalles de 20 cM chez le mâle et la femelle (test de χ^2 sur une distribution de Poisson) pour lesquels le mâle a montré en particulier 3 intervalles de 20 cM contenant chacun 8 marqueurs et un groupe de liaison (G8M) contenant 6 clusters. Ce phénomène de regroupement de marqueurs AFLPs est assez courant et a été observé dans plusieurs cartes construites à partir de tels marqueurs chez le maïs (Castiglioni et al. 1999), la truite arc-en-ciel (Young et al. 1998), le tilapia (Agresti et al. 2000) ou le poisson chat (Liu et al. 2003). Ce phénomène peut résulter de la distribution non aléatoire des sites des enzymes de restriction à travers le génome, et donc indirectement du choix des enzymes de restriction utilisées.

Contrairement aux études sur les huîtres, le regroupement d'AFLPs chez la moule semble se produire davantage vers les régions centromériques que les régions télomériques. Ceci est particulièrement observable pour les groupes G1M (Figure 3.9), G3M ou G10M. Comme les chromosomes de *M. edulis* sont presque métacentriques ou submétacentriques (Thiriott-Quévieux 1984; Insua et al. 1994), ce regroupement pourrait ainsi correspondre à des

recombinations ou des suppressions au niveau des centromères, associées avec de l'hétérochromatine.

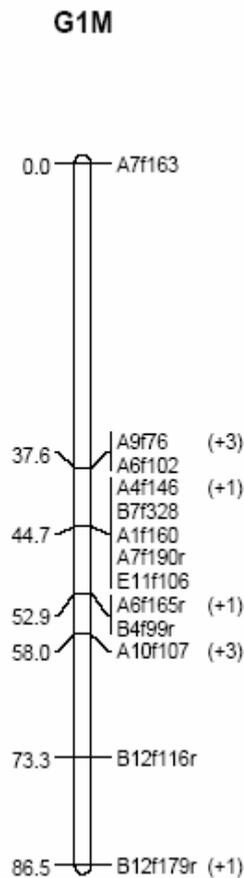


Figure 3.7. Exemple de cluster de marqueurs AFLPs chez le groupe G1M du mâle.

Une carte consensus a pu être établie en utilisant le logiciel JoinMap (exemple figure 3.8). Douze groupes homologues ont été identifiés, et il a été possible de construire une carte consensus pour 9 d'entre eux grâce à l'utilisation de marqueurs ségrégeants chez les deux parents. Le nombre de comparaisons par paire s'est avéré trop faible pour pouvoir déterminer une différence potentielle pour la fréquence de recombinaisons entre les deux sexes.

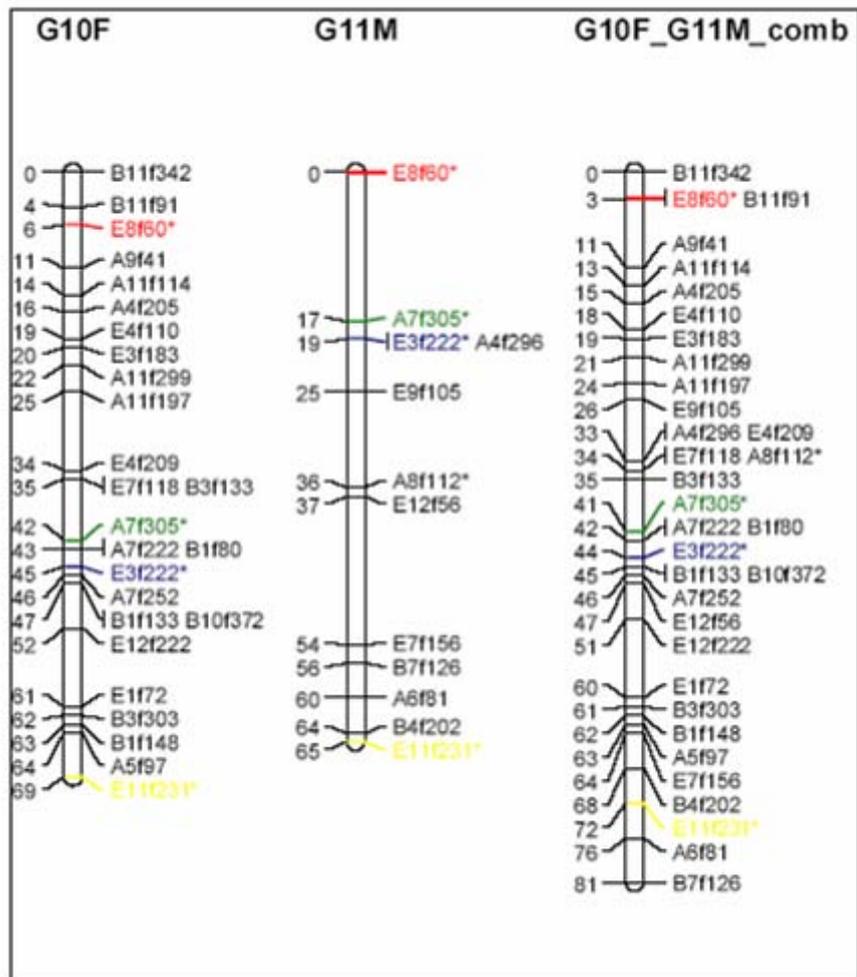


Figure 3.8. Exemple de consensus entre les groupes de liaison 1 de la femelle et 5 du mâle, construit grâce aux marqueurs communs indiqués en couleurs.

En bref

La construction de cette carte génétique a permis de mettre en évidence le fait que, malgré un nombre relativement faible d'individus F1 génotypés, les marqueurs AFLPs obtenus en grand nombre forment une base suffisante pour une carte de bonne résolution chez la moule bleue. Cependant, si la répétabilité et le transfert entre laboratoires des marqueurs AFLPs ne posent pas de problèmes, le transfert de tels marqueurs entre différentes familles utilisées pour réaliser des cartes génétiques reste à tester. La distorsion de ségrégation apparaît comme un phénomène courant chez les bivalves et se retrouve chez les marqueurs utilisés lors de la construction de cette carte. Ce phénomène traduit la présence d'un lourd fardeau génétique chez ces espèces qui se manifeste par une sélection contre les génotypes homozygotes aux marqueurs liés à des gènes récessifs délétères. La distribution de ces marqueurs distordus peut aider à comprendre la distribution des gènes délétères récessifs dans le génome, comme étudié chez l'huître creuse (Yu et Guo 2003), (Li et Guo 2004) ou la truite arc-en-ciel (Young et al. 1998) pour lesquelles des régions de groupes de liaison contiennent des blocs de marqueurs distordus qui peuvent être liés à des gènes sub-létaux. Comme chez d'autres espèces de coquillages, poissons ou plantes, de larges intervalles ont été observés dans nos deux cartes. Ceci peut être dû au fait que nous sommes en présence de cartes préliminaires de moyenne densité ou bien que ces régions constituent des zones de recombinaison importantes dans le génome. L'ajout de marqueurs permettra de trancher vers l'une ou l'autre hypothèse. L'ajout de marqueurs codominants qui est cours actuellement permettra également de conforter la carte consensus et d'analyser les différences potentielles de fréquence de recombinaison entre les sexes.

4) La cartographie génétique de l'huître plate *O. edulis*

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Chris Haley de l'Institut Roslin de Grande Bretagne et a donné lieu à la publication n° 22.

Soixante paires d'amorces AFLPs et 20 microsatellites ont été utilisés pour génotyper 48 individus F2 de la famille OE.F2.04.45, l'unique parent F1 et les deux grands-parents F0. Une très forte distorsion de ségrégation a été observée : 17% des microsatellites (3 parmi les 18 informatifs) et 50% des marqueurs AFLPs (213 sur 424 marqueurs), tous de type 3:1 car cette famille F2 provient d'une autofécondation d'un individu F1, ont ségrégué selon les règles Mendéliennes. Pour la seconde famille OE.F2.04.63, les mêmes soixante paires d'amorces

AFLPs et 20 microsatellites ont été utilisés pour génotyper 92 individus F2. Une forte distorsion de ségrégation a également été observée dans cette famille : 25% des microsatellites (4 parmi 16) 69% des marqueurs AFLPs (172 parmi 246) ont ségrégué selon les règles Mendéliennes. Le même niveau de distorsion de ségrégation que chez la moule bleue et l'huître creuse (voir paragraphe 3 de ce chapitre) est donc observé chez cette seconde famille, avec 33% des marqueurs au total. Cependant le niveau de distorsion s'élève à 53% chez la famille issue d'autofécondation. Si les deux familles étudiées ici sont toutes les deux l'aboutissement de 6 générations de croisements frères-sœurs, la famille OE.F2.04.45 a un niveau de consanguinité supplémentaire puisque le dernier croisement correspond à une autofécondation. Il est intéressant de noter que la plupart des allèles associés à un déficit en homozygotes proviennent du grand-parent provenant de la lignée consanguine (l'autre étant un grand-parent sauvage). Ainsi la majorité des distorsions peuvent être attribuées à la sélection contre des mutations délétères à des gènes liés à la valeur sélective. Ceci montre aussi que la purge du fardeau génétique n'a pas été réalisée même après 6 générations de croisements consanguins et que réaliser des croisements consanguins successifs n'est pas chez cette espèce une stratégie efficace pour diminuer le fardeau génétique comme mis en évidence par (Fu 1999; Miller et Hedrick 2001). De plus, un excès d'hétérozygotes a été observé chez les deux familles mais s'est révélé significatif chez la famille issue d'autofécondation mettant en évidence le fait que l'expression des gènes délétères est plus forte chez cette famille, corroborant ainsi le lien entre le fardeau génétique et le niveau de consanguinité.

Dix sept groupes de liaison ont été mis en évidence grâce au logiciel Crimap pour la famille OE.F2.04.45. Seulement trois groupes (figure 3.9) contenant 3 ou 4 microsatellites ont permis d'ordonner ces marqueurs et chaque microsatellite a pu être associé à plusieurs AFLPs liés avec une fréquence de recombinaison de zéro.

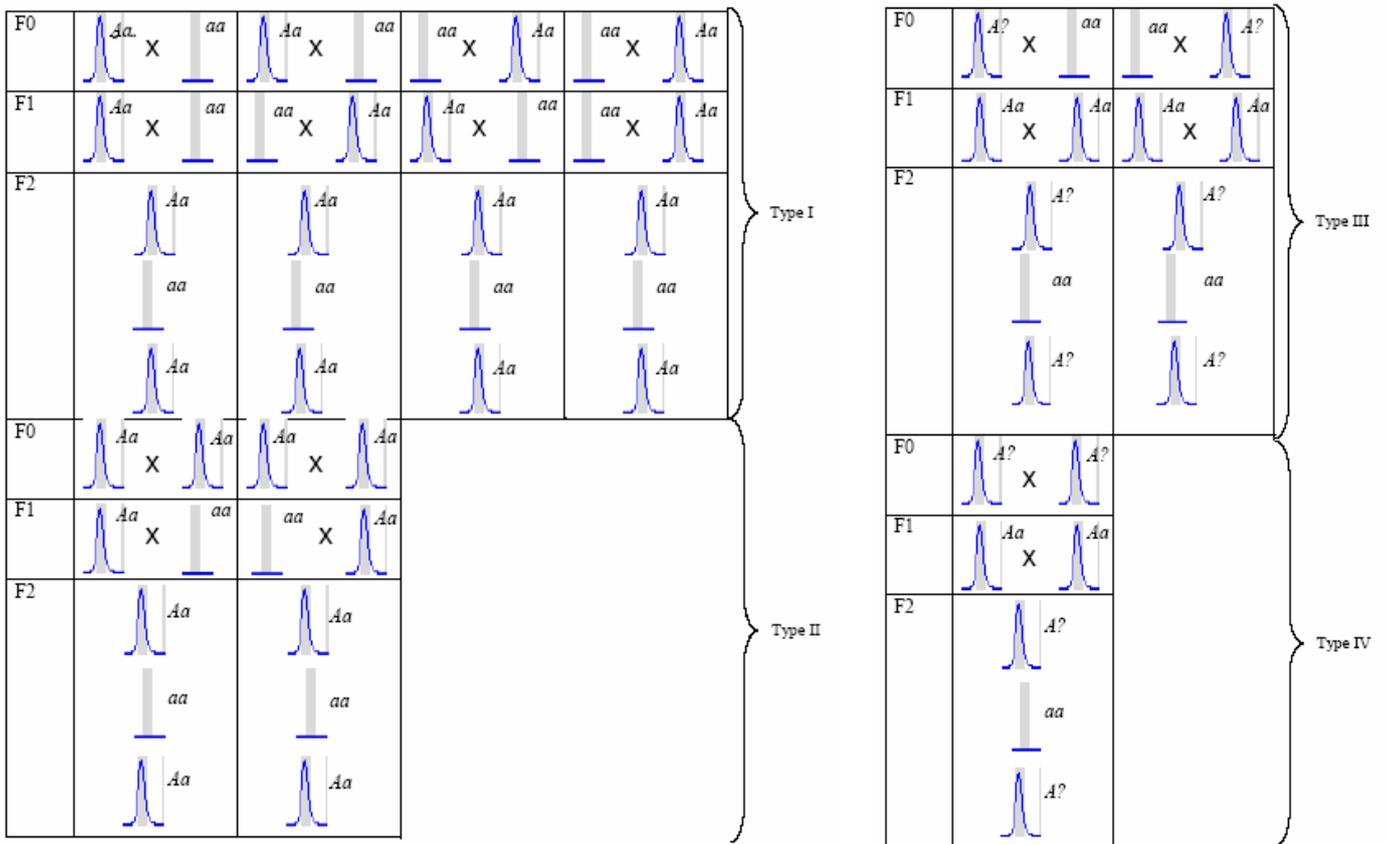


Figure 3.10. Description des quatre types de transmission des marqueurs AFLPs au sein de trois générations F0, F1 et F2.

Type I : chaque phénotype peut être assigné à un génotype (Aa ou aa) et les origines des allèles peuvent être tracées jusqu'aux grands-parents.

Type II : chaque phénotype peut être assigné à un génotype (Aa ou aa) mais il y a une ambiguïté pour tracer l'origine de l'allèle A chez les grands-parents car les deux grands-parents F0 ont le génotype Aa.

Type III : la présence du pic chez les deux parents F1 rend ambigu la connaissance de leurs génotypes (AA ou Aa) mais l'origine de l'allèle A peut être tracé car seul un des deux grands-parents a le pic et donc pour génotype A ?

Type IV : la présence du pic chez les deux parents F1 rend ambigu la connaissance de leurs génotypes (AA ou Aa) mais l'origine de l'allèle A ne peut être tracé car les deux grands-parents et les deux parents ont le pic et donc pour génotype A ? Cette configuration n'est pas informative et les marqueurs de ce type n'ont pas été inclus dans l'analyse.

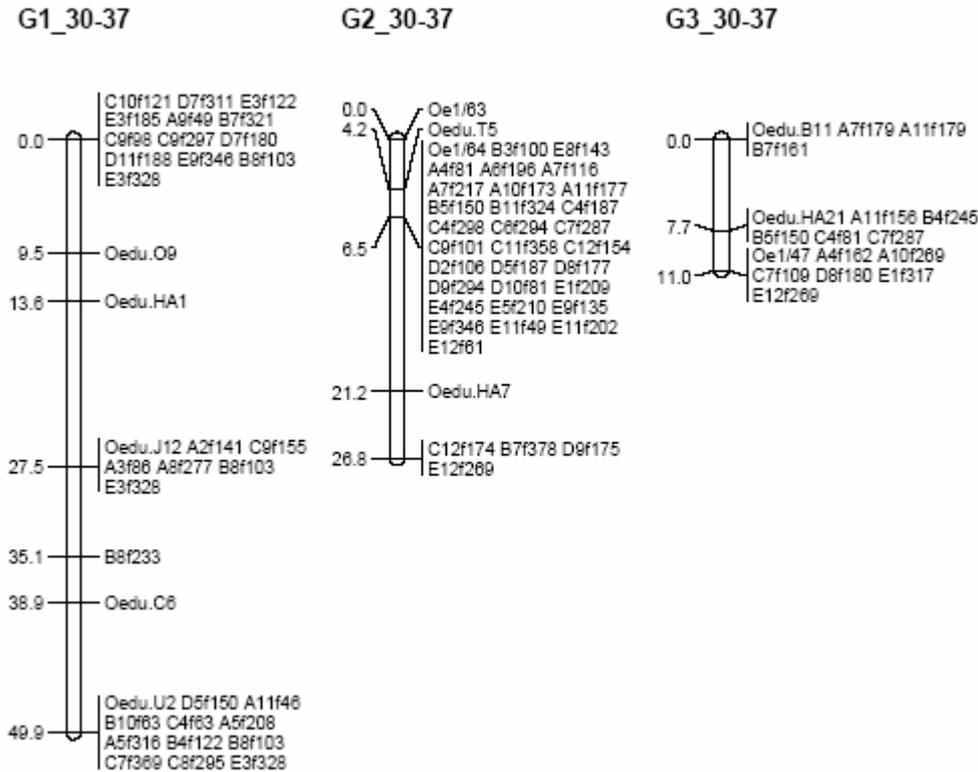


Figure 3.9. Trois groupes de liaisons contenant 3 ou 4 microsatellites chez la famille OE.F2.04.45.

Quatre groupes de liaison contenant un microsatellite sont caractérisés par une longueur de 13-14 cM, le microsatellite étant distant d'un important regroupement d'AFLPs (de 12 à 25 marqueurs). Les dix autres groupes de liaison ne contiennent pas de marqueurs microsatellites et les marqueurs AFLPs de ces groupes n'ont pu être ordonnés.

En ce qui concerne la famille OE.F2.04.63, qui est une famille de type F2 (au contraire de la famille de moule précédemment étudiée qui était de type F1), l'inférence des génotypes des AFLPs à partir de leur phénotype (présence ou absence des pics) permet la distinction de 4 types de configurations de transmission des AFLPs (Figure 3.10). Tous les marqueurs, même distordus ont été gardés pour l'analyse de liaison car nous avons moins de marqueurs que pour la moule. Cependant, les marqueurs distordus ont été ajoutés dans un second temps. Des cartes spécifiques de chaque parent F1 (nommés parents 1 et 2, soit P1 et P2, en l'absence de la connaissance de leur sexe) ont donc pu être construites. La carte génétique du parent P1 est basée sur l'analyse de 16 microsatellites et 145 AFLPs ségrégeants chez ce parent. Elle est finalement constituée de 104 marqueurs (65%) dont 14 microsatellites, 62 marqueurs AFLPs de type I, 7 de type II et 21 de type III. Neuf groupes de liaison couvrant 471 cM ont pu être

Linkage group	Length (cM)	No. of markers	Average spacing (cM)	Largest interval (cM)
G1_P1	95.8	21	4.79	22.5
G2_P1	72.1	14	4.81	23.7
G3_P1	66.4	22	3.16	9.7
G4_P1	63.4	9	7.93	35.3
G5_P1	50.0	11	5.0	11.8
G6_P1	38.0	10	4.22	15.4
G7_P1	31.6	6	6.32	18.1
G8_P1	30.3	4	10.1	17.6
G9_P1	23.6	7	3.93	11.4
Total	471.2	104		

Tableau 3.5. Caractéristiques des groupes de liaison de la carte P1 chez la famille OE.F2.04.63.

Linkage group	Length (cM)	No. of markers	Average spacing (cM)	Largest interval (cM)
G1_P2	77.7	15	5.55	23.0
G2_P2	69.8	10	7.76	24.2
G3_P2	68.8	24	2.99	17.8
G4_P2	65.4	17	4.09	10.5
G5_P2	50.7	13	4.23	18.9
G6_P2	45.8	11	4.58	14.2
G7_P2	26.1	2	26.1	26.1
G8_P2	17.4	14	1.34	11.0
G9_P2	16.4	6	3.28	12.1
G10_P2	11.9	5	2.98	10.8
Total	450.0	117		

Tableau 3.6. Caractéristiques des groupes de liaison de la carte P2 chez la famille OE.F2.04.63.

construits comprenant de 4 à 22 marqueurs, avec une distance moyenne entre marqueurs de 4.9 cM (Tableau 3.5). La carte génétique du parent P2 est basée sur l'analyse de 16 microsatellites et 154 AFLPs ségrégeants chez ce parent. Elle est finalement constituée de 117 marqueurs (76%) dont 14 microsatellites, 76 marqueurs AFLPs de type I, 5 de type II et 22 de type III. Dix groupes de liaison couvrant 450 cM ont pu être construits comprenant de 4 à 24 marqueurs, avec une distance moyenne entre marqueurs de 4.2 cM (Tableau 3.6). En considérant tous les marqueurs, la longueur estimée du génome a été estimée à 572 cM pour la carte de P1 et 576 cM pour la carte de P2 soit un pourcentage de couverture de 82% et 84% respectivement pour les deux cartes.

Les marqueurs distordus ont montré une distribution non aléatoire dans le génome. Ainsi les 30 marqueurs distordus de P1 et les 26 de P2 se retrouvent respectivement principalement sur 4 et 3 groupes de liaisons. La figure 3.11 montre l'exemple des groupes G2_P1 et G4_P2 sur lesquels respectivement 12 et 10 marqueurs distordus sont regroupés sur 35 cM et l'ensemble du groupe. Ces groupes de marqueurs distordus pourraient correspondre à la localisation de gènes potentiellement délétères.

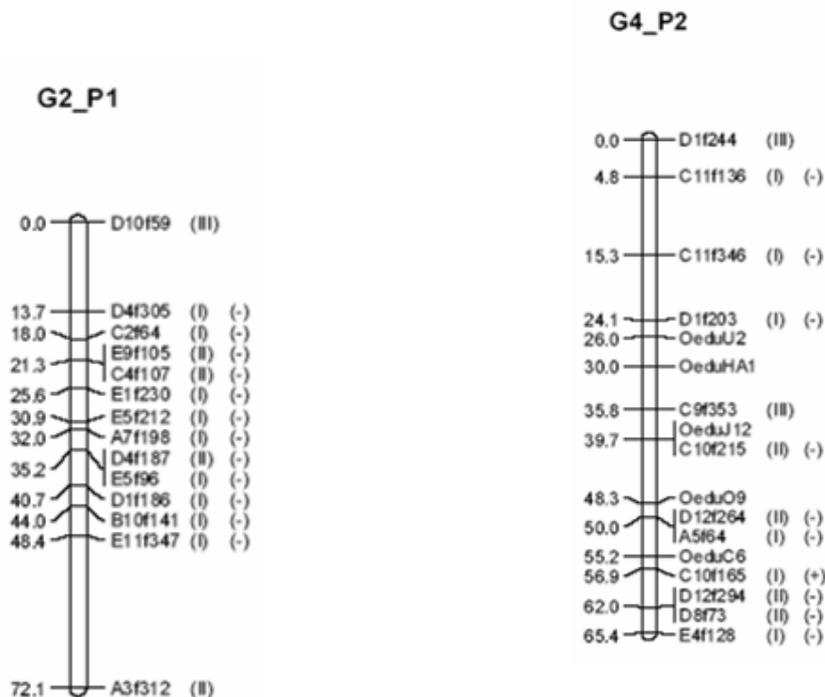


Figure 3.11. Exemple de regroupement de marqueurs distordus. Les signes entre parenthèses (I, II, ou III) indiquent le type de marqueurs AFLPs. Les marqueurs non accompagnés de parenthèse sont des marqueurs microsatellites. Est également indiquée entre parenthèse le sens de la distorsion vers un déficit (-) ou un excès (+) d'homozygotes.

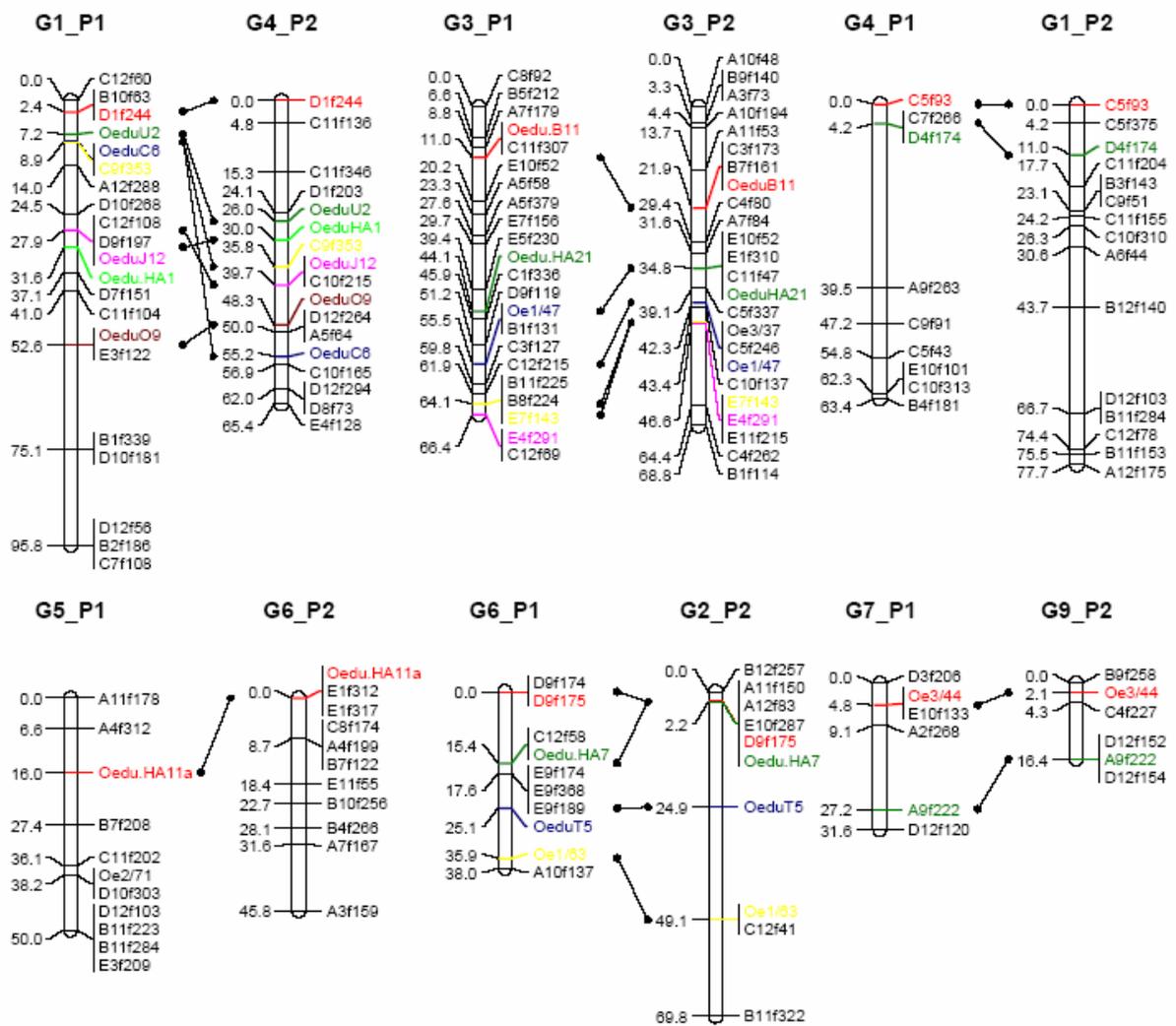


Figure 3.12. Ordonnement des marqueurs communs entre les deux cartes pour 6 groupes homologues chez la famille OE.F2.04.63.

Comme chez la moule, la distribution de la taille des intervalles a mis en évidence un nombre important de regroupements de marqueurs, respectivement 34 et 54 chez les cartes de P1 et P2. La carte P2 montre en particulier 3 intervalles de 20 cM contenant chacun seulement 1 microsatellite et un intervalle de 20 cM contenant 14 marqueurs (sur G8_P2). Plus généralement, des zones restent encore à couvrir puisque des intervalles de plus de 18 cM restent nombreux (5 pour P1 et 6 pour P2).

La cartographie des marqueurs microsatellites dominants et des marqueurs AFLPs de type III (ségrégeant chez les deux parents) a permis d'identifier 8 groupes homologues entre les deux cartes, et d'ordonner les marqueurs pour 6 d'entre eux (Figure 3.12). L'ordre des marqueurs est conservé dans la plupart des cas, cependant 5 microsatellites n'ont pas été cartographiés dans le même ordre entre les groupes G1_P1 et G4_P2. De même, la longueur des groupes homologues, parfois similaire, a pu montrer de fortes différences comme entre les groupes G1_P1 et G4_P2 d'une part et G6_P1 et G2_P2 d'autre part. Comme 86 paires de marqueurs ségrégeaient chez les deux parents, nous avons pu comparer la fréquence de recombinaison entre les deux parents pour ses paires de marqueurs (Figure 3.13) et il s'est avéré que 44 d'entre elles ont montré une différence significative de fréquence de recombinaison entre les deux parents (12 avec une plus forte recombinaison chez P2 et 32 avec une plus forte recombinaison chez P1) indiquant une recombinaison sexe-spécifique dont le sens n'a pu être déterminé en l'absence de la connaissance du sexe des parents.

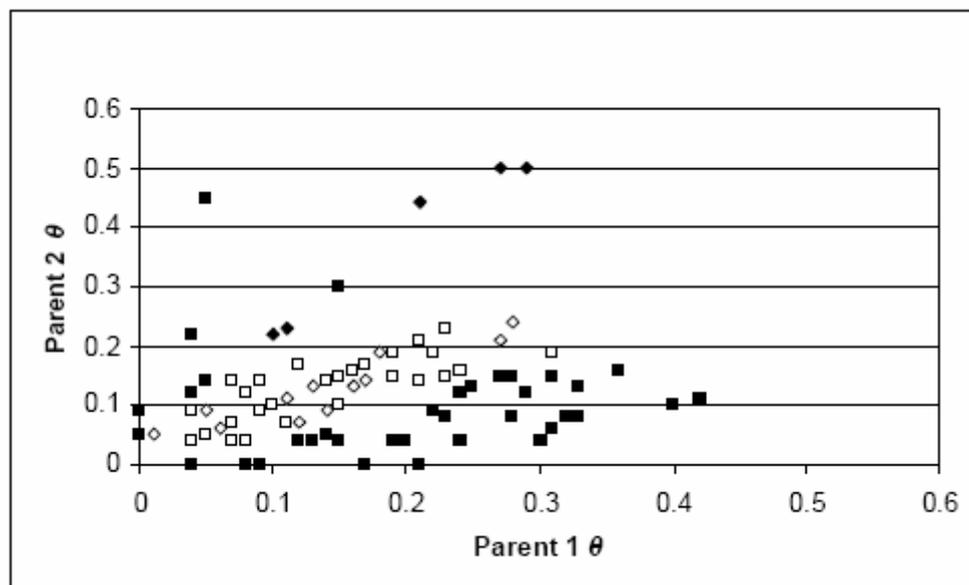


Figure 3.13. Différences de fréquences de recombinaison entre les parents P1 et P2 pour 86 paires de marqueurs ségrégeants chez les deux parents dans la famille OE.F2.04.63. Les losanges correspondent à des paires de microsatellites, les carrés à des paires microsatellites-

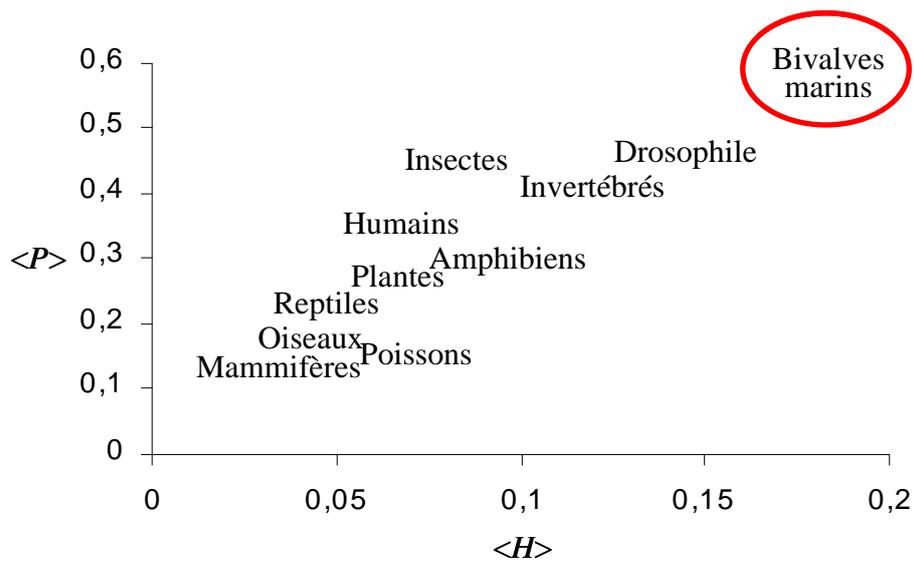


Figure 3.14. Représentation schématique de la diversité enzymatique de différents groupes d'animaux ou de plantes. $\langle H \rangle$: Hétérozygotie. $\langle P \rangle$: Proportion de locus polymorphe. Adapté d'après Nevo (1978) et Solé-Cava & Thorpe (1991) par Nicolas Bierne (Université de Montpellier, projet Bivalvomix).

AFLPs. Les symboles en noir indiquent les cas pour lesquels la recombinaison s'est avérée significativement hétérogène entre les deux parents ($p < 0.05$).

En bref

Comme chez la moule, les cartes construites chez l'huître plate montrent une bonne couverture du génome (82% et 84%) du même ordre que celles estimées chez l'huître creuse. De plus, le nombre de groupes de liaison chez le parent P2 correspond au nombre haploïde de chromosomes chez cette espèce (Thiriot-Quiévreux et Ayraud 1982) et le fait que seulement 9 groupes de liaison aient été identifiés chez le parent P1 suggère que des zones restent à couvrir en ajoutant davantage de marqueurs. L'ajout de marqueurs codominants en particulier, qui est en cours de réalisation comme pour la moule, permettra également d'étudier de façon plus approfondie les différences des taux de recombinaison entre les sexes observées ici. Ce phénomène a déjà été observé avec des plus forts taux de recombinaison chez la femelle de la truite arc-en-ciel (Sakamoto et al. 1999), le poisson chat (Waldbieser et al. 2001), le zebrafish (Knapik et al. 1998), l'huître américaine (Yu et Guo 2003) ou encore la crevette tigrée (Wilson et al. 2002). Dans notre étude, à cause du caractère incubant de l'espèce, nous n'avons pas pu déterminer le sexe du parent P1 pour lequel 32 paires de marqueurs sur 44 ont montré un plus fort taux de recombinaison que chez P2.

5) Vers une augmentation de la densité de la carte génétique de *C. gigas*

Bien qu'il existe déjà deux cartes génétiques chez l'huître creuse, nous avons souhaité développer de nouveaux marqueurs afin d'augmenter nos chances de détecter des QTLs de résistance au syndrome de mortalité estivale. Nous avons choisi de rechercher des polymorphismes de substitution d'une base (SNPs) que l'on rencontre en grand nombre dans les génomes, avec par exemple 1 SNP tous les 104 pb chez les maïs (Tenailon et al. 2001) où ils sont très nombreux, ou 1 SNP tous les 1 kb chez l'homme (Sachidanandam et al. 2001) qui s'avère être une fréquence assez modérée. Ces marqueurs apparaissent donc particulièrement intéressants par leur fréquence mais aussi leur caractère dominant. Etant donné le fait que les mollusques marins étaient déjà connus pour avoir le plus fort niveau de polymorphisme allozymique dans le règne animal (Figure 3.14), nous nous attendions à trouver un nombre important de SNPs. Nous avons choisi de les rechercher dans des ESTs dont les séquences étaient déjà connues dans les bases de données mais également dans des ESTs séquencés dans le cadre du projet Aquafirst, et qui correspondent à des gènes apparaissant impliqués dans le

syndrome de mortalité estivale, constituant ainsi des gènes candidats. Ce travail est toujours en cours de réalisation dans le cadre de la thèse de Christopher Sauvage ainsi que du projet européen mais un premier groupe de données nous a permis de réaliser une étude du polymorphisme obtenu avec ces marqueurs couplée à une caractérisation du biais d'usage du code chez cette espèce (Publication n° 21).

Nous avons donc séquencé ces ESTs chez 24 individus correspondant aux 24 grands-parents à l'origine de l'ensemble de nos familles F2 produites pour la recherche de QTLs. Parmi 84 ESTs pour lesquels nous avons dessiné des amorces PCR, 41 ont donné des amplifications claires d'une seule bande. L'étude de ces 41 fragments a donc conduit au séquençage d'environ 10.5 kb qui a permis de détecter 290 SNPs dont les trois quarts étaient localisés dans les régions non-codantes de ces fragments (Figure 3.15).

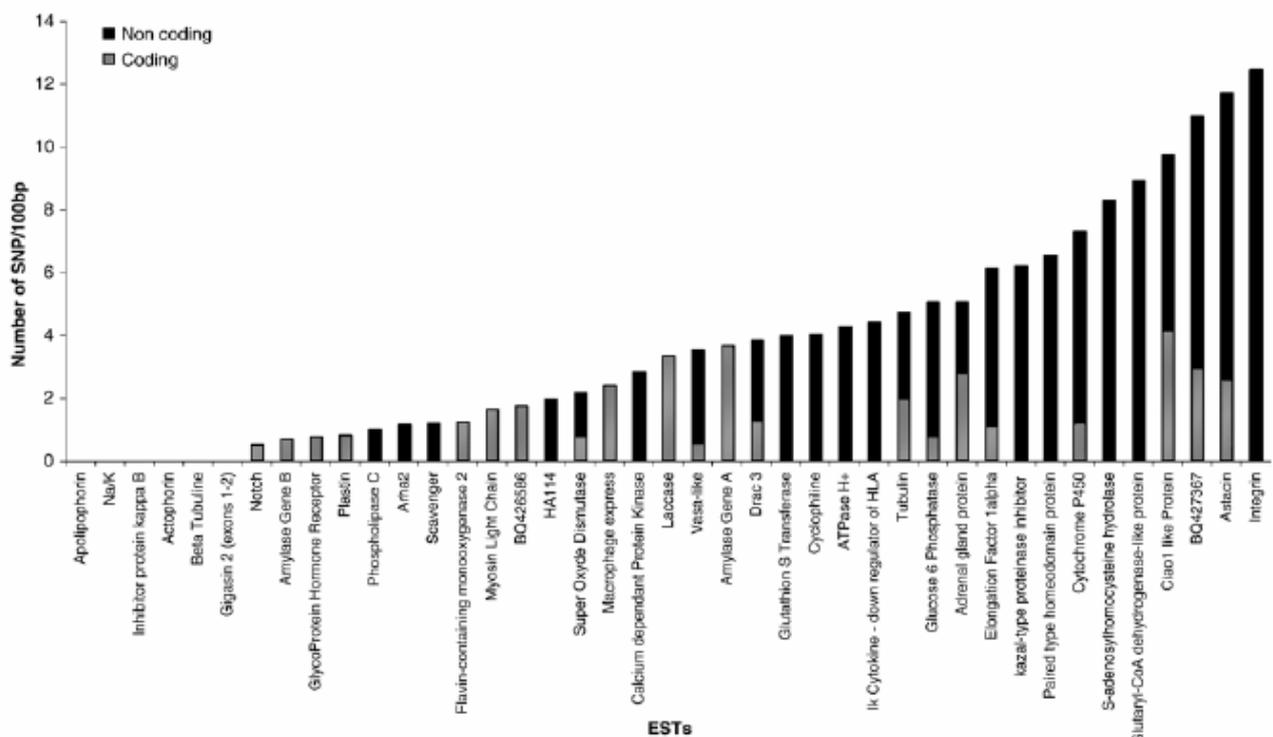


Figure 3.15. Niveau de polymorphisme codant ou non-codant détecté dans les 41 ESTs.

Nous avons trouvé seulement 4 loci monomorphes (5% des loci amplifiés). La densité des SNPs dans les régions non codantes a été estimée à 1 SNP tous les 60 pb et dans les régions codantes à 1 SNP tous les 40 pb, ce qui confirme le niveau hautement polymorphe du génome de l'huître creuse. Nous avons détecté en moyenne 6.7 SNPs dans chaque fragment, ce qui est très largement suffisant puisqu'un seul SNP suffit à cartographier chaque fragment, les autres étant liés physiquement. Le nombre maximum de SNPs détectés a été de 30 dans un fragment

de 241 pb d'une séquence entièrement non codante, soit 1 SNP tous les 9 pb, ce qui peut s'avérer trop important si l'on considère que pour le génotypage de ces SNPs, la plupart des techniques nécessitent le dessin d'au moins une amorce autour du SNP d'intérêt, et que ce dessin dans des zones non polymorphes peut s'avérer particulièrement difficile dans le cas d'une aussi forte concentration de SNPs.

En bref

L'étude de ces 41 ESTs a permis de confirmer le fort niveau de polymorphisme du génome de *C. gigas*. La cartographie de ces ESTs est en cours dans les familles F2 produites pour l'analyse QTLs et décrites dans le chapitre suivant. De nouveaux ESTs détectés dans une analyse par puce comme montrant des différences significatives entre familles « résistantes » et « sensibles » au syndrome de mortalité estivale, viendront s'ajouter et permettront d'augmenter la densité des cartes génétiques aujourd'hui disponibles. Nous espérons également pouvoir faire le lien entre ces gènes candidats et les zones QTLs que nous allons détecter.

Conclusion

Les travaux de cartographie génétique que nous avons réalisés montrent qu'il est possible de construire des cartes d'une assez bonne résolution et d'un bon niveau de couverture même en l'absence de connaissances importantes des génomes concernés, comme c'est le cas chez l'huître plate et surtout la moule en terme de marqueurs moléculaires disponibles. Ceci est rendu possible par le développement de marqueurs tels que les AFLPs obtenus facilement et en grand nombre. Le caractère dominant de ces marqueurs reste cependant un obstacle en particulier à la construction de cartes consensus. De nouveaux marqueurs de type microsatellites sont en cours de développement actuellement et leur génotypage sur nos familles de cartographie permettra d'améliorer la qualité de nos cartes génétiques. Ces cartes, si elles permettent une meilleure connaissance du génome, restent des outils à la disposition des généticiens permettant en particulier de rechercher des QTLs comme nous allons le voir dans le chapitre suivant. Une autre utilisation de ces cartes génétiques s'inscrit dans la caractérisation de marqueurs soumis à la sélection. Ainsi, si un marqueur est détecté comme « outlier » (c'est-à-dire s'écartant de la distribution neutre de l'ensemble des marqueurs), son positionnement sur une carte peut permettre de caractériser la force de la sélection par une étude de diversité des loci avoisinants ce marqueur sur la carte, puisque la sélection tend à

laisser un « trou » de variation neutre dans le génome comme signature moléculaire. Cette approche est en cours de développement au laboratoire pour caractériser la réponse adaptative de *C. gigas* dans le cadre de son expansion rapide actuelle.

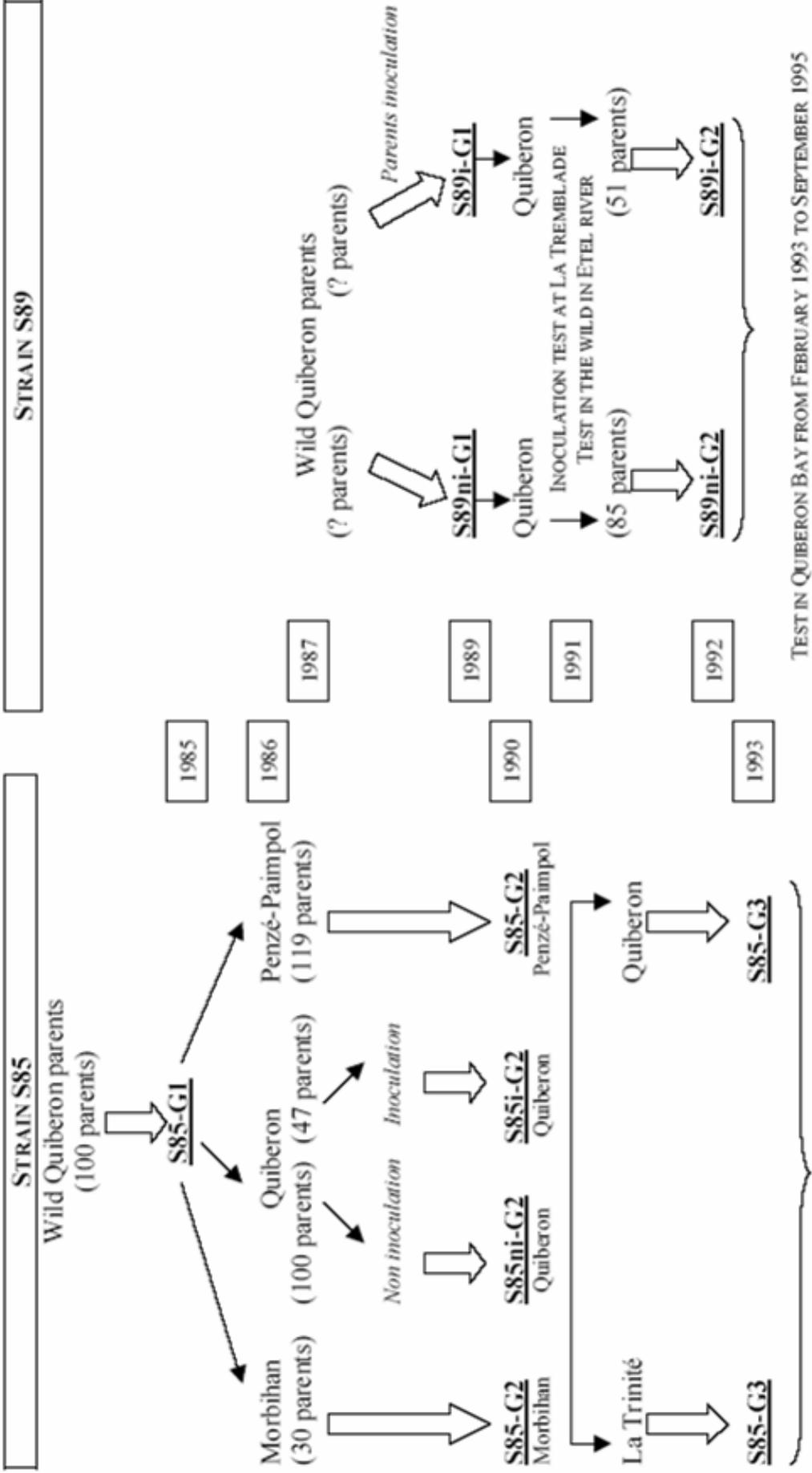


Figure 4.1. Etape de selection massale chez l'huître plate de 1985 à 1995.

1) Les bénéfices de la génétique quantitative et l'intérêt des QTLs

Programme de sélection expérimental de résistance de l'huître plate à la bonamiose

Depuis l'apparition des parasitoses à *Marteilia refringens* et à *Bonamia ostreae* dans les années 1960, la production française de l'huître plate européenne, *Ostrea edulis*, a chuté de 20000 t à moins de 1500 t actuellement, laissant la conchyliculture française en situation de quasi-monoculture de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*. Ceci a conduit l'Ifremer à développer, à un niveau expérimental, une sélection génétique pour une meilleure tolérance à la bonamiose. En effet, la complexité du cycle de *Marteilia refringens*, parasite à plusieurs hôtes, n'est encore que partiellement élucidée, et sa présence est a priori limitée aux zones intertidales. En revanche, *Bonamia ostreae* présente un cycle à un seul hôte, et est présent dans l'ensemble des zones exploitables.

Les principales étapes de ce programme peuvent être résumées comme suit :

1. Sélection massale

De 1985 à 1995, 2 ou 3 générations d'huîtres ont été produites par ponte en masse et ont subi une pression de sélection sous la forme d'une inoculation du parasite ou bien d'une mise sur estran en zone contaminée (Figure 4.1). En 1995, la comparaison des performances d'huîtres de 3^{ème} génération montrait un gain significatif par rapport au contrôle sauvage (59% de survie contre 13%). Les performances intermédiaires de descendants issus de croisements entre ces animaux et des huîtres sauvages, laissaient suggérer un déterminisme génétique additif, et donc améliorable d'une génération à l'autre par sélection. Le protocole de croisement a été modifié de manière à mieux gérer la diversité génétique (passage de reproduction « en masse » à des croisements « bi-parentaux »).

2. Sélection familiale

De 1995 à 1998, 2 générations d'huîtres ont été produites par croisements biparentaux, en intra-lignée en 1995, puis en inter-lignée en 1998 (Figure 4.2). De 1997 à 2000, des animaux sélectionnés issus de ce nouveau mode de reproduction ont montré des gains significatifs de performances par rapport aux naissains naturels captés dans les deux années encadrant leur production en écloserie (61% de survie contre 46 et 13%).

De 1998 à 2000, le même gain de performances a été montré entre des animaux sélectionnés produits de manière familiale et les huîtres témoins sauvages (52% de survie contre 2,5%). Ce dernier résultat est à rapprocher du chiffre de 5% habituellement avancé pour les résultats de

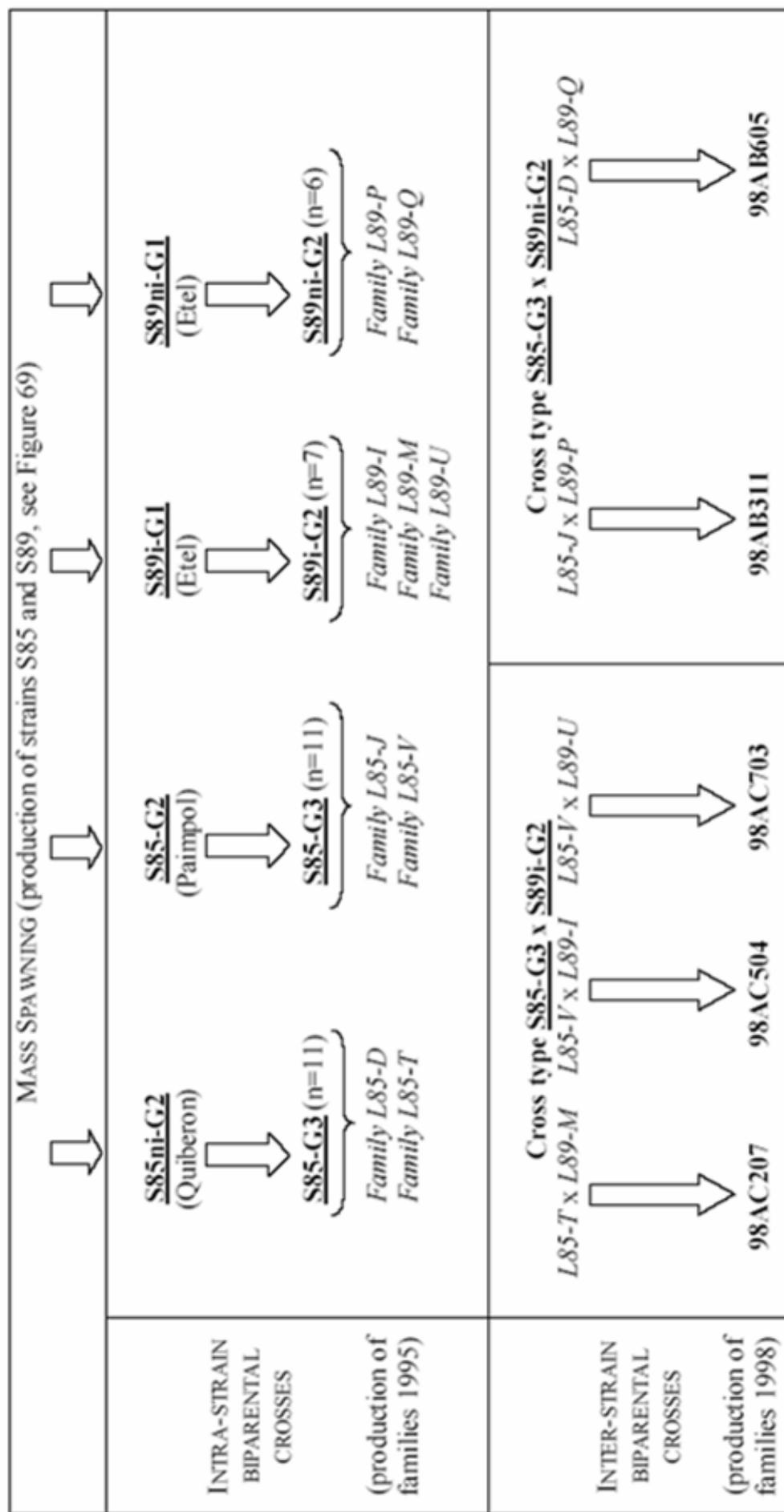


Figure 4.2. Schéma de la production par croisements biparentaux des huîtres plates de 1995 à 1998.

survie "commerciaux". Dans tous les cas, les taux de survie apparaissent corrélés au taux de prévalence en *Bonamia*, montrant que c'était bien la tolérance à la bonamiose qui avait été améliorée.

Puis un projet destiné à évaluer la faisabilité technique et économique de production commerciale d'huîtres plates *Ostrea edulis* tolérantes à *Bonamia ostreae*, a été conduit entre 2002 et 2004. La survie des huîtres tolérantes a été de 73,4% et 89,2% respectivement au sol et en surélévation; contre 33,6 et 39,8% pour le naissain de captage naturel. La prévalence en *Bonamia* était de 0% pour le naissain tolérant contre 20% pour le captage naturel, en début du 3ème été d'élevage.

Programme de sélection expérimentale chez l'huître creuse

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, bien que ne subissant pas l'effet direct de pathogènes majeurs, rencontre quand à elle un problème de mortalité en période estivale sur du jeune naissain (1 an). Les mortalités anormales de l'huître creuse au cours de la période estivale ne sont pas un phénomène rare. En effet, de tels épisodes sont décrits dans la littérature depuis une quarantaine d'années. Ces mortalités sont un problème pour la profession ostréicole. De nombreuses études tendent à montrer qu'il n'existe pas une seule cause identifiée mais que ce phénomène résulterait de la conjonction de plusieurs paramètres potentiels: l'environnement, l'hôte et des pathogènes. C'est dans ce cadre que le projet « MOREST » a été lancé en 2001. Des familles biparentales (45) ont alors été produites avec pour objectif principal d'étudier la possibilité de sélectionner pour une meilleure survie du naissain au cours de la période estivale. Les résultats obtenus ont confirmé des valeurs élevées de l'héritabilité de la survie ($0,81 \pm 0,29$) et une valeur plus faible pour la croissance ($0,31 \pm 0,15$). Une seconde génération, obtenue par sélection divergente des « meilleures » et des « moins bonnes » familles en terme de survie a été obtenue en croisant (croisements consanguins et non consanguins) des individus de première génération n'ayant pas subi de mortalité (sélection strictement familiale). Les résultats ont permis d'estimer l'héritabilité réalisée du caractère ($0,59 \pm 0,29$) et l'absence de réponse corrélative sur la croissance. Les valeurs d'héritabilité obtenues sont du même ordre de grandeur pour la lignée « haute » (0,75) et pour la lignée « basse » (0,71). Une troisième génération, réalisée en 2003, confirme ces résultats. L'ensemble de ces résultats obtenus dans la cadre de la thèse de Lionel Dégremont encadré par Pierre Boudry confirment la forte héritabilité de la survie du naissain d'écloserie et donc la possibilité de sélectionner pour améliorer la survie (Dégremont et al. 2005; Dégremont et al. 2007).

Intérêt des QTLs

Dans le cadre du travail d'amélioration des espèces qui nous intéresse, la construction de cartes génétiques n'est qu'une première étape nécessaire à la recherche de QTLs (Quantitative Trait Loci) qui sont des marqueurs liés à des caractères quantitatifs d'intérêt.

Même si la sélection dite classique a prouvé son efficacité lors de la sélection des deux espèces qui nous intéressent pour des caractères de résistance la bonamiose chez l'huître creuse et de résistance à la mortalité estivale chez l'huître creuse, ces caractères restent difficiles à mesurer et des contraintes liées à cette sélection classique existent. Il s'agit de la difficulté de maîtriser la pression de sélection (parasite purifiable mais dont la reproduction n'est pas maîtrisée au laboratoire pour l'huître plate et syndrome complexe chez l'huître creuse), mais également pour l'huître plate de la longueur d'un cycle de sélection. Enfin l'approche que nous poursuivons dans le cadre du projet Aquafirst vise à cartographier des gènes candidats identifiés dans la résistance à la mortalité estivale chez l'huître creuse afin de participer à l'explication physiologique du phénomène et d'obtenir éventuellement des QTLs qui seraient des gènes et non plus des marqueurs anonymes. Ce qui nous motive est de pouvoir utiliser ces marqueurs comme des outils d'aide à la sélection.

Les caractères qui nous intéressent sont des caractères binaires (mort/vivant codé 0/1) mais aussi quantitatifs (charge en herpès virus) pour lesquels l'analyse QTLs est cependant robuste (Visscher et al. 1996). Il s'agit :

- pour l'huître plate de la résistance à la bonamiose pour laquelle le caractère d'intérêt est la survie à un épisode de mortalité,
- pour l'huître creuse de la résistance au syndrome de mortalité estivale pour lequel le caractère d'intérêt est également la survie à un épisode de mortalité.

Dans ce second cas, les facteurs influençant ces mortalités estivales apparaissent multiples et en interaction, ce qui justifie l'hypothèse que plusieurs gènes interviennent dans la résistance à ces mortalités (et cela malgré la forte héritabilité estimée pour ce caractère).

Bien que des études aient déjà détecté des QTLs dans de nombreuses espèces animales, il est cependant à noter qu'il n'existe qu'un programme de sélection utilisant actuellement ces informations pour assister la sélection classique (caractères de résistance aux mamites et de fertilité chez les bovins, INRA), principalement à cause du coût des techniques moléculaires associées, souvent supérieures au gain économique qu'elles participent à obtenir sur le caractère. Cependant, cette approche apparaît maintenant plus abordable étant donné

l'évolution permanente de ces techniques et de leur prix et particulièrement intéressante pour des caractères difficiles à phénotyper.

2) La production du matériel ségrégeant

Familles F2-S chez l'huître plate

Le second type de familles correspond aux familles F1-S obtenues à partir du croisement d'un individu sauvage et d'un individu issu de familles obtenues après deux générations de sélection massive pour la résistance à la bonamiose et (familles 98). Dans ce cas, 6 familles F1-S produites en 2004 ont permis de produire 12 familles F2-S en 2005 (Figure 4.3).

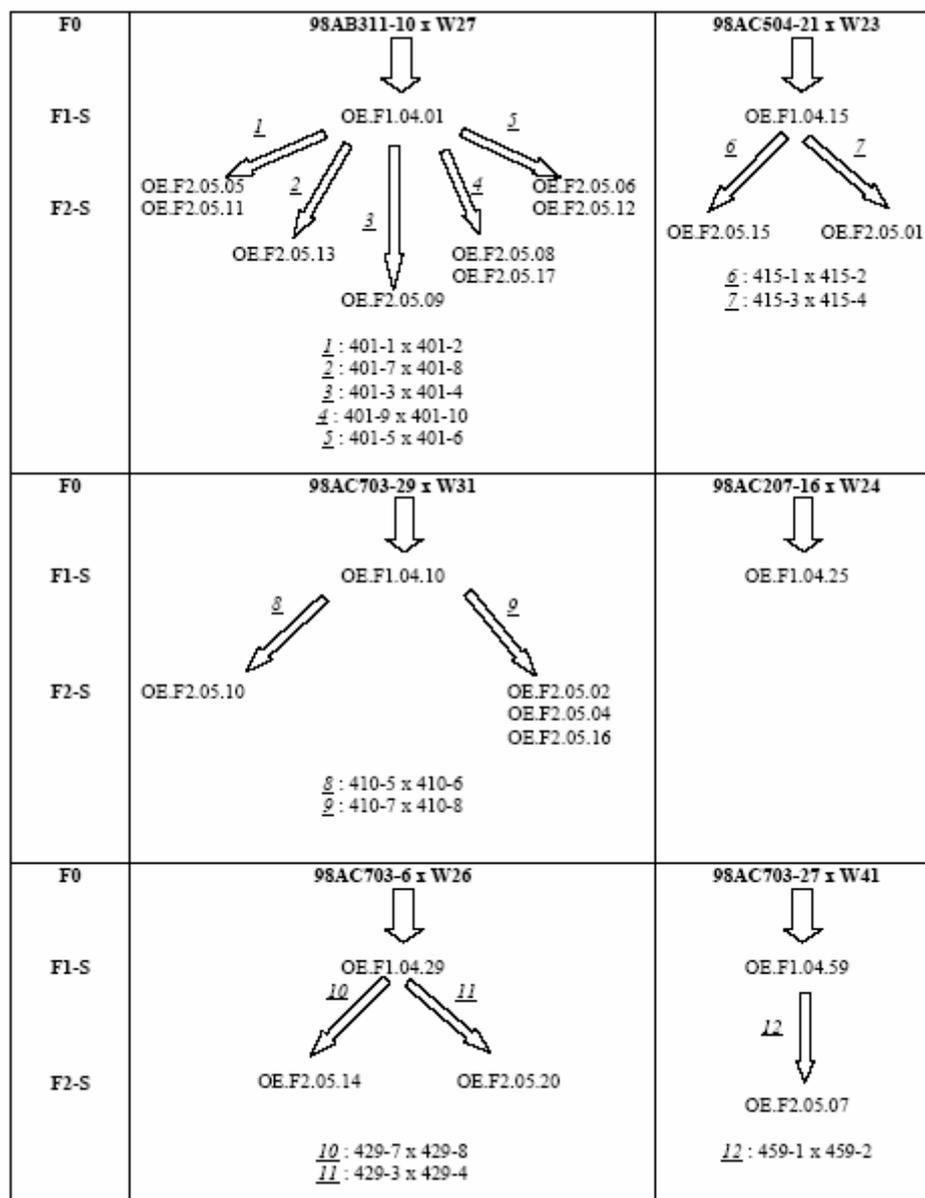


Figure 4.3. Production des familles ségrégeantes F2-S.

Deux familles F2, issues des deux types de croisements en fonction des grands-parents F0 utilisés (F et S), ont été retenues pour la recherche de QTLs : la famille F2-L OE.F2.04.45, une des familles utilisée également pour la cartographie génétique et la famille F2-S OE.F2.05.04, choisie elle aussi sur la base du polymorphisme des marqueurs microsatellites observé au niveau des grands-parents F0 et des parents F1.

Familles F2 chez l'huître creuse

En ce qui concerne l'huître creuse, notre objectif étant de chercher des QTLs de résistance à la mortalité estivale, nous avons choisi de produire du matériel ségrégeant pour ce caractère sous la forme de familles biparentales de type F2. Pour cela, des parents F0 ont été choisis de façon à maximiser le polymorphisme dans la descendance (Tableau 4.1). Ces individus sont pour moitié issus de la lignée haute dite « résistante » de troisième génération du programme MOREST (en rouge) et pour l'autre moitié, issus de la lignée basse dite « sensible » (en bleu).

Ces deux groupes de géniteurs présentaient donc des performances contrastées pour le trait étudié c'est à dire la mortalité estivale. La production des individus de la F1 a eu lieu en 2004 par le biais de croisement bi-parentaux (familles en jaunes). Puis, en 2006, sur la base de la diversité génétique observée, une sélection d'individus de la F1 a été réalisée, et 20 familles ont été produites (en saumon). Il s'agissait de cinq groupes de quatre familles, permettant de disposer d'une marge de sécurité quant à d'éventuels problèmes tels qu'un épisode de mortalités en élevage larvaire. Au contraire des moules et des huîtres plates, les animaux peuvent être facilement sexés et les gamètes sont récupérés par scarification des gonades. Le mélange des gamètes mâles et femelles est réalisé selon les besoins du croisement.



Figure 4.4. Infection expérimentale de l'huître plate par *Bonamia ostreae*.



Huîtres sauvages surinfectées par *Bonamia ostreae*

Huîtres testées de la famille OE.F2.05.04

En bref

Les difficultés rencontrées pour la reproduction des huîtres plates pour la cartographie génétique ont été les mêmes ici sans (heureusement !) production involontaire de famille issue d'autofécondation. En ce qui concerne l'huître creuse, sa reproduction en écloserie expérimentale aussi bien que professionnelle est maîtrisée puisqu'aujourd'hui une part de plus en plus importante du naissain mis en élevage en France est du naissain d'écloserie sous la forme de naissain triploïdes en très grande majorité. Grâce à cette maîtrise zootechnique et à l'importance économique très largement supérieure de cette espèce sur l'huître plate, c'est sur cette espèce qu'un programme de sélection national (Gigas+), incluant les professionnels écloveurs et producteurs, est en cours de montage afin de produire du naissain d'huître creuse plus résistant au syndrome de mortalité estivale.

3) Identification de QTLs de résistance à *Bonamia ostreae* chez l'huître plate

La bonamiose est une parasitose intrahémocytaire due au protiste *Bonamia ostreae* du phylum des Haplosporidés (Carnegie et al. 2003). Ce parasite a été découvert en Europe à la fin des années 1970s en Bretagne et cette maladie, jusqu'alors inconnue des productions d'huîtres plates s'est très rapidement répandue dans ces populations européennes. Il semblerait que ce parasite ait été introduit de façon involontaire lors de transfert de lots d'huîtres plates infectées depuis la Californie dans les états américains du Maine et de Washington ainsi qu'en Europe. Les signes cliniques de cette maladie correspondent à un arrêt de croissance puis une mort des huîtres et sont corrélés avec une infiltration et une destruction des hémocytes due à la prolifération du parasite dans les tissus des branchies, du manteau et de la glande digestive. Comme ce parasite n'est pas cultivable, il doit être purifié à partir d'huîtres infectées afin de pouvoir l'utiliser dans les expérimentations. Afin de mettre en contact de façon la plus naturelle possible notre famille OE.F2.05.4 avec le parasite, nous avons tout d'abord purifié le parasite à partir d'huîtres plates de Quiberon infectées. Le parasite a ensuite été injecté dans la cavité péricardique d'huîtres plates de la même provenance afin de créer une surinfection, et ces huîtres surinfectées ont été mises en contact avec 550 huîtres de la famille F2-S OE.F2.05.4 de la façon suivante (Figure 4.4). Cinq raceways contenant chacun 110 huîtres F2 âgées de 1 an ont été utilisés. Dans chaque raceway, le niveau supérieur (2 paniers) contenait au total 34 huîtres sauvages surinfectées et 10 huîtres sauvages (n'ayant pu être surinfectées par manque de parasite) et le niveau inférieur (2 paniers) contenait 110 huîtres F2. Les

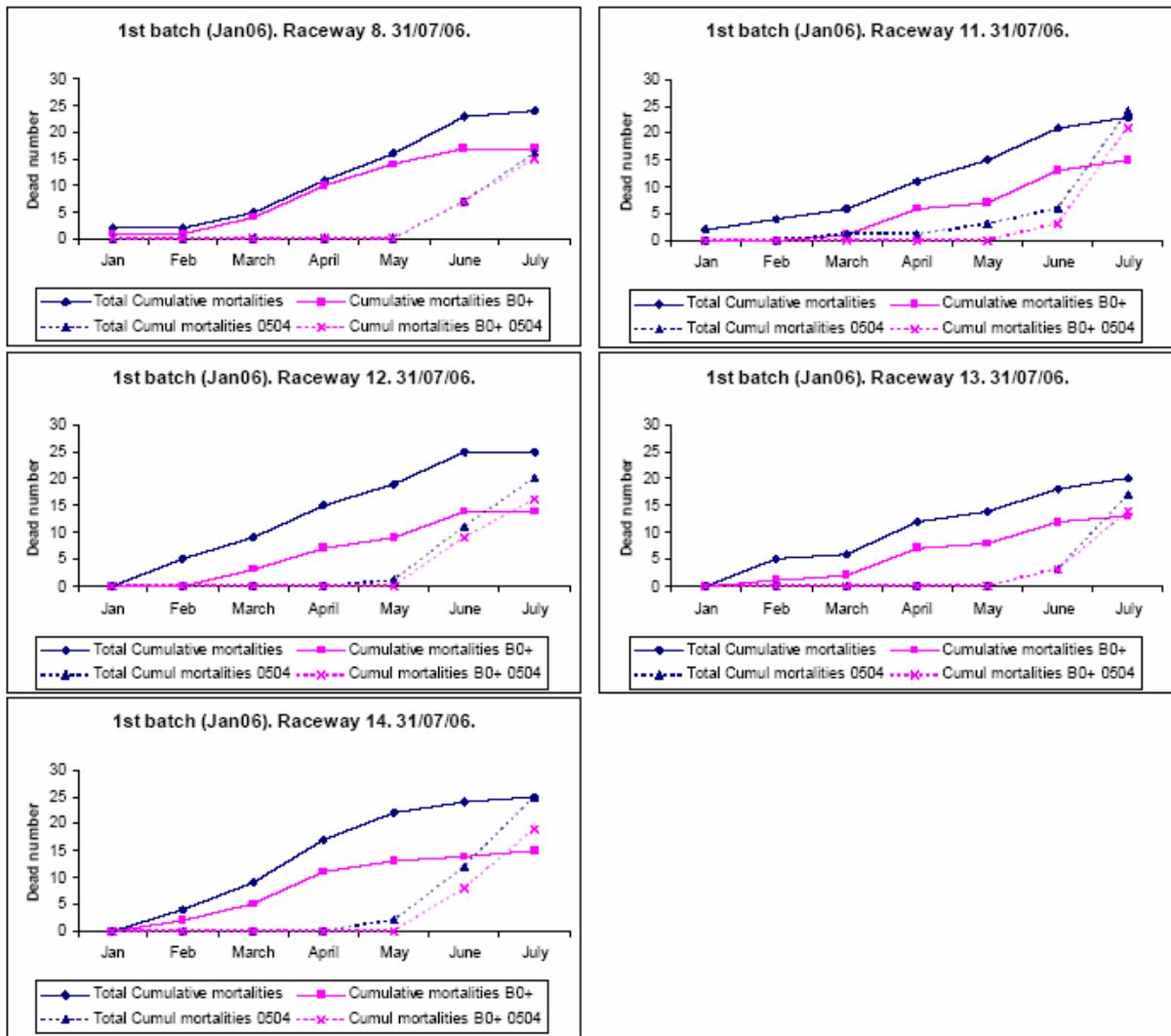


Figure 4.5. Mortalités cumulées dans les 5 raceways pour la famille OE.F2.05.04 (traits pointillés) et les huîtres sauvages surinfectées (traits pleins), avec détection (en rose) ou non (en bleu) de *Bonamia ostreae* dans les animaux morts.

mortalités de ces huîtres ont été suivies pendant six mois (18 janvier – 31 juillet 2006) et des frottis ont été réalisés sur toutes les huîtres mortes afin de déterminer le niveau d'infection selon une échelle semi-quantitative (Hervio et al. 1995): BO⁻, BO⁺, BO⁺⁺, BO⁺⁺⁺. L'expérimentation a été arrêtée le 31 juillet 2006.

Les mortalités ont débuté chez les huîtres sauvages surinfectées dès le mois de février et chez les huîtres F2 dès le mois de mai. Au total 105 huîtres sont mortes (19%) : 9.5% n'ont pu être diagnostiquées à cause de la mauvaise qualité des tissus, 9.5% étaient BO⁻, 16.2% BO⁺, 22.9% BO⁺⁺ et 41.9% BO⁺⁺⁺. Bien que la famille OE.F2.04.45, issue d'autofécondation, ne puisse être utilisée pour la recherche de QTLs, elle avait également été soumise à ce challenge et a montré une mortalité plus faible (9.4%) ainsi qu'un niveau d'infection inférieur, malgré le fait que les animaux de cette famille soient âgés de 2 ans et ceux de la famille OE.F2.05.04 de 1 an seulement.

Cette étude renforce l'idée que l'âge n'est pas le facteur clé dans le développement de la maladie mais plutôt d'autres facteurs que la taille (Caceres-Martinez et al. 1995) et que les jeunes huîtres sont également susceptibles à cette maladie tout au moins dans les conditions de notre écloserie expérimentale. L'explication la plus probable pour expliquer ces différences de taux de mortalité et d'infection entre les deux familles viendrait de la composition génétique des familles en elle-même en particulier par la contribution pouvant être très différente entre les deux grands-parents sauvages utilisés dans les deux croisements.

Les 5 raceways ayant montré la même dynamique de mortalité (Figure 4.5), le même nombre de mortes et le même niveau d'infection, les données ont été mises en commun pour l'analyse QTLs. Toutes les huîtres survivantes ont été sacrifiées le 1^{er} août 2006 et la présence du parasite a été recherchée. La grande majorité des huîtres s'est révélée indemnes (88.7%), et très peu d'huîtres se sont révélées BO⁺⁺⁺ (0.2%). Le niveau d'infection des deux groupes d'huîtres (mortes et survivantes) était très différent, respectivement 80% et 11% d'huîtres positives à la détection de *Bonamia ostreae*. Pour les analyses génétiques, 92 huîtres ont été choisies au hasard dans les 5 raceways, la moitié mortes et BO⁺⁺⁺ et l'autre moitié survivantes et BO⁻. Le statut des huîtres vis-à-vis du parasite a été confirmé par PCR et les 92 individus F2, les 2 grands-parents et les deux parents ont été génotypés avec 20 microsatellites et 34 paires d'amorces AFLPs ayant produit 309 marqueurs.

Une première analyse marqueur par marqueur selon la stratégie de tests à plusieurs étages de Moen et al. (2004) a été réalisée pour identifier de potentiels QTLs de résistance à la bonamiose parmi les marqueurs AFLPs. Elle consiste en trois étapes successives.

Le premier test (test de déséquilibre de transmission TDT) vise à identifier les marqueurs distordus chez les huîtres infectées mortes. Après ce test, 144 marqueurs ont été gardés pour le second test (test de Ségrégation Mendélienne MST) qui a été réalisé sur l'ensemble des individus et permet d'éliminer les marqueurs distordus pour des raisons autres que le lien avec des gènes potentiellement impliqués dans la résistance ou la susceptibilité à la maladie. Les marqueurs non significatifs pour ce second test étaient au nombre de 26 et ont été conservés pour le troisième test, le test de survie proprement dit, parmi lesquels 15 se sont avérés significatifs, 9 correspondant à des présences de pics associées à une meilleure survie et 6 à une plus grande mortalité.

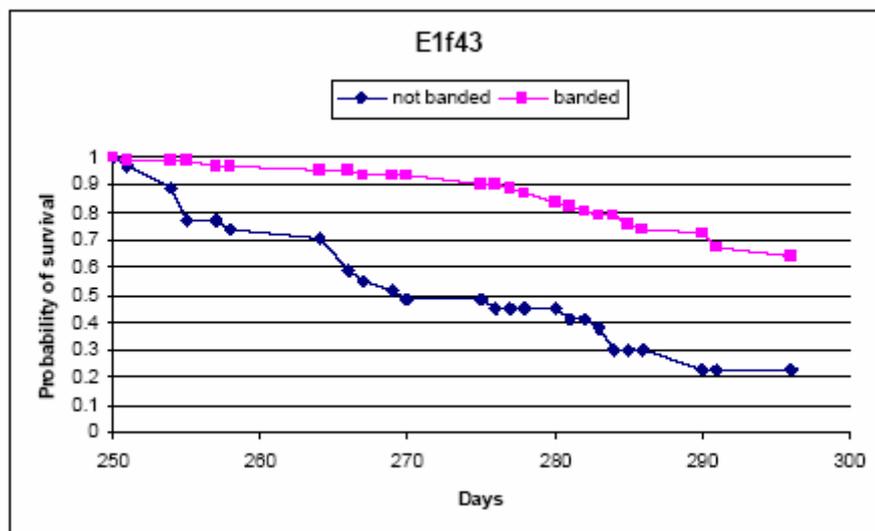


Figure 4.6. Courbes de survie de Kaplan-Meier pour un marqueur pour lequel la présence de la bande correspond à un allèle de résistance (augmentation de 33% de la survie avec la présence (banded) de la bande). Le nombre de jours correspond à ceux après le début de l'expérimentation.

Hériter l'allèle « bande présente » de ces marqueurs permet de réduire ou d'augmenter la mortalité de 24% à 45% selon les marqueurs. Les courbes de survie de Kaplan-Meier ont été construites d'après Moen et al. (2004) pour les deux groupes (bande présente et bande absente) en cumulant la proportion d'individus F2 toujours en vie au cours du temps (exemple Figure 4.6).

Après cette approche marqueur par marqueur, une carte génétique a été construite avec le logiciel Crimap avec tous les marqueurs microsatellites et AFLPs. Sept groupes homologues

ont pu être trouvés entre les cartes des deux parents. Une partie des 15 marqueurs identifiés précédemment comme liés à la mortalité ou la survie des huîtres ont pu être cartographiés. Chez un parent (410_7), 7 de ces 15 marqueurs ségrégeaient mais seulement 4 ont pu être cartographiés. Trois d'entre eux (dont la présence de la bande est associée à une meilleure survie) sont localisés sur le groupe G4_410_7 sur une zone de 14cM avec une même origine grand parentale. Chez l'autre parent (410_8), 12 parmi les 15 marqueurs ont pu être cartographiés (8 dont la présence de la bande est associée à une meilleure survie et 4 à une plus forte mortalité) sur seulement quatre groupes de liaison. Les 3 marqueurs sur G3_410_8 sont cartographiés dans une zone de 9 cM, les 3 sur G4_410_8 sont dans le même regroupement et les 5 sur G6_410_8 sont cartographiés dans une zone de 18 cM (Figure 4.7).

G6_410_8

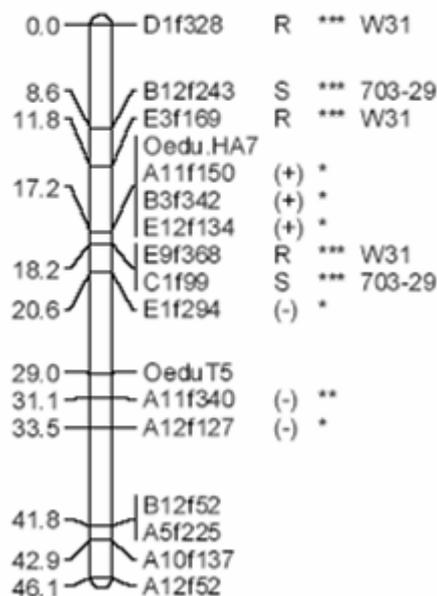


Figure 4.7. Exemple de localisation de 5 marqueurs associés à une meilleure survie ou plus forte mortalité sur le groupe de liaison 6 du parent 410_8. L'astérisque indique la direction ((+) pour un excès ou (-) pour un déficit d'homozygotes) de la distorsion de ségrégation avec la significativité du test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). R et S indiquent les marqueurs « résistants » ou « sensibles » d'après le test de survie de Moen et al. (2004) suivis du seuil de significativité et de l'origine grand parentale de la bande.

Il est particulièrement intéressant de noter que les marqueurs « résistants » sur un même groupe de liaison proviennent du même grand-parent tandis que les marqueurs sensibles

proviennent de l'autre grand-parent (respectivement W31 et 703-29 dans l'exemple du groupe G6_410_8).

Puis une analyse QTLs par l'approche de la cartographie des intervalles a été réalisée avec le logiciel QTL express. Quatre QTLs ont été identifiés sur 4 groupes de liaisons pour le parent 410_7 (Figure 4.8), un seul dépassant le seuil de significativité à $p < 0.01$ (seuil de 9.87), sur le groupe G2_410_7, les trois autres se situant sur les groupes G3_410_7, G4_410_7, et G6_410_7, le seuil à $p < 0.05$ étant tout justement dépassé pour les QTLs des deux derniers groupes (seuils respectivement à 6.63 et 6.65) respectivement

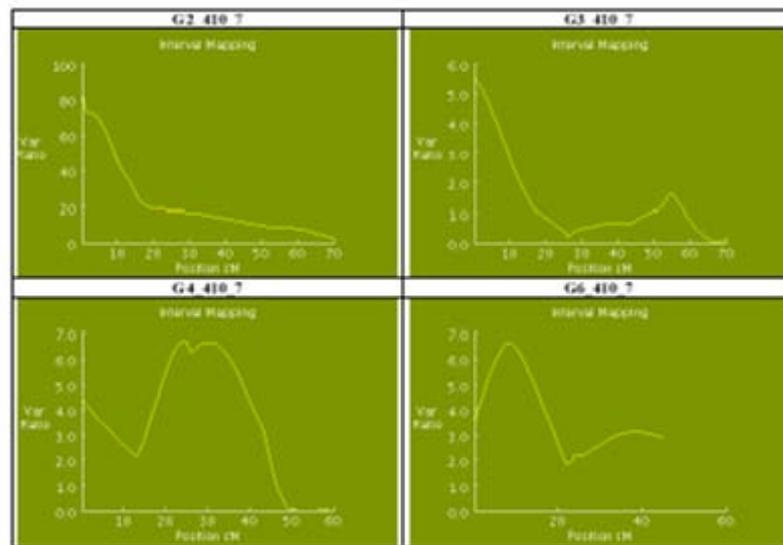


Figure 4.8. Position des QTLs détectés chez le parent 410_7 et ratio de variance associé.

Deux QTLs ont été identifiés sur 2 groupes de liaisons pour le parent 410_8 (Figure 4.9), un seul dépassant le seuil de significativité à $p < 0.01$ (seuil de 12.14), sur le groupe G6_410_8, l'autre se situant sur le groupe G3_410_8, le seuil à $p < 0.05$ étant tout justement dépassé (seuil de 7.22).

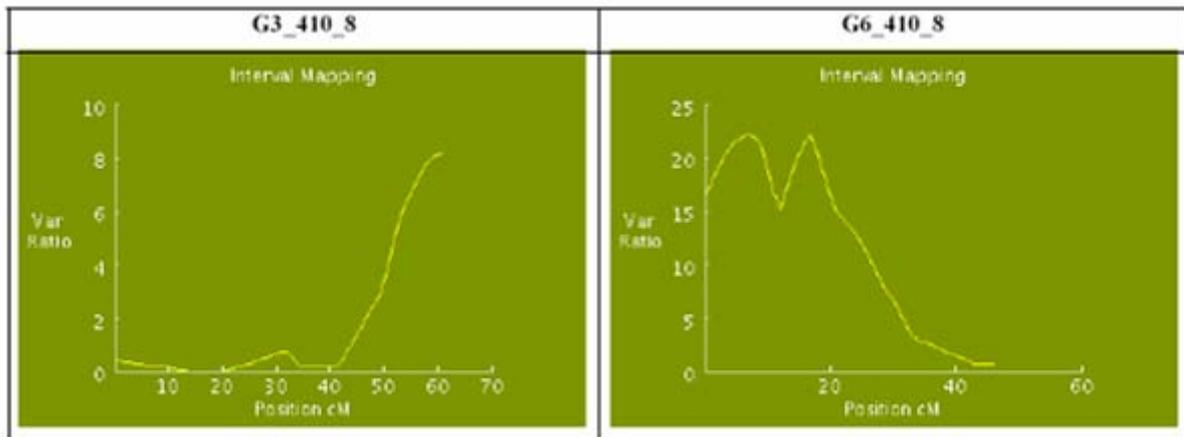


Figure 4.9. Position des QTLs détectés chez le parent 410_7 et ratio de variance associé.

En bref

Même si les niveaux de mortalité n'ont atteint que 20% dans notre expérimentation, celle-ci réalisée par cohabitation avec des huîtres surinfectées pour transmettre la maladie apparaît imiter au mieux la réalité biologique, dans un environnement toutefois particulier qu'est une éclosérie expérimentale. Dans ce cadre, de jeunes huîtres (de 1an) ont pu être infectées et ont subi des mortalités ce qui montre que les huîtres plates de cet âge peuvent être atteintes. Il est à noter que leur taille moyenne était de 4.9 cm, ce critère étant peut-être davantage à mettre en cause que l'âge dans la susceptibilité à la maladie. Malgré la faible puissance de notre expérimentation (92 individus analysés), des marqueurs ont pu être mis en évidence comme étant liés à une survie ou mortalité accrue. Par ailleurs, les QTLs identifiés après l'approche de cartographie par intervalles ont été localisés dans les mêmes régions que les marqueurs significatifs après l'analyse de survie. Même si ces résultats ont besoin d'être confirmés (ce qui est possible en partie par l'analyse d'un plus grand nombre d'individus et surtout l'ajout de marqueurs codominants pour améliorer l'analyse des groupes homologues), ils sont déjà particulièrement prometteurs quant à la confiance que nous pouvons avoir dans la réalité de ces QTLs.

4) A la recherche de QTLs de résistance à un épisode de mortalité estivale chez l'huître creuse

En 2006, les 6 familles F2 ont été marquées afin de pouvoir réaliser un suivi individuel de mortalité et une biopsie de branchie (pour analyse ADN). Cependant, avant que les biopsies

n'aient pu être faites, un épisode de mortalité brutal s'est produit dans les raceways de stockage de l'écloserie de La Tremblade (Figure 4.10).

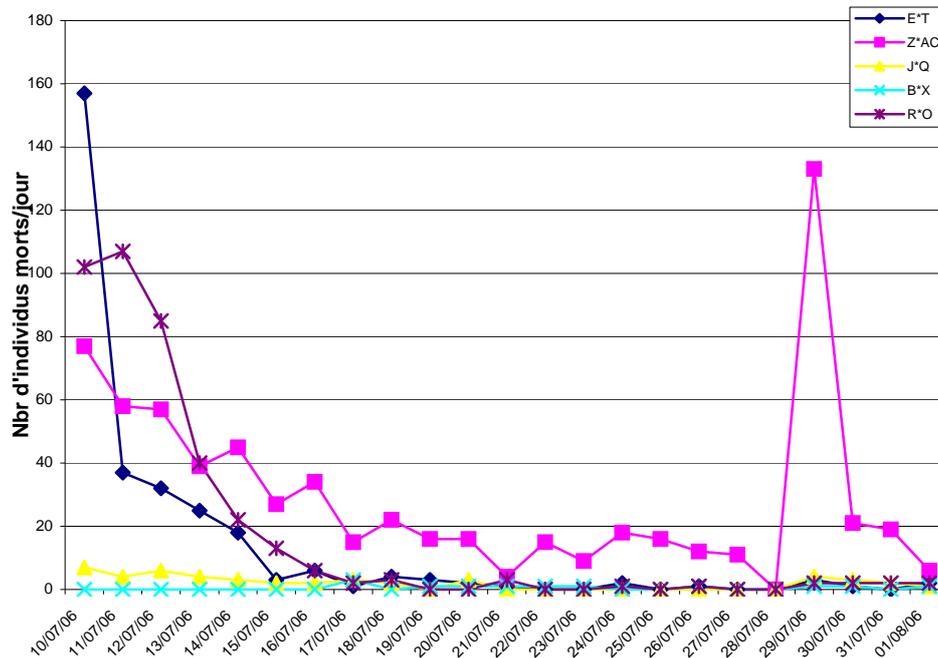


Figure 4.10. Cinétique de mortalité quotidienne au cours de l'été 2006 parmi les 5 familles F2 sélectionnées.

Cet épisode a été particulièrement important du 10 au 17 juillet avec cependant des comportements différents entre les familles F2. Ainsi, J1xQ1 et B2xX2 n'ont subi quasiment aucune mortalité alors que les familles R2xO2 et Z3xAC3 ont subi de très fortes mortalités en début d'épisode et la famille E4xT4 une mortalité importante au début mais également continue sur le mois de juillet avec un second épisode à la fin du mois. En cumulatif les familles ont subies des mortalités très différentielles : de 1.2% à 67% (Figure 1.11).

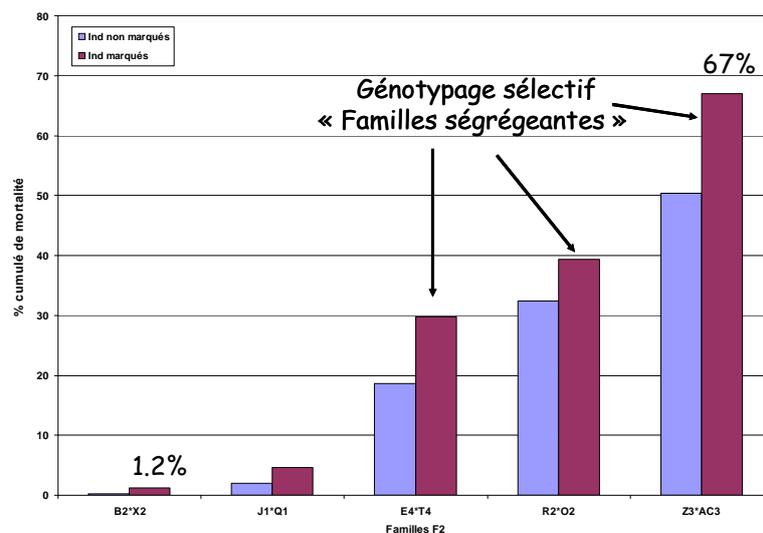


Figure 4.11. Mortalités cumulées dans les 5 familles F2.

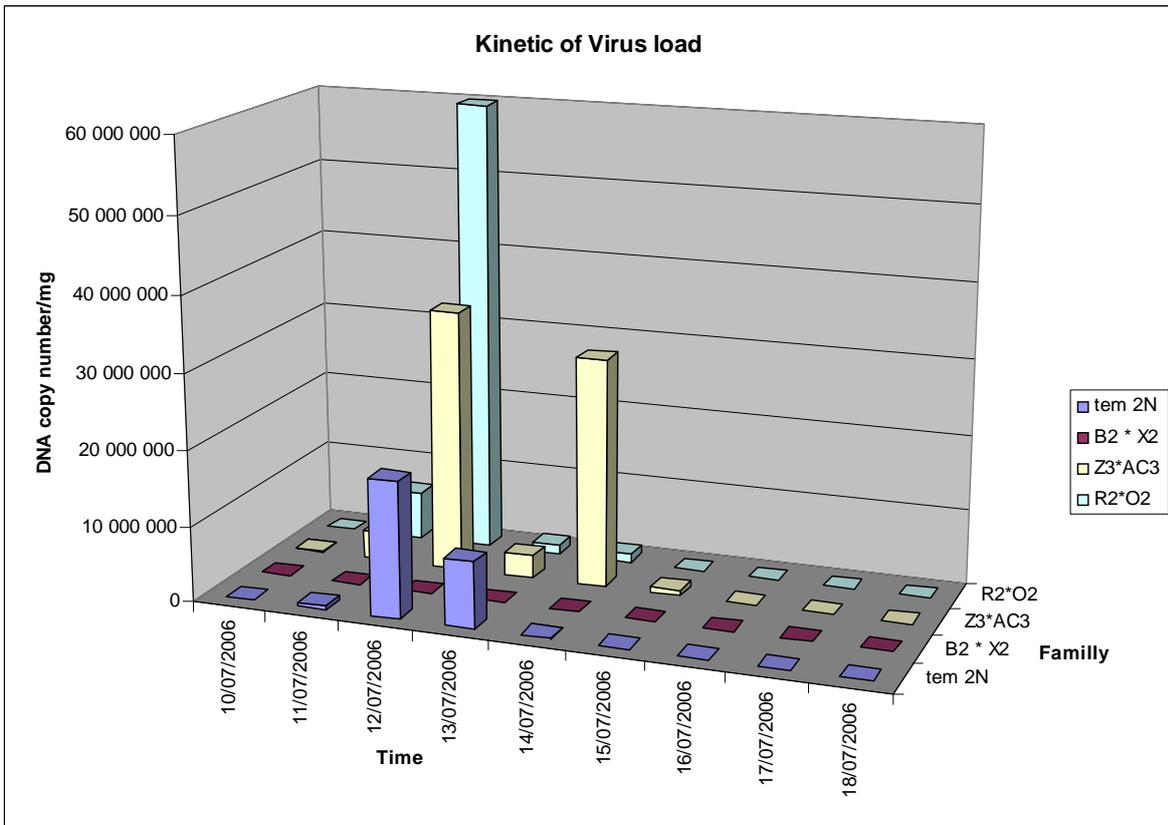


Figure 4.12. Charge virale (virus herpes) mesurées par PCRq dans trios des familles et un témoin lors de la première semaine de l'épisode de mortalité.

Cet épisode de mortalité s'avère tout à fait exploitable dans le cadre de notre recherche de QTLs de résistance au syndrome de mortalité estivale car de tels épisodes de mortalité en raceways avaient déjà été observés les années précédentes corrélées à des mortalités sur l'estran. Lors de cet épisode, les animaux ont été triés chaque jour et les animaux morts congelés pour une partie et au frais (4°C) pour une autre partie. Ceci a permis de réaliser des analyses pathologiques afin de déterminer la cause de ces mortalités. Les premières analyses montrent clairement une corrélation entre le taux de mortalité et la charge du virus herpes nommé OsHV-1 (ostreid herpes virus type 1) (Figure 4.12) : les familles avec une faible mortalité (telle que B2xX2) présentent des charges virales quasi-nulles, tandis que les familles avec une forte mortalité (telles que R2xO2 et Z3xAC3) montrent des charges virales de plusieurs millions de copies d'ADN viral par mg. Ce virus a été associé à des épisodes de mortalités estivales de *Crassostrea gigas* en France dès 1992 (Nicolas et al. 1992). Il a été isolé et caractérisé par la suite. L'ensemble de son génome ADN est aujourd'hui connu (Davison et al. 2005). A l'heure actuelle ce virus est le seul représentant de son groupe car il ne présente pas d'homologie de séquence avec les autres herpes. Le phénotypage par PCR quantitative de l'ensemble des trois familles finalement choisies pour l'analyse QTLs (Figure 4.11) est en cours de réalisation pour un sous échantillon de 150 animaux morts au début de l'épisode et 150 animaux ayant survécu (échantillonnage en octobre 2006) par famille. L'analyse QTLs sera donc réalisée par la méthode de génotypage sélectif.

En bref

La recherche de QTLs de résistance au syndrome de mortalité estivale est en cours de réalisation. Nous étudierons les caractères « mortalité » et « charge virale ». En effet, une forte corrélation est apparue entre le taux de mortalité et la charge en virus de type herpes au niveau familial, indiquant que ce virus est très certainement la cause principale de cet épisode de mortalité. Cet épisode de mortalité est apparu dans la période habituelle des « mortalités estivales ». Cependant, c'est la première fois qu'une corrélation aussi nette est observée entre ce phénomène et la présence très importante de ce virus de type herpes, en particulier depuis la mise en place d'une sélection expérimentale de résistance à ce syndrome. En effet, les conditions expérimentales précédentes n'avaient pas permis la recherche du virus. Le développement de la technique de PCR quantitative s'avère particulièrement utile dans ce cas-là, nous fournissant par ailleurs un caractère quantitatif à étudier. Ceci met à nouveau en évidence la difficulté d'étudier ce genre de caractère « survie/mortalité » et l'intérêt de détecter des marqueurs liés à ce type de caractères.

Conclusion

Ces travaux de recherche de QTLs sur l'huître plate et l'huître creuse ont montré qu'il est possible de détecter des QTLs même avec des cartes préliminaires et des effectifs expérimentaux relativement faibles. Cependant, cette détection est possible si l'on se place dans des conditions expérimentales propices, alors que le caractère étudié n'est pas toujours maîtrisé. C'est le cas chez l'huître plate, où l'infection par le parasite *Bonamia ostreae* n'est pas simple à faire (purification du parasite, injection, et bonnes conditions de développement de la maladie) en conditions expérimentales et la pression de sélection totalement incontrôlable en milieu naturel. Pour l'huître creuse, le syndrome de mortalité estivale reste une « boîte noire », sans aucune possibilité de prévoir quand il se produira, ni de pouvoir l'induire. La corrélation avec la présence d'herpès virus dans l'épisode étudié devrait nous permettre de tester des protocoles de challenge. Il reste également encore difficile de produire et maintenir le matériel biologique nécessaire malgré les atouts de nos espèces (nombreux effectifs, animaux immobiles, cycle court de reproduction, forte fécondité) à cause des contraintes zootechniques qui restent encore lourdes et pas toujours maîtrisées en particulier chez l'huître plate. Il apparaît maintenant nécessaire d'augmenter la densité de nos cartes génétiques ainsi que le nombre d'animaux analysés dans les familles ségrégeantes afin d'améliorer la puissance de détection des QTLs. Ceci est devenu réalisable avec les outils dont nous disposons actuellement (marqueurs et plate-forme de génotypage au sein de notre laboratoire). L'approche suivante sera de confirmer ces QTLs dans d'autres matériels ségrégeants pour éviter de travailler sur des QTLs trop spécifiques.

PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux de recherche que j'ai réalisés, encadrés ou co-encadrés, ou bien encore auxquels j'ai participé, peuvent être classés dans trois grands domaines de la génétique: la cytogénétique, la génétique des populations et l'amélioration génétique. Le premier domaine n'est pas du tout ma spécialité mais je m'y suis intéressée dans le cadre de l'étude de la caractérisation de populations d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, en termes d'aneuploïdie. Ceci était en grande partie motivé par le fait que ce caractère est négativement corrélé avec la croissance, caractère particulièrement important en amélioration même si ce n'est pas le premier qui préoccupe les ostréiculteurs français. J'ai souhaité que ma contribution s'inscrive dans la caractérisation des populations locales (Bassin de Marennes-Oléron principalement) avec le souci de rechercher d'éventuels impacts environnementaux (polluants en particulier) sur ce caractère. Les résultats de ces travaux ont ouvert des pistes de réflexion sur l'impact de l'environnement sur l'aquaculture (alors que l'on s'intéresse le plus souvent à l'impact de l'aquaculture sur l'environnement !) mais des recherches complémentaires restent nécessaires que des outils en développement dans l'équipe devraient permettre de réaliser. Mon action dans ce domaine sera plus éloignée sous forme d'intégration entre les cartes génétiques auxquelles je participe et les futures cartes physiques en cours d'élaboration.

Mon action en génétique des populations va se poursuivre sous deux aspects. Tout d'abord, la connaissance de la diversité génétique des populations sur leur aire de répartition sera développée pour les huîtres plates grâce à des collaborations, en cours ou en développement, pour des actions d'échantillonnage en Méditerranée est et Mer Noire et de caractérisation génétique, avec des partenaires Turques ou russes par exemple, ou dans le cadre de réseaux d'excellence comme MARBEF (Marine Biodiversity and Ecosystem Functioning). Cette approche de la caractérisation des ressources génétiques au niveau de l'aire de répartition se traduit pour l'huître creuse par une interrogation sur son caractère invasif dans le nord de l'Europe du Nord, mais aussi la Méditerranée où elle se reproduit désormais (côtes françaises et tunisiennes). Des collaborations se mettent actuellement en place avec d'autres chercheurs français mais aussi étrangers qui se posent le même genre de questions sur d'autres espèces marines côtières, afin de développer un projet qui permettrait de quantifier la part adaptative responsable du succès de ces espèces, en utilisant une nouvelle méthode de génomique des populations, dite du «genome scan». A une échelle plus réduite, qui est celle de la population pour les huîtres plates, des études vont se poursuivre afin de mieux appréhender la dynamique

des populations, en ce qui concerne en particulier la variation du succès reproducteur chez cette espèce, mais également chez l'huître creuse à l'échelle des bassins producteurs de naissains (Marennes-Oléron en particulier) afin de caractériser la diversité génétique des stocks de reproducteurs d'huîtres creuses.

Enfin, mon investissement dans la réalisation et l'utilisation de cartes génétiques pour la recherche de QTLs va se poursuivre car les premiers résultats sont particulièrement encourageants malgré les difficultés (gestion du matériel biologique, mesure des caractères d'intérêt) et les limitations (marqueurs dominantes, faibles effectifs). Chez l'huître plate, il va s'agir d'améliorer la carte génétique avec des marqueurs codominants et de tester les QTLs trouvés sur d'autres familles issues de notre programme expérimental de sélection, ou bien issues d'un fond génétique totalement différent (collaboration envisagée avec des collègues espagnols), et de déterminer l'intérêt de leur utilisation en sélection. Ceci devrait faire l'objet d'un prochain sujet de thèse. En ce qui concerne l'huître creuse, la densité de la carte est en cours d'amélioration avec également l'introduction de gènes candidats, ainsi que la recherche de QTLs. Là aussi, ces QTLs seront à tester sur d'autres familles et le projet Gigas+ de sélection à l'échelle nationale devrait nous donner un cadre particulièrement propice à l'étude de l'intérêt économique de l'intégration de l'utilisation de tels outils moléculaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agresti JJ, Seki S, Cnaani A, Poompuang S, Hallerman EM, Umiel N, Hulata G, Gall GAE, May B (2000) Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture* 185: 43-56
- Ahmed M, Sparks AK (1967) A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). *Journal of the Fisheries Research board of Canada* 24: 2155-2159
- Ahmed M, Sparks AK (1970) Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Biological Bulletin Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 138: 1-13
- 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
- Amiard-Triquet C, Altmann S, Amiard JC, Ballan-Dufrancais C, Baumard P, Budzinski H, Crouzet C, Garrigues P, His E, Jeantet AY, Menasria R, Mora P, Mouneyrac C, Narbonne JF, Pavillon JF (1998) Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France: a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia* 374: 259-279
- Arnason E (2004) Mitochondrial cytochrome b DNA variation in the high fecundity Atlantic cod: Trans-atlantic clines and shallow gene genealogy. *Genetics* 166: 1871-1885
- Beaumont AR, Fairbrother JE, Hoare K (1995) Multilocus heterozygosity and size - a test of hypotheses using triploid *Mytilus edulis*. *Heredity* 75: 256-266
- Beaumont AR, Gruffydd DT (1974) Studies on the chromosomes of the scallop *Pecten maximus* (L.) and related species. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54: 713-718
- 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
- Biradar DP, Rayburn AL (1995) Flow cytogenetic analysis of whole cell clastogenicity of herbicides found in groundwater. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28: 13-17
- Bond DJ, Chandley AC (1983) Aneuploidy. Oxford University Press, Oxford
- 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
- Boutier B, Chiffolleau JF, Gonzales JL, Lazure P, Auger D, Truquet L (2000) Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the coastal waters: consequences on the Marennes-Oléron bay (France). *Oceanologica Acta* 23: 747-757
- Caceres-Martinez J, Robledo JAF, Figueras A (1995) Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria De Vigo, Galicia (Nw Spain). *Aquaculture* 130: 15-23
- Carnegie RB, Barber BJ, Distel DL (2003) Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent in situ hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 247-252
- Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, van Wijk R, Motto M (1999) AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 425-431
- CEE (1991) Directive 91/67/CEE du Conseil du 28 janvier 1991 relative aux conditions de police sanitaire régissant la mise sur le marché d'animaux et de produits d'aquaculture. Office des publications officielles des Communautés européennes
- Coan EV, Valentich Scott P, Bernard FR (2000) Bivalve seashells of western North America. Marine bivalve mollusks from Arctic Alaska to Baja California. Santa Barbara Museum of Natural History Monographs N°2, Santa Barbara
- 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 MA, Pernot AF, Jarne P (1997) Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution* 51: 1318-1322
- Davison AJ, Trus BL, Cheng NQ, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Deuff RM, Renault T (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* 86: 41-53
- Degremont L, Bedier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, Samain JF, Boudry P (2005) Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 249: 213-229
- Degremont L, Ernande B, Bedier E, Boudry P (2007) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* 262: 41-53

- Dixon DR (1982) Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. *Marine Biology Letters* 3: 155-161
- Dixon DR, Wilson JT (2000) Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia* 420: 29-43
- Duchesne P, Godbout MH, Bernatchez L (2002) PAPA (package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Molecular Ecology Notes* 2: 191-193
- Elston RA, Farley CA, Kent ML (1986) Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 49-54
- Flowers JM, Schroeter SC, Burton RS (2002) The recruitment sweepstakes has many winners: genetic evidence from the sea urchin *Stongylocentrotus purpuratus*. *Evolution* 56: 1445-1453
- Fu YB (1999) Patterns of the purging of deleterious genes with synergistic interactions in different breeding schemes. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 337-346
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 16: 501-512
- Gérard A, Ledu C, Phelipot P, Naciri-Graven Y (1999) The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. *Aquaculture* 174: 229-242
- Giacomazzi S, Cochet N (2004) Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56: 1021-1032
- Gong N, Yang H, Zhang G, Landau BJ, Guo X (2004) Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Heredity* 93: 408-415
- Guo XM, Allen SK (1994) Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 42-50
- Guo XM, Hershberger WK, Cooper K, Chew KK (1993) Artificial gynogenesis with ultraviolet light irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* .1. Induction and Survival. *Aquaculture* 113: 201-214
- Harry HW (1985) Synopsis of the supraspecific classification of living oysters (Bivalvia, Gryphaeidae and Ostreidae). *Veliger* 28: 121-158
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 5476-5480
- Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms ? In: A.R. B (ed) *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman et Hall, Londres, pp 122-134
- Hedrick P (2005) Large variance in reproductive success and the N-e/N ratio. *Evolution* 59: 1596-1599
- Hervio D, Bachere E, Boulo V, Cochennec N, Vuillemin V, Lecoguc Y, Cailletaux G, Mazurie J, Mialhe E (1995) Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae* - Application in the selection of parasite resistant oysters. *Aquaculture* 132: 183-194
- His E, Robert R (1986) Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. *Haliotis* 15: 301-308
- Hubert S, Hedgecock D (2004) Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* 168: 351-362
- Insua A, Labat JP, Thiriouquieuvreux C (1994) Comparative analysis of karyotypes and nucleolar organizer regions in different populations of *Mytilus trossulus*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Molluscan Studies* 60: 359-370
- Jaziri H (1990) Variations génétiques et structuration biogéographique chez un bivalve marin: l'huître plate *Ostrea edulis* L. Thèse de doctorat, Montpellier, France
- Jozefowicz CJ, O'Foighil D (1998) Phylogenetic analysis of southern hemisphere flat oysters based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 426-435
- Kenchington E, Bird CJ, Osborne J, Reith M (2002) Novel repeat elements in the nuclear ribosomal RNA operon of the flat oysters *Ostrea edulis* C. Linnaeus, 1758 and *O. angasi* Sowerby, 1871. *Journal of Shellfish Research* 21: 697-705
- Kirkendale L, Lee T, Baker P, O'Foighil D (2004) Oysters of the Conch Republic (Florida Keys): A molecular phylogenetic study of *Parahyotissa mcgintyi*, *Teskeyostrea weberi* and *Ostreola equestris*. *Malacologia* 46: 309-326
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De Boeck M, Decordier I (2002) Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 504: 137-148
- Knapik EW, Goodman A, Ekker M, Chevrette M, Delgado J, Neuhauss S, Shimoda N, Driever W, Fishman MC, Jacob HJ (1998) A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics* 18: 338-343
- 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, Naciri-Graven Y (2002) Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *Journal of Heredity* 93: 331-338
- Leitao A, Boudry P, McCombie H, Gérard A, Thiriou-Quévieux C (2001a) Experimental evidence for a genetic basis to differences in aneuploidy in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquatic Living Resources* 14: 233-237
- Leitao A, Boudry P, Thiriou-Quévieux C (2001b) Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genome* 44: 735-737
- Leitao A, Boudry P, Thiriou-Quévieux C (2001c) Negative correlation between aneuploidy and growth in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: ten years of evidence. *Aquaculture* 193: 39-48
- Li G, Hedgecock D (1998) Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 1025-1033
- Li L, Guo XM (2004) AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Marine Biotechnology* 6: 26-36
- Li L, Xiang JH, Liu X, Zhang Y, Dong B, Zhang XJ (2005) Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. *Aquaculture* 245: 63-73
- Li XX, Havenhand JN (1997) Karyotype, nucleolus organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): Evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. *Marine Biology* 127: 443-448
- Li YT, Byrne K, Miggiano E, Whan V, Moore S, Keys S, Crocos P, Preston N, Lehnert S (2003) Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture* 219: 143-156
- Li ZX, Li J, Wang QY, He YY, Liu P (2006) AFLP-based genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis*. *Aquaculture* 261: 463-472
- Liu XD, Liu X, Guo XM, Gao QK, Zhao HG, Zhang GF (2006) A preliminary genetic linkage map of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Marine Biotechnology* 8: 386-397
- Liu ZJ, Karsi A, Li P, Cao DF, Dunham R (2003) An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. *Genetics* 165: 687-694
- Longwell AC, Stiles SS, Smith DG (1967) Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica* as seen in meiotic and cleaving eggs *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 9: 845-856
- Martin RH, Rademaker A (1990) The Frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenetics and Cell Genetics* 53: 103-107
- Martinez-Exposito MJ, Martinez-Lage A, Pasantes JJ, Mendez J (1992) A preliminary study of aneuploidy in natural populations in the genus *Mytilus*. *Cuad. Area Cienc. Mar. Semin. Estud. Galegos* 6: 49-55
- McGoldrick DJ, Hedgecock D (1997) Fixation, segregation and linkage of allozyme loci in inbred families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): Implications for the causes of inbreeding depression. *Genetics* 146: 321-334
- Miller PS, Hedrick PW (2001) Purging of inbreeding depression and fitness decline in bottlenecked populations of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 595-601
- Miramand P, Guyot T, Pigeot J, Bustamante P, Caurant F, Ferchaud R (2000) Le cadmium dans les réseaux trophiques marins : de la source aux consommateurs. *Journal Européen d'Hydrologie* 31: 127-143
- Miramand P, Pigeot J, Guyot T, Fichet D (1999) Ecotoxicologie intégrée : de l'espèce à l'écosystème. *Oceanis* 25: 581-608
- Moberg PE, Burton RS (2000) Genetic heterogeneity among adult and recruit red sea urchins, *Strongylocentrotus franciscanus*. *Marine Biology* 136: 773-784
- Moen T, Fjalestad KT, Munck H, Gomez-Raya L (2004) A multistage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. *Genetics* 167: 851-858
- Moore SS, Whan V, Davis GP, Byrne K, Hetzel DJS, Preston N (1999) The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 173: 19-32
- Moraga D, Tanguy A (2000) Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 706-711
- Morton BR, Lam K, Black-Smith S (2003) First report of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, identified genetically from oyster harbour, Albany, south-western Western Australia. *Molluscan Research* 23: 199-208
- Munaron D, Dubernet JF, Delmas F, Stanisiere JY, Scribe P (2006) Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oleron bay. *Cahiers De Biologie Marine* 47: 85-92

- Munaron D, Scribe P, Dubernet JF, Kantin R, Vanhoutte A, Fillon A, Bacher C (2003) Estimation of herbicide inputs in a sensitive area on the Atlantic coast: Marennes-Oléron bay (France). Proceedings of the XII Symposium Pesticide Chemistry: 717-726.
- Munaron D, Scribe P, Dubernet JF, Stanisiere JY (2004) Rapport d'avancement concernant les actions 1 et 8 (Action 1 : Recherche multirésidus et détermination des flux de produits phytosanitaires et Action 8 : Modélisation hydrodynamique des apports en herbicides au bassin de Marennes-Oléron). PEVS (Programme Environnement Vie et Sociétés) : 13 p.
- Munoz I, Real M, Guasch H, Navarro E, Sabater S (2001) Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure. *Aquatic Toxicology* 55: 239-249
- Munsch C (1995) Comportement géochimique des herbicides et de leurs produits de dégradation en milieu estuarien et marin côtier. Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI. 263p.
- Natarajan AT, Duivenvoorden WCM, Meijers M, Zwanenburg TSB (1993) Induction of mitotic aneuploidy using Chinese hamster primary embryonic cells - Test-Results of 10 Chemicals. *Mutation Research* 287: 47-56
- Newkirk GF, Haley LE (1982) Progress in selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 10: 77-79
- Newkirk GF, Muise BC, Enright CE (1995) Culture of the Belon oyster, *Ostrea edulis*, in Nova Scotia. In: Boghen AD (ed) Cold water aquaculture in Atlantic Canada (2nd ed.). The Printing Press, Sackville, New Brunswick, pp 226-253
- Nicolas J-L, Comps M, Cochennec N (1992) Herpes like Virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists* 12: 11-13
- O'Foighil D, Marshall BA, Hilbish TJ, Pino MA (1999) Trans-pacific range extension by rafting is inferred for the flat oyster *Ostrea chilensis*. *Biological Bulletin* 196: 122-126
- Perez-Rostro CI, Ibarra AM (2003) Quantitative genetic parameter estimates for size and growth rate traits in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone 1931) when reared indoors. *Aquaculture Research* 34: 543-553
- Planes S, Lenfant P (2002) Temporal change in the genetic structure between and within cohorts of a marine fish, *Diplodus sargus*, induced by a large variance in individual reproductive success. *Molecular Ecology* 11: 1515-1524
- Ranson G (1967) Les espèces d'huîtres vivant actuellement dans le monde, définies par leurs coquilles larvaires ou prodissoconques. Etude des collections de quelques-uns des grands musées d'histoire naturelle. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 31: 127-274
- Robert R, His E (1985) Combined effects of salinity and cadmium chloride upon embryos and larvae of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 15: 303-312
- Robert R, His E, Maurer D (1986) Toxicité d'un désherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages, *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Haliotis* 15: 319-325
- Ruzzante DE, Taggart CT, Cook D (1996) Spatial and temporal variation in the genetic composition of a larval cod (*Gadus morhua*) aggregation: cohort contribution and genetic stability. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 2695-2705
- 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
- Saavedra C, Zapata C, Guerra A, Alvarez G (1993) Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* 115: 85-95
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning ZM, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann NS, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928-933
- Sakamoto T, Danzmann RG, Okamoto N, Ferguson MM, Ihssen PE (1999) Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 173: 33-43
- Seoane AI, Guerci AM, Dulout FN (2000) Mechanisms involved in the induction of aneuploidy: the significance of chromosome loss. *Genetics and Molecular Biology* 23: 1077-1082
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K (2005) Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research* 24: 197-207
- Steinert SA, Streib-Montee R, Leather JM, Chadwick DB (1998) DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399: 65-85

- Tenaillon MI, Sawkins MC, Long AD, Gaut RL, Doebley JF, Gaut BS (2001) Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp *mays* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 9161-9166
- Thiriou-Quiévreux C (1984) Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia:Mytilidae). *Marine Biology Letters* 5: 265-263
- Thiriou-Quiévreux C (1986) Etude de l'aneuploidie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70: 225-231
- Thiriou-Quiévreux C, Ayraud N (1982) Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. *Marine Biology* 70: 165-172
- Thiriou-Quiévreux C, Noël T, Bougrier S, Dallot S (1988) Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 75: 89-96
- Thiriou-Quiévreux C, Pogson GH, Zouros E (1992) Genetics of growth rate variation in bivalves: aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. *Genome* 35: 39-45
- Turner TF, Wares JP, Gold JR (2002) Genetic effective size is three orders of magnitude smaller than adult census size in an abundant, estuarine-dependent marine fish (*Sciaenops ocellatus*). *Genetics* 162: 1329-1339
- Visscher PM, Haley CS, Knott SA (1996) Mapping QTLs for binary traits in backcross and F-2 populations. *Genetical Research* 68: 55-63
- Waldbieser GC, Bosworth BG, Nonneman DJ, Wolters WR (2001) A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Genetics* 158: 727-734
- Wang LL, Song LS, Chang YQ, Xu W, Ni DJ, Guo XM (2005) A preliminary genetic map of Zhikong scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston 1904). *Aquaculture Research* 36: 643-653
- Wang S, Bao ZM, Pan B, Zhang LL, Yao B, Zhan AB, Bi K, Zhang QQ (2004) AFLP linkage map of an intraspecific cross in *Chlamys farreri*. *Journal of Shellfish Research* 23: 491-499
- Wang Z, Guo XM, Allen SK, Wang R (1999) Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. *Aquaculture* 173: 347-357
- Waples RS (2002) Evaluating the effect of stage-specific survivorship on the N-e/N ratio. *Molecular Ecology* 11: 1029-1037
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370
- Williams JG (1975) *Sex and evolution*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Wilson K, Li YT, Whan V, Lehnert S, Byrne K, Moore S, Pongsomboon S, Tassanakajon A, Rosenberg G, Ballment E, Fayazi Z, Swan J, Kenway M, Benzie J (2002) Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture* 204: 297-309
- Yang H, Zhang F, Guo XM (2000) Triploid and tetraploid Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones and Preston, produced by inhibiting polar body I. *Marine Biotechnology* 2: 466-475
- Young WP, Wheeler PA, Coryell VH, Keim P, Thorgaard GH (1998) A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* 148: 839-850
- Yu ZN, Guo XM (2003) Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Biological Bulletin* 204: 327-338
- Zhou ZC, Bao ZM, Dong Y, Wang S, He CB, Liu WD, Wang LM, Zhu F (2006) AFLP linkage map of sea urchin constructed using an interspecific cross between *Strongylocentrotus nudus* (female) and *S. intermedius* (male). *Aquaculture* 259: 56-65
- Zouros E, Thiriou-Quiévreux C, Kotoulas G (1996) The negative correlation between somatic aneuploidy and growth in the oyster *Crassostrea gigas* and implications for the effects of induced polyploidization. *Genetical Research Cambridge* 68: 109-116

Curriculum vitae détaillé



Sylvie Lapègue

Docteur en génétique des populations et amélioration génétique,
Ingénieur agronome

née le 3 août 1970,
Nationalité française,
mariée, deux enfants
adresse personnelle :
32 ter avenue de villeneuve
17 620 Saint Agnant
tel: 05 46 84 87 57
slapegue@wanadoo.fr

Laboratoire Génétique et
Pathologie
Avenue de mus de Loup
Ronce-les-Bains
17390 La Tremblade
tel : 05 46 76 26 31
fax : 05 46 76 26 11
slapegue@ifremer.fr

FORMATION ET DIPLOMES

1994-1998: Thèse de Doctorat, option Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes de la Faculté d'Orsay (Paris XI). Obtention du **doctorat** avec Félicitations du jury.

1993-1994: D.E.A.: Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes: Formation en génétique quantitative et génétique des populations. Obtention du **D.E.A.** avec Mention Bien et du Diplôme d'**Ingénieur Agronome** de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier.

1991-1993: Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. Formation d'ingénieur agronome.

1988-1991 : Classes préparatoires aux grandes écoles (Biologie et Mathématiques Supérieures, Lycée Michel Montaigne, Bordeaux)

1988 : **Baccalauréat Série C**, mention AB (Bordeaux).

ACTIVITES DE RECHERCHE

Depuis 1998: Cadre de recherche à Ifremer, au laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade, en génétique des populations et amélioration chez les mollusques bivalves, et plus particulièrement les huîtres plates, *Ostrea edulis*, et creuses, *Crassostrea gigas*.

Activités principales :

Montage, réalisation et valorisation de projets scientifiques

- Niveau national

1997-1999 : projet financé par le Bureau des Ressources Génétiques intitulé « Etude de la structuration géographique de la diversité génétique de l'huître plate *Ostrea edulis* à l'aide de marqueurs microsatellites et mitochondriaux ».

2001-2003 : projet financé par le PEVS « Devenir des contaminants dans l'environnement et effets sur les écosystèmes ». Etude sur l'impact des micropolluants (métaux lourds et phytosanitaires) sur le fonctionnement d'un écosystème : application sur la vasière de la zone intertidale du bassin de Marennes-Oléron.

2001-2003 : projet financé par l'appel d'offres de l'Institut Français de la biodiversité intitulé « Diversité génétique et dynamique du recrutement chez l'huître plate, *Ostrea edulis* ».

2001-2003 : projet financé par le Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires rurales et le Syndicat Professionnel des Ecloseries et Nurseries de Coquillages intitulé « Dispositif de Biovigilance : Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage de Marennes-Oléron et Arcachon ».

2002-2004 : projet financé par l'appel d'offres géré par le CNRS « Impact des biotechnologies dans les agro-écosystèmes » intitulé « Impact de la dissémination accidentelle des huîtres tétraploïdes : potentiel de dispersion et succès reproducteur ».

2006-2007 : projet financé par l'ANR GENANIMAL, intitulé Cg Physiogene - Bases moléculaires des fonctions physiologiques de l'huître *Crassostrea gigas* : interactions hôte/pathogène/milieu.

- Niveau européen

2004-2007 : projet financé par le FP6 intitulé « Aquafirst – Combined genetic and functional genomic approaches for stress and disease resistance marker assisted selection in fish and shellfish », responsable du workpacakage WP4 « Characterization of SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) in stress/disease sensitive genes ».

2004-2008 : Réseau d'excellence financé par FP6 « MGE-Marine Genomics Europe ».

2004-2006 : Participation au projet européen financé par INTERREG IIIB « AAAG – Atlantic Arc Aquaculture Group ».

2004-2007 : Réseau d'excellence financé par le FP6 « MARBEF-Marine Biodiversity ».

2005-2007 : Action coordonnée financée par le FP6 intitulée « GENIMPACT – Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations – A European network », responsable de la tâche WP1.1 et organisation d'un workshop dans ce cadre.

2007-2009 : Participation actuelle aux projets européens financés par INTERREG IIIB « AAAG2 – Atlantic Arc Aquaculture Group ».

- Niveau international

Collaborations bilatérales dans le cadre de reproduction comparée et de l'hybridation par marqueurs génétiques de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* avec le Portugal (2000–2002), et dans le cadre de la génétique des populations de l'huître plate le Canada (2000–2004), la Turquie (2004–2006), la Tunisie (2005–2009), la Russie (2007–2009).

Encadrement ou co-encadrement scientifique de thèses et DEA

- Thèses

Karine Bouilly (2001–2004). Impact de facteurs environnementaux sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse Doctorat, Université de La Rochelle. Encadrement scientifique.

Delphine Lallias (2004–2007). Genome mapping in the oyster and the mussel. Université de Bangor. Co-encadrement scientifique.

Christopher Sauvage (2005–2008). Recherche de marqueurs génétiques liés à la résistance aux mortalités estivales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* – approche QTL. Université de La Rochelle. Co-encadrement scientifique.

Coralie Tacquet (2005–2008). Diversité et différenciation génétiques des populations de tortues franches (*Chelonia mydas*) dans le Sud-Ouest de l'océan Indien. Université de La Réunion. Co-encadrement scientifique.

Inès Ben Salah (2006–2009). Contribution à l'étude des Ostreidae des côtes tunisiennes. Thèse en co-tutelle entre les Universités de La Rochelle et de Sfax. Co-encadrement scientifique.

- DEA/DESS ayant poursuivi en thèse

Diaz Almeda E. (1999). Structuration génétique mitochondriale chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. le long des côtes européennes et comparaison avec la différenciation nucléaire.

DEA Biologie de l'Evolution et Ecologie, Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.

- Fabioux C. (2000). Différenciation génétique et hybridation entre les populations naturelles d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*. DEA de l' Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer. (participation 50%)
- Bouilly K. (2001). Pollution et taux d'aneuploïdie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : étude expérimentale sur une population en milieu contrôlé. DEA EDEL de l'Université de La Rochelle.
- Da Silva S. (2001). La variabilité génétique chez l'huître plate *Ostrea edulis* (L. 1758) : inférence du nombre de géniteurs instantané d'une population. DEA Biologie de l'Evolution et Ecologie. Université de Montpellier II. (participation 50%)
- Taris N. (2002). Diversité génétique et dynamique du recrutement chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. DESS Gestion de la biodiversité, méthodologies et valorisation des ressources génétiques. Université Pierre et Marie Curie – Paris 6.
- Ben Salah I. (2003). Caractérisation moléculaire d'une population tunisienne d'Ostreidae. DEA de l'Université de Sfax.
- Bonnard M. (2004). Impact de pesticides sur le génome d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. DESS Sciences Naturelles, Université de Bordeaux I.
- Chupeau G. (2005). Identification de polymorphismes de gènes chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. et variabilité au sein de populations européennes. Master 2, Biologie Intégrative et Moléculaire, Université de Versailles.

Encadrements d'étudiants en maîtrise (1 en 1999, 2 en 2001, 1 en 2002, 2 en 2003, 1 en 2004), IUT (1 en 2001, 2 en 2006, 1 en 2007), licence (1 en 2005), 2^{ième} année d'ingénieur agronome (2 en 2004), formation de vétérinaire (1 en 2002).

Gestion de la recherche

- Responsabilité de la gestion de 5 actions de recherche au sein d'Ifremer dans le thème III « Surveillance et optimisation des ressources aquacoles »:
« Interactions génétiques entre élevage et ressource » et « Gestion de la biodiversité aquacole » dans le programme « Durabilité des systèmes de production »
« STREP européen Aquafirst », « Interreg AAAG2 » et « Réseau d'excellence Marine Genomics Europe » pour le « Fish and Shellfish node » dans le programme « Qualité des procédés et des produits ».
- Participation au comité de gestion du laboratoire et à l'interim du chef de station.
- Suppléante à la commission de spécialistes CS08 de l'Université de La Rochelle.

1994-1998: Travail de thèse sur « la Variabilité chloroplastique et mitochondriale chez les chênes blancs européens à deux échelles spatiales », Station de Recherches Forestières, Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers (INRA Bordeaux- Cestas).

1994 (6 mois): Stage de D.E.A., « Etude génétique des caractéristiques biochimiques liées à la qualité d'une descendance d'haploïdes doublés de blé tendre », Station d'Amélioration des plantes (INRA Clermont-Ferrand).

Publications (Facteur d'impact de 2006)

S. Dumolin, B. Demesure, et R. J. Petit, 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* (2,7), 91: 1253-1256.

S. Dumolin-Lapègue, C. Bodénès, et R. J. Petit, 1996. Detection of rare polymorphisms in mitochondrial DNA of oaks with PCR-RFLP combined to SSCP analysis. *Forest Genetics (non référencé)*, 3: 227-230.

S. Dumolin-Lapègue, M.-H. Pémonge, et R. J. Petit, 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants, 1997. *Molecular Ecology* (4,8), 6: 393-397.

V. Le Corre, **S. Dumolin-Lapègue**, et A. Kremer, 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Molecular Ecology* (4,8), 6: 519-529.

S. Dumolin-Lapègue, B. Demesure, S. Fineschi, V. Le Corre, et R. J. Petit, 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* (4,2), 146: 1475-1487.

S. Dumolin-Lapègue, M.-H. Pémonge, et R. J. Petit, 1998. Association between chloroplast and mitochondrial lineages in oaks. *Molecular Biology and Evolution* (6,7), 15 (10): 1321-1331.

S. Dumolin-Lapègue, A. Kremer et R. J. Petit, 1999. Are chloroplast and mitochondrial DNA variation species independent in oaks ? *Evolution* (4,3), 53 (5): 1406-1413.

S. Dumolin-Lapègue, R. J. Petit, L. Gielly, P. Taberlet, 1999. Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. *Molecular Ecology* (4,8), 8 (12): 2137-2140.

1. A. Huvet, **S. Lapègue**, A. Magoulas, P. Boudry, 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation genetics* (1,4), 1(3): 251-262.

Petit RJ, Csaikl U, Bordacs S, Burg K, Coart E, Cottrell J, van Dam B, Deans JD, **Dumolin-Lapègue S**, Fineschi S, Finkelday R, Gillies A, Glaz I, Goicoechea PG, Jensen JS, König A, Lowe AJ, Madsen SF, Mátyás G, Munro RC, Olalde M, Pemonge M-H, Popescu F, Slade D, Tabbener H, Turchini D, de-Vries SGM, Ziegenhagen B, Kremer A, 2002. Chloroplast DNA variation in European white oaks – Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* (1,8), 156(1-3): 5-26.

2. **S. Lapègue**, I. Boutet, A. Leitao, S. Heurtebise, P. Garcia, C. Thiriot-Quiévreux, P. Boudry, 2002. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. *Biological Bulletin* (1,6), 202: 232-244.
3. C. Fabioux, A. Huvet, **S. Lapègue**, S. Heurtebise, P. Boudry, 2002. Past and present geographical distribution of populations of portuguese (*Crassostrea angulata*) and

Pacific (*C. gigas*) oysters along the European and north African Atlantic coasts. *Haliotis (non référencé)*, 31: 33-44.

4. B. Gagnaire, T. Renault, K. Bouilly, **S. Lapègue**, H. Thomas-Guyon, 2003. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Current Pharmaceutical Design* (5,3), 9: 193-199.
 5. K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, **S. Lapègue**, 2003. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* (2,2), 22(1): 219-223.
- M.-F. Deguilloux, **S. Dumolin-Lapègue**, L. Gielly, D. Grivet, R.J. Petit, 2003. A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes* (1,2), 3, 24-27.
6. P. Boudry, S. Heurtebise, **S. Lapègue**, 2003. Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed *Crassostrea gigas* and *C. angulata* specimens: a new oyster species in Hong Kong ? *Aquaculture* (2,1), 228: 15-25.
 7. A. Huvet, C. Fabioux, H. McCombie, **S. Lapègue**, P. Boudry, 2004. Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine Ecology Progress Series* (2,3), 272: 141-152.
 8. K. Bouilly, H. McCombie, A. Leitão, **S. Lapègue**, 2004. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* (1,7), 145(4): 699-705.
 9. E. Diaz-Almela, P. Boudry, S. Launey, F. Bonhomme, **S. Lapègue**, 2004. Reduced gene flow in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Heredity* (1,9), 95(6):510-516.
 10. **S. Lapègue**, F. Batista, S. Heurtebise, Z. Yu, P. Boudry, 2004. Evidence for the presence of the Portuguese oyster, *C. angulata*, in Northern China. *Journal of Shellfish Research* (0,9), 23(3): 759-763.
 11. K. Bouilly, A. Leitão, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry, **S. Lapègue**, 2005. Endonuclease banding reveals that atrazine-induced aneuploidy resembles spontaneous chromosome loss in *Crassostrea gigas*, *Genome* (2), 48(1): 177-180.
 12. H. McCombie, **S. Lapègue**, F. Cornette, C. Ledu, P. Boudry, 2005. Chromosome loss in bi-parental progenies of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Aquaculture* (2,1), 247: 97-105.
 13. H. McCombie, C. Ledu, P. Phelipot, **S. Lapègue**, A. Gérard, 2005. A complementary method for production of tetraploid *Crassostrea gigas* using crosses between diploids and tetraploids with Cytochalasin B treatments, *Marine Biotechnology* (2,4), 7, 318-330.

14. K. Bouilly, B. Gagnaire, M. Bonnard, H. Thomas-Guyon, T. Renault, P. Miramand, **S. Lapègue**, 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Aquatic toxicology* (3), 78 (2), 149-156.
15. B. Vercaemer, K. Spence, C. Herbinger, **S. Lapègue**, E. Kenchington, 2006. Genetic diversity of the European oyster (*Ostrea edulis*) in Nova Scotia: Comparison with other parts of Canada, Maine and Europe and implications for broodstock management. *Journal of Shellfish Research* (0,9), 25 (2), 543-551.
16. **S. Lapègue**, I. Ben Salah, F. M. Batista, S. Heurtebise, L. Neifar, P. Boudry, 2006. Phylogeographic study of the dwarf oyster, *Ostreola stentina* (Payradeau, 1826), from Morocco, Portugal and Tunisia: evidence of a geographic disjunction with the closely related species, *Ostrea aupaoria* and *Ostreola equestris*. *Marine Biology* (1,7), 150 (1), 103-110.
17. K. Bouilly, M. Bonnard, B. Gagnaire, T. Renault, **S. Lapègue**, 2007. Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (1,4), 52, 58-63.
18. J. Bourjea, **S. Lapègue**, D. Broderick, J. A. Mortimer, L. Gagnevin, S. Ciccione, D. Roos, C. Taquet, H. Grizel, 2007. Phylogeography of the green turtle, *Chelonia mydas*, in the South West Indian Ocean using mtDNA sequences. *Molecular Ecology* (4,8), 16, 175-186.
19. D. Hedgecock, S. Launey, A. I. Pudovkin, Y. Naciri-Graven, **S. Lapègue**, F. Bonhomme, 2007. Small effective number of parents (N_b) inferred for a naturally settled cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. *Marine Biology* (1,7), 150, 1173-1182.
20. D. Lallias, **S. Lapègue**, C. Hecquet, P. Boudry, A. Beaumont, 2007. A first genetic linkage map of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Animal Genetics* (1,5), 38, 340-349.
21. C. Sauvage, P. Boudry, **S. Lapègue**, N. Bierne, 2007. Development of SNPs and analysis of codon usage bias using EST databases in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Sous presse dans *Gene* (2,7).
22. D. Lallias, A.R. Beaumont, C.S. Haley, P. Boudry, S. Heurtebise, **S. Lapègue**. 2007. A first generation genetic linkage map of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) based on AFLP and microsatellite markers. Sous presse dans *Animal Genetics* (1,5).
23. E. Quillet, P. Boudry, **S. Lapègue**, 2007. Variabilité génétique de la réponse aux organismes pathogènes: un outil pour améliorer la santé des mollusques et poissons d'élevage. Soumis à *Production Animales* (0,4).
24. S. Dridi, M.S. Romdhane, S. Heurtebise, M. El Cafsi, P. Boudry, **S. Lapègue**, 2007. Genetic characterization of oyster populations along the North-Eastern coast of Tunisia. Soumis à *Aquatic Living Resources* (1,2).

25. N. Taxis, P. Boudry, F. Bonhomme, **S. Lapègue**, 2007. Limited evidence of sweepstakes reproductive success in temporal cohorts of European flat oysters juveniles. Soumis à *Marine Biology* (1,7).

Articles ou Chapitres d'ouvrage

R. J. Petit, B. Demesure, et **S. Dumolin**, 1998. CpDNA and plant mtDNA primers. In: *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. Ed.: A. Karp, P. G. Isaac, D. S. Ingram, Chapman and Hall, Londres, 256-261.

S. Lapègue, E. Bédier, E. Goyard, L. Dégremont, J.-P. Baud, A. Gérard, P. Gouilletquer, P. Boudry, 2004. Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole : l'exemple de l'ostréiculture. In : Styli 2003 Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie, Actes de colloque, IFREMER, 38: 113-121.

Autres types de publications

A. Ducouso, R. Bacilieri, B. Demesure, **S. Dumolin-Lapègue**, A. Kremer, R. Petit, A. Zanetto, 1997. Structuration géographique de la diversité génétique chez les chênes à feuilles caduques européens. Bulletin technique ONF, 33 : 7-19.

B. Gagnaire, H. Thomas-Guyon, **S. Lapègue**, K. Bouilly, T. Renault, 2001. Recherche d'effets biologiques de l'atrazine sur hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea giga*, *in vivo* et *in vitro*. Dans Actes du 31ème congrès du Groupe Français des Pesticides "Transfert des produits phytosanitaires, diagnostic de pollution et solutions correctives, 15-17 mai 2001, Cemagref Editions, 390-398.

P. Boudry, S. Launey, E. Diaz Almela, Y. Naciri-Graven, C. Ledu, S. Mira, N. Taxis, F. Bonhomme, **S. Lapègue**, 2002. Population genetics of the European flat oyster (*Ostrea edulis*): from larvae to populations. ICES CM 2002/U:09.

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, **S. Lapègue**, 2002. Impact of atrazine on aneuploidy in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Shellfish Research, 21(1): 425 (abstract).

S. Lapègue & E. Bedier, 2002. Article "L'Ostréiculteur Français" 161 : "Des huîtres sélectionnées pour résister à la bonamiose" : p. 12.

K. Bouilly, H. McCombie, A. Leitão, **S. Lapègue**, 2003. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Shellfish Research, 22(1): 320 (abstract).

P. Boudry, **S. Lapègue**, R. Guyomard, 2003. Review and practical use of genome mapping in aquacultured organisms. Position paper by the Working Group on the Application of Genetics in Fisheries and Mariculture" (WGAGFM), La Rochelle, France, March 10-12, ICES CM 2003/F :01 : 3-6

G. Dahle, P. Boudry, **S. Lapègue**, E.E. Nielsen, 2003. Review and report on genetic issues related to escapes of farmed marine fish and shellfish. Working Group on the Application of

Genetics in Fisheries and Mariculture (WGAGFM), La Rochelle, France, March 10-12, ICES CM 2003/F:01 : 6-10.

Bouilly K., Leitão A., McCombie H., Chaves R., Guedes-Pinto H., Boudry P. & **S. Lapègue**, 2004. Effects of the herbicide atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Chromosome Research 12 (Suppl. 1): 140 (abstract).

S. Lapègue, N. Taxis, D. Lallias, F. Bonhomme, P. Boudry, 2004. Impact of the reproduction dynamics on genetic variation in the European flat oyster *Ostrea edulis* (2004). Journal of Shellfish Research 23(1): 299-300 (abstract).

S. Lapègue, F.M. Batista, S. Heurtebise, Z. Yu, P. Boudry, 2004. Evidence for the presence of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata*, in northern China. Journal of Shellfish Research 23(3) : 759-763 (abstract).

F. Batista, A. Leitao, A. Huvet, **S. Lapègue**, S. Heurtebise, P. Boudry, 2006. The taxonomic status and origin of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819). The 1st International Oyster Symposium Proceedings, Oyster Research Institute News 18, 2006.10: 3-10.

Communications dans congrès, symposiums

1995

S. Dumolin, B. Demesure, et R. J. Petit, 1995. Comparaison de deux phylogénies maternelles (ADNcp et ADNmt) chez le chêne. Communication orale, 17^{ème} Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Lyon, 29-31 août 1995.

S. Dumolin-Lapègue, 1995. Structuration spatiale de la diversité sur l'aire de répartition évaluée à l'aide de marqueurs cytoplasmiques. Communication orale, Réunion Jeunes Chercheurs DGAP INRA, Bordeaux-Cestas.

1996

S. Dumolin-Lapègue, B. Demesure, et R. J. Petit, 1996. Structuration spatiale de la variabilité chloroplastique chez les chênes blancs en Europe. Poster, 18^{ème} Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Grenoble, 27-30 août 1996.

1999

F.J. Garcia de León, M. Canonne, E. Quillet, F. Bonhomme, et B. Chatain (**S. Lapègue**, orateur en remplacement de B. Chatain), 1999. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. International Conference and exposition of the world aquaculture society, Sydney, Australie, 26 avril-2 mai 1999.

E. Diaz Almela, P. Boudry, S. Launey, **S. Lapègue**, C. Ledu, F. Bonhomme, 1999. Structuration spatiale des populations européennes d'huîtres plates (*Ostrea edulis* L.): comparaison entre marqueurs mitochondriaux et nucléaires. Poster, 21^{ème} Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Rennes, 6-9 septembre 1999.

2000

S. Lapègue, I. Boutet, A. Leitao, C. Thiriot-Quiévreux, S. Heurtebise, P. Garcia, P. Boudry, 2000. Phylogeography of mangrove oysters from the southern atlantic ocean: *Crassostrea gasar* and *Crassostrea rhizophorae*. Poster, International Conference and exposition of the world aquaculture society, Nice, France, 2 -6 mai 2000.

S. Lapègue, E. Diaz Almela, S. Launey, , C. Ledu, P. Boudry, Y. Naciri-Graven, F. Bonhomme, 2000. Mitochondrial and microsatellite genetic differentiation of the flat oyster *Ostrea edulis* along the European coasts, and comparison with allozyme data. Communication orale, International Conference and exposition of the world aquaculture society, Nice, France, 2 -6 mai 2000.

C. Fabioux, A. Huvet, **S. Lapègue**, P. Boudry, 2000. Différenciation génétique et hybridation entre 2 sous-espèces d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*. Poster, 22^{ème} Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Dijon, 28-31 août 2000.

S. Lapègue, E. Diaz Almela, S. Launey, C. Ledu, P. Boudry, Y. Naciri-Graven, F. Bonhomme, 2000. Différenciation génétique des populations d'huître plate européenne, *Ostrea edulis*, à l'aide de marqueurs mitochondrial et nucléaires. Poster, 3^{ème} Colloque national du Bureau des Ressources génétiques: Connaissance et gestion des ressources génétiques, 9-11 octobre 2000.

2001

P. Boudry, A. Huvet, C. Fabioux, **S. Lapègue**, 2001. Evidence for natural hybridisation between the two oyster sub-species *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* in Southern Europe. 34th annual meeting of the Population Genetics Group. Sheffield, 3-6 janvier, United-Kingdom.

S. Lapègue, E. Diaz Almela, S. Launey, C. Ledu, P. Boudry, Y. Naciri-Graven, F. Bonhomme, 2001. Mitochondrial and microsatellite genetic differentiation of the flat oyster *Ostrea edulis* along the European coasts. 34th Annual Meeting of the Population Genetics Group. Sheffield, 3-6 janvier, United-Kingdom.

S. Heurtebise, I. Boutet, B. Verdon, **S. Lapègue**, A. Leitão, C. Thiriot-Quiévreux, P. Garcia, P. Boudry, 2001. Phylogéographie des huîtres de mangrove de l'Océan atlantique sud : *C. gasar* et *C. rhizophorae*. IFREMER – Journées conchylicoles, Nantes, 3 – 4 avril 2001

A. Huvet, C. Fabioux, **S. Lapègue**, P. Boudry, 2001. Hybridation naturelle entre les deux sous-espèces d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* au sud de l'Europe. IFREMER – Journées conchylicoles, Nantes, 3 – 4 avril 2001

S. Lapègue, E. Diaz Almela, S. Launey, C. Ledu, P. Boudry, Y. Naciri-Graven, F. Bonhomme, 2001. Différenciation génétique des populations d'huître plate européenne, *Ostrea edulis*, à l'aide de marqueurs des génomes mitochondrial et nucléaire. IFREMER – Journées conchylicoles, Nantes, 3 – 4 avril 2001

A. Leitão, P. Boudry, H. McCombie, **S. Lapègue**, A. Gérard, C. Thiriot-Quiévreux, 2001. Le phénomène de l'aneuploidie et sa relation avec la croissance chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. IFREMER – Journées conchylicoles, Nantes, 3 – 4 avril 2001

B. Gagnaire, T. Renault, H. Thomas-Guyon, **S. Lapègue**, K. Bouilly, A. Gérard, P. Miramand, 2001. Recherche *in vivo* et *in vitro* d'effets biologiques de l'atrazine sur les hémocytes de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. 31^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides (GFP). Transferts des produits phytosanitaires – Solutions correctives. 15-17 mai 2001, ENS Lyon.

S. Lapègue, E. Diaz Almela, S. Launey, C. Ledu, P. Boudry, Y. Naciri-Graven, F. Bonhomme, 2001. Différenciation génétique des populations d'huître plate européenne, *Ostrea edulis*, à l'aide de marqueurs mitochondrial et nucléaires. Poster, Colloque national de la Société de Malacologie, 3-4 juillet 2001.

S. Lapègue, I. Boutet, A. Leitao, S. Heurtebise, B. Verdon, P. Garcia, C. Thiriot-Quiévreux, P. Boudry, 2001. L'huître de Mangrove africaine, *Crassostrea gasar*, est présente sur les côtes sud-américaines de l'Océan Atlantique. Poster, Colloque national de la Société de Malacologie, 3-4 juillet 2001.

S. Lapègue, E. Diaz Almela, S. Launey, C. Ledu, P. Boudry, Y. Naciri-Graven, F. Bonhomme, 2001. Différenciation génétique des populations d'huître plate européenne, *Ostrea edulis* à l'aide de marqueurs mitochondrial et nucléaires. Colloque National de la Société de Malacologie, 3-4 juillet 2001, Caen

B. Gagnaire, T. Renault, H. Thomas-Guyon, **S. Lapègue**, K. Bouilly, A. Gérard, P. Miramand, 2001. Recherche d'effets biologiques de l'atrazine sur hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, *in vivo* et *in vitro*. Colloque d'Immunologie des Invertébrés, Villeneuve d'Ascq, Novembre 2001.

2002

K. Bouilly, A. Leitao, H. McCombie, **S. Lapègue**. Impact of atrazine on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Poster, colloque de la National Shellfish Association, Mystic, Connecticut, USA, 14-18 avril 2002.

A. Leitão, R.Chaves, H. McCombie, **S. Lapègue**, K. Bouilly, P. Boudry, H Guedes-Pinto, C. Thiriot. New molecular cytogenetic tools and their application for the study of aneuploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Colloque "European Meeting on marine Biotechnology", Nantes, Mai 2002.

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, S. Sabatier, **S. Lapègue**. Recent advances on aneuploidy study in oysters : the effect of an environmental factor. Poster, World Congress on genetics applied to Livestock Production, Montpellier, 19-23 Août 2002.

S. Lapègue, P. Boudry, S. Mira, N. Taris, F. Bonhomme. Diversité génétique et dynamique du recrutement chez l'huître plate *Ostrea edulis* L.. Poster, 23^{ème} Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Montpellier, 27-30 août 2002.

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, P. Miramand and **S. Lapègue**. Impact of atrazine on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 5^{ème} Congrès international de la Société de Limnologie et Océanographie, Paris, 9-12 Septembre 2002.

P. Boudry, S. Launey, E. Diaz Almela, Y. Naciri-Graven, C. Ledu, S. Mira, N. Taris, F. Bonhomme and **S. Lapègue**. Population genetics of the European flat oyster (*Ostrea edulis*): from larvae to populations. ICES, Copenhagen, Octobre 2002.

2003

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, **S. Lapègue**. Impact d'un facteur environnemental, l'atrazine, sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Journées conchylocoles IFREMER, Nantes, 12-13 mars 2003.

P. Boudry, S. Launey, E. Diaz Almela, Y. Naciri-Graven, C. Ledu, S. Mira, N. Taris, F. Bonhomme, **S. Lapègue**, 2003. Diversité et différenciation génétique chez l'huître plate européenne : de la population à l'individu. Journées Conchylocoles, Ifremer Nantes, 12-13 mars 2003.

K. Bouilly, **S. Lapègue**, 2003. Aneuploidy / Environment. Chromosome workshop, La Tremblade, 13-14 mars 2003.

K. Bouilly, H. McCombie, A. Leitão, **S. Lapègue**. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 95^{ème} colloque annuel de la National Shellfisheries Association, Nouvelles-Orléans, Louisiane, USA, 13-17 avril 2003.

S. Lapègue, N. Taris, P. Boudry, A. Langlade, F. Bonhomme, 2003. Diversité génétique et dynamique du recrutement chez l'huître plate *Ostrea edulis* L.. Séminaire de l'IFB, Biodiversité, Paris, France, 28-29 avril 2003.

S. Lapègue, E. Bédier, E. Goyard, L. Dégremont, J.-P. Baud, A. Gérard, P. Gouletquer, P. Boudry, 2004. Apport d'un programme de génétique à une filière de production aquacole : l'exemple de l'ostréiculture. Styli2003, 23 mai – 9 juin 2003, Nouvelle-Calédonie.

P. Boudry, S. Launey, E. Diaz Almela, Y. Naciri-Graven, C. Ledu, S. Mira, N. Taris, F. Bonhomme, **S. Lapègue**, 2003. Diversité et différenciation génétique chez l'huître plate européenne : de la population à l'individu. (Population genetics of the european oyster (*Ostrea edulis*): from larvae to populations. III^e Congrès International des Sociétés Européennes de Malacologie"Les mollusques dans la recherche actuelle"; La Rochelle 24-27 juin 2003.

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, P. Miramand, **S. Lapègue**. Impact de polluants sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. 3^{ème} Congrès international des Sociétés Européennes de Malacologie, La Rochelle, 24-27 juin 2003.

K. Bouilly, H. McCombie, A. Leitão, **S. Lapègue**, 2003. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. 133^{ième} réunion annuelle de l'American Fisheries Society (AFS), Québec, 11-14 août 2003.

N. Taris, D. Lallias, F. Bonhomme, P. Boudry, **S. Lapègue**, 2003. Variabilité des contributions parentales chez l'huître plate *Ostrea edulis* : Quelles conséquences génétiques sur le recrutement ? 24^{ème} Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Toulouse, 25-28 août 2003.

H. McCombie, **S. Lapègue**, F. Cornette, C. Ledu, P. Boudry, 2003. Chromosome loss in tetraploid families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Symposium “Genetics in Aquaculture VIII”, Puerto Varas, Chile, November 9-15.

2004

S. Lapègue, N. Taxis, D. Lallias, F. Bonhomme, P. Boudry, 2004. Impact of the reproduction dynamics on genetic variation in the European flat oyster *Ostrea edulis*. International triennial meeting “Aquaculture 2004”, Honolulu, Hawaii, USA, March 1-5.

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry, **S. Lapègue**, 2004. Impact of atrazine on somatic aneuploidy in cupped oysters, *Crassostrea gigas*. Poster présenté à la Second B Chromosome Conference, Bubión, Espagne, 26-29 juin 2004.

K. Bouilly, A. Leitão, H. McCombie, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Boudry, **S. Lapègue**, 2004. Effects of the herbicide atrazine on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Poster présenté à la 15th International Chromosome Conference, London, Angleterre, 5-10 septembre 2004.

K. Bouilly, M. Bonnard, A. Leitão, H. McCombie, **S. Lapègue**, 2004. Variations temporelles du taux d’aneuploïdie d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* sur la vasière de Brouage et toxicité de l’atrazine et du cadmium en milieu contrôlé. Fonctionnement écologique des vasières littorales et sociétés humaines, La Rochelle, France, 3-4 novembre 2004.

2005

S. Lapègue, 2005. Flat oysters tolerant regards to bonamiosis. Annual meeting of the National Reference laboratories for mollusc diseases, La Tremblade, France, 14-18 mars 2005.

F. Batista, A. Laitao, A. Huvet, **S. Lapègue**, S. Heurtebise, P. Boudry, 2005. The taxonomic status and origin of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819). Poster présenté au 1st International Oyster Symposium, Ariake, Tokyo, Japon, 13-14 juillet 2005.

C. Sauvage, **S. Lapègue**, P. Boudry, 2005. Development of SNPs and their use for the identification of summer mortality QTLs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Poster présenté au 7th international meeting on Single Nucleotide Polymorphism and Complex Genome Analysis, Hinckley, Grande-Bretagne, 22-24 septembre 2005.

F. Batista, P. Boudry, **S. Lapègue**, S. Heurtebise, C. Monteiro, 2005. Is the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* in Southern Europe endangered by the expansion of the Pacific oyster *C. gigas* ? 8th International Conference on Shellfish Restoration, Brest, France, 2-5 octobre 2005.

2006

D. Lallias, P. Boudry, S. Heurtebise, **S. Lapègue** and A. R. Beaumont, 2006. Establishment of a genetic map in the European oyster, *Ostrea edulis* L. Poster présenté à la XIV Plant and Animal Genome conference, San Diego, Etats-Unis, 14-18 janvier 2006.

C. Sauvage, **S. Lapègue**, P. Boudry, 2006. Development of SNPs and their use for the identification of summer mortality resistance QTLs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), 2006. Poster présenté à la XIV Plant and Animal Genome conference, San Diego, Etats-Unis, 14-18 janvier 2006.

D. Lallias, N. Taris, P. Boudry, F. Bonhomme, **S. Lapègue**, 2006. Variance of reproductive success in the European flat oyster *Ostrea edulis* assessed by microsatellite-based parentage analyses in a natural population and in hatchery. 98ème colloque annuel de la National Shellfisheries Association, Nouvelles-Orléans, Monterey, USA, 26-30 mars 2006.

D. Lallias, **S. Lapègue**, C. Haley, S. Heurtebise, P. Boudry and A. Beaumont, 2006. A preliminary genetic linkage map for the European flat oyster *Ostrea edulis*. International Conference and exposition of the world aquaculture society, Florence, Italie, 9-13 mai 2006.

S. Lapègue, P. Boudry, 2006. Oyster population genetics: understanding natural populations and tracing introductions. Key note. International Conference and exposition of the world aquaculture society, Florence, Italie, 9-13 mai 2006.

D. Lallias, **S. Lapègue**, C. Haley, P. Boudry, S. Heurtebise, and A. Beaumont, 2006. A preliminary genetic linkage map for the European flat oyster *Ostrea edulis*. Poster présenté à l'International symposium Genetics in Aquaculture, Montpellier, Juin 26-30, 2006.

C. Sauvage, N. Bierne, **S. Lapègue**, P. Boudry, 2006. Development of SNPs and their use for the identification of summer mortality resistance QTLs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Poster présenté à l'International symposium Genetics in Aquaculture, Montpellier, Juin 26-30, 2006.

S. Lapègue, I. Ben Salah, F. M. Batista, S. Heurtebise, L. Neifar, P. Boudry. Taxonomie moléculaire de l'huître plate *Ostreola stentina*. Poeter présenté au 6^{ième} colloque BRG "Ressources génétiques: Des ressources partagées", La Rochelle, Octobre 2-4, 2006.

C. Sauvage, **S. Lapègue**, P. Boudry, 2006. Identification of SNPs and their mapping for the identification of QTLs of resistance to summer mortality in the Pacific cupped Oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Poster présenté à l'international conference on Marine Genomics, Sorrento, 29 octobre-1 novembre, 2006.

V. Boulo, A. Huvet, **S. Lapègue**, A. Tanguy, D. Moraga, A. Goostrey, G. Davey, G. Le Moullac, J.F. Samain, P. Prunet, J. Moal, 2006. Functional genomic in the oyster *Crassostrea gigas*: contribution of high throughput genomic to explain the summer mortality phenomenon. Poster présenté à l'international conference on Marine Genomics, Sorrento, 29 octobre-1 novembre, 2006.

2007

D. Lallias, **S. Lapègue**, C. Haley, S. Heurtebise, P. Boudry, A. Beaumont, 2007. A first genetic linkage map of the European flat oyster *Ostrea edulis*. 99ème colloque annuel de la National Shellfisheries Association, San Antonio, USA, 26 février-2 mars 2007.

D. Lallias, C. Hecquet, P. Boudry, **S. Lapègue**, A. Beaumont, 2007. A first genetic linkage map of the blue mussel *Mytilus edulis*. Poster présenté au 99ème colloque annuel de la National Shellfisheries Association, Antonio, USA, 26 février-2 mars 2007.

D. Lallias, **S. Lapègue**, C. Haley, S. Heurtebise, P. Boudry, A. Beaumont, 2007. A first genetic linkage map of the European flat oyster *Ostrea edulis*. 8ième International. Marine Biotechnology Conference, Eilat, Israël, 11-16 mars 2007.

D. Lallias, C. Hecquet, P. Boudry, **S. Lapègue**, A. Beaumont, 2007. A first genetic linkage map of the blue mussel *Mytilus edulis*. Poster présenté à la 8ième International. Marine Biotechnology Conference, Eilat, Israël, 11-16 mars 2007.

C. Taquet, **S. Lapègue**, J. Bourjea, S. Ciccione, H. Grizel, C. Muir, 2007. Genetics : a tool to infer structure of green turtle populations (*Chelonia mydas*) in the south-western Indian ocean. 27th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, Myrtle Beach, USA, 22-28 février 2007.

Rapports de contrats ou conventions

Boudry P., Heurtebise S., Huvet A., **Lapègue S.**, Ledu C., Phelipot P. & A. Gérard, 2000. Acclimation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : hybridation et conservatoire de souches. Contrat Région Poitou-Charentes 1999 – Convention 99 RPC-A-203 “Génétique” : 25 p.

Lapègue S., Thiriot C., McCombie H., Heurtebise S., Boudry P., Robert S., Soletchnik P., Gouletquer P. & A. Gérard, 2000. Etude du niveau d'aneuploidie dans les populations des zones de captage du bassin de Marennes-Oléron. Contrat Région Poitou-Charentes 1999. Convention 99 RPC-A-201 “Génétique”, 39 p.

Boudry P. & **S. Lapègue**, 2001. Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la génétique. Convention 2000 RPC-A-530, Région Poitou-Charentes : 56 p.

P. Boudry, S. Heurtebise, **S. Lapègue**, K. Lam, H. McCombie, A. Leitao, A. Gérard, 2002. Etude des ressources génétiques chez les huîtres creuses. Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006. Convention N°2001-RPC-A-212 “Génétique”, “Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la génétique” : 38 p.

S. Lapègue, H. McCombie, A. Leitao, K. Bouilly, S. Sabatier, S. Heurtebise, P. Boudry, C. Thiriot, A. Gérard, 2002. Etude des anomalies chromosomiques chez *Crassostrea gigas*. Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006. Convention N°2001-RPC-A-212 “Génétique”, “Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la génétique” : 44 p.

P. Boudry, L. Dégremont, R. Brizard, **S. Lapègue**, P. Phelipot, S. Heurtebise, F. Cornette, 2003. Action 1 : Etude des ressources génétiques des huîtres creuses. Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006. Convention 2002-RPC-A-A80 “Génétique”. Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la génétique : 14 p.

K. Bouilly, M. Bonnard, S. Grouhel, **S. Lapègue**, 2003. Etude des anomalies chromosomiques chez *Crassostrea gigas*. Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006. Convention 2003/RPC-A-114 “Génétique” Programme 3 : Gestion durable des populations ostréicoles : les apports de la génétique : 21 p.

S. Lapègue, N. Taris, P. Boudry, A. Langlade, F. Bonhomme, 2003. Diversité génétique et dynamique du recrutement chez l'huître plate *Ostrea edulis* L.. Rapport de synthèse du projet soutenu lors de l'appel d'offres 2001-2002 de l'Institut Français de la Biodiversité : 15 p.

S. Lapègue, S. Heurtebise, F. Cornette, R. Brizard, T. Sharbel, P. Boudry, 2004. Impact de la dissémination accidentelle d'huîtres tétraploïdes : potentiel de dispersion et succès reproducteur. Rapport de fin de contrat entre l'IFREMER et le CNRS concernant l'appel d'offres 2002 " Impact des biotechnologies dans les agro-écosystèmes " : 22 p.

F. Cornette, S. Grouhel, T. Sharbel, P. Boudry, P. Gouletquer, **S. Lapègue**, 2004. Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage de Marennes-Oléron et Arcachon. Rapport de fin de contrat " Dispositif de Biovigilance ". Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires rurales – Syndicat Professionnel des Ecloseries et Nurseries de Coquillages. Chapitre 61.83-70 : 60 p.

K. Bouilly, M. Bonnard, **S. Lapègue**, 2004. Etude des anomalies chromosomiques chez *Crassostrea gigas*. Contrat Région Poitou-Chanretes 2000-2006. Convention 2004/RPC-A-114 " Génétique " Programme 3 : Gestion durable des populations ostréicoles : les apports de la génétique : 27 p.

A. Benabdelmouna, F. Cornette, S. Grouhel, **S. Lapègue**, P. Boudry, P. Gouletquer, 2005. Niveau de ploïdie des huîtres des bassins de captage de Marennes-Oléron et Arcachon : 60 p.

A. Huvet, J. Royer, J. Moal, S. Pouvreau, H. Bacca, J. Haure, T. Burgeot, D. Moraga, **S. Lapègue**, V. Boulo, J.L. Nicolas, C. Lambert, 2006. Caractérisation phénotypique des souches R Résistantes et S Susceptibles à la mortalité estivale. Synthèse MOREST 2000 – 2005.

T. Burgeot, B. Gagnaire, T. Renault, J. Haure, D. Moraga, E. David, I. Boutet, P.G. Sauriau, **S. Lapègue**, K. Bouilly, G. Le Moullac, G. Arzul, J. Knoery, F. Quiniou, C. Bacher, J. Haure, P. Soletchnik, 2006. Caractérisation des mortalités de *C. gigas* dans leurs écosystèmes. Stress environnemental. Synthèse MOREST 2000 – 2005.

Groupes de travail, Expertises, revues d'articles

S. Lapègue, 2001. Revue d'un article pour le journal " Molecular Ecology ".

S. Lapègue, 2002. Revue de 4 articles pour le journal " Molecular Ecology ".

S. Lapègue, 2003. Expert au " Working Group on the Application of Genetics in Fisheries and Mariculture " (WGAGFM), du Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM) – 10-12 mars 2003

S. Lapègue, 2003. Revue d'articles pour les journaux " Molecular Ecology " (2), " Heredity " (1), " Aquaculture International " (1), " Genetics " (1).

S. Lapègue, 2004. Participation au workshop franco-américain "Domestication of Bivalve Mollusks", Tacoma, Washington State USA, du 11 au 13 Octobre 2004.

S. Lapègue, 2004. Participation à la réunion du projet européen INTERREG "Atlantic Arc Aquaculture Group" (AAAG), Cadix, Espagne, 16-17 Novembre 2004.

S. Lapègue, 2004. Participation à la première réunion du projet européen AQUAFIRST, Paris, France, 2-3 Décembre 2004.

S. Lapègue, 2004. Revue de deux articles pour “ Molecular Ecology ”.

S. Lapègue, 2004. Participation à la première réunion du projet européen AQUAFIRST, Paris, France, 2-3 Décembre 2004.

S. Lapègue, 2005. Participation au groupe de travail du projet européen AQUAFIRST sur le thème “Experimental QTLs designs”, Paris, 16 février 2005.

S. Lapègue, 2005. Participation au workshop technique du projet européen EFARO (European Fisheries and Aquaculture Research Organisations) sur le thème " Diversification in Aquaculture” à Budapest, Hongrie, du 17 au 20 février 2005.

S. Lapègue, 2005. Participation à la réunion du projet européen INTERREG "Atlantic Arc Aquaculture Group" (AAAG), La Tremblade, France, 18-19 avril 2005.

S. Lapègue, 2005. Participation à la réunion du projet européen AQUAFIRST, Avancement des WP4 et WP5, Faro, 17-18 juin 2005.

S. Lapègue, 2005. Participation à la première réunion du projet “GBIRM” du REX MARBEF, Marseille, 30 juin-1^{er} juillet 2005.

S. Lapègue, 2005. Participation à la réunion du Fish and Shellfish Node du REX Marine Genomics Europe, Berlin, 1-2 octobre 2005.

S. Lapègue, 2005. Participation à la réunion du projet européen AQUAFIRST, Torre de la Sal, Canaries, 6-8 novembre 2005.

S. Lapègue, 2005. Participation à la première réunion du projet européen GENIMPACT, Paris, 14-15 novembre 2005.

S. Lapègue, 2006. Participation à la réunion du Fish and Shellfish Node du REX Marine Genomics Europe, Barcelone, 21-22 janvier 2006.

S. Lapègue, 2006. Participation à la réunion du projet “GBIRM” du REX MARBEF, Faro, 2-5 mai 2006.

S. Lapègue, 2006. Participation à la réunion du projet européen AQUAFIRST, Avancement des WP4 et WP5, Louvain, 18-19 mai 2006.

S. Lapègue, 2006. Organisation scientifique du workshop du projet européen GENIMPACT. Viterbo, 9-17 juin 2006.

S. Lapègue, 2006. Participation à la réunion du Fish and Shellfish Node du REX Marine Genomics Europe, Sorrento, 28 octobre 2006.

S. Lapègue, 2006. Participation à la réunion du projet européen AQUAFIRST, Avancement des WP4 et WP5, Héraklion, 13-14 novembre 2006.

S. Lapègue, 2006. Revue d'articles pour les journaux Aquatic Ecology (1), Molecular Ecology (1), Aquaculture (1), Marine Environmental Research (1), Journal of Experimental Marine Biology and Ecology (1).

S. Lapègue, 2007. Participation à la réunion du projet européen INTERREG "Atlantic Arc Aquaculture Group" (AAAG2), Cadix, Espagne, 26-27 mars 2007.

S. Lapègue, 2007. Participation au workshop du projet européen GENIMPACT. Thessalonique, 19-22 avril 2007.

S. Lapègue, 2007. Participation et organisation de la réunion du projet européen AQUAFIRST, Avancement des WP4 et WP5, La Rochelle, 14-15 mai 2007.

S. Lapègue, 2007. Participation à la réunion du projet européen INTERREG "Atlantic Arc Aquaculture Group" (AAAG2) pour la préparation à la réponse au prochain appel d'offres INTERREG IIIB, La Rochelle, France, 18 juin 2007.

S. Lapègue, 2007. Revue d'articles pour les journaux New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research (1), Marine Biology (1).

Cours, formation

S. Lapègue, 1999. Formation "Biologie Moléculaire" en interne Ifremer.

S. Lapègue, 2001. Intervention 3H, formation "Avancées scientifiques et techniques : applications en aquaculture". CEMPAMA, 20-22 novembre 2001, Beig Meil. BTS Aquacole

S. Lapègue, 2001. Intervention 1 jour. Stage d'initiation à la biologie moléculaire : le séquençage, 26-30 novembre 2001, La Tremblade. Bac + 2 et plus.

S. Lapègue, 2004. Intervention 3h. La variabilité, base génétique de l'amélioration: Application chez les huîtres, Lycée de la mer de Bourcefranc, BTS.

S. Lapègue, 2005. Intervention 3h. La variabilité, base génétique de l'amélioration: Application chez les huîtres, Master2 « Mécanismes et optimisation de la bioproduction marine », Nantes.

Divers

S. Lapègue, 2002. Interview Radio France Bleue La Rochelle, 28 novembre 2002. Sujet : Des huîtres sélectionnées pour résister à la bonamiose.

S. Lapègue, S. Heurtebise, R. Brizard, A. Langlade, E. Bédier, 2004. Bilan des huîtres plates utilisées dans le programmes génétiques à l'écloserie de La Tremblade et sur les parcs de La Trinité-sur-Mer : période 2003-2004 : 24 p.

S. Lapègue, 2004. Jury de la soutenance de thèse de Karine Bouilly : Impact de facteurs environnementaux sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse Doctorat, Université de La Rochelle, 10 décembre 2004.

S. Lapègue, Début du projet européen Aquafirst, 2004. Jeudi Ifremer n° 317 du 16/12/2004.

S. Lapègue, 2004. Impact de la dissémination accidentelle d'huîtres tétraploïdies : potentiel de dispersion et succès reproducteur :
<http://www.cnrs.fr/SDV/Actions/pi/ibae/pfibae2002.html>.

S. Lapègue, 2005. Huîtres polyploïdes: la biovigilance en action. Les nouvelles de l'Ifremer, n° 166, février 2005, p. 2.

S. Lapègue, 2006. Analyse de l'article "Introduction du génie génétique en aquaculture : implications écologiques et éthiques pour la science et la gestion" par Myhr A.I. et Dalmo R.A. dans *Aquaculture*, 2005, Vol. 250 (3-4), p. 542-554. *Bibliomer*, 34, notice 2006-3500.

S. Lapègue, P. Boudry, P. Gouletquer, 2006. Pacific cupped oyster - *Crassostrea gigas*. In: "Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations." D. Crosetti, S. Lapègue, I. Olesen, T. Svaasand (eds). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. WP1 workshop "Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish", Viterbo, Italy, 12-17th June, 2006, 6pp. <http://genimpact.imr.no/>

S. Lapègue, Beaumont A., P. Boudry, P. Gouletquer, 2006. European flat oyster - *Ostrea edulis*. In: "Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations." D. Crosetti, S. Lapègue, I. Olesen, T. Svaasand (eds). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. WP1 workshop "Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish", Viterbo, Italy, 12-17th June, 2006, 6pp. <http://genimpact.imr.no/>

Modeste contribution

LEÇON DE CHOSES

Hier nous avons vu
comment dompter une huître
chasser une salade
et faire pleurer un saule

Aujourd'hui je t'apprends
à compter jusqu'à un
à tresser les étoiles
à te taire en malais

Et demain
demain
on verra.

Hervé Le Tellier

Résumé

La synthèse du travail de recherche dans le cadre de l'Habilitation à Diriger des Recherches de Sylvie Lapègue regroupe dix années (1998-2007) de travaux en génétique des mollusques bivalves et principalement des huîtres, creuses et plates. Cette activité de recherche s'est développée autour de (1) la génétique des populations d'huîtres plates au niveau européen et des populations et espèces d'huîtres creuses au niveau mondial, (2) la caractérisation d'une particularité cytogénétique des huîtres qui correspond à un fort taux d'aneuploïdie dans les cellules somatiques, puis (3) plus récemment sur l'utilisation de marqueurs moléculaires pour la construction ou l'amélioration de cartes génétiques, permettant de (4) détecter de zones du génome respectivement liées à la résistance aux mortalités estivales chez l'huître creuse et la résistance au parasite responsable de la bonamiose pour l'huître plate. Ces recherches ont permis de réaliser de nombreuses avancées scientifiques, dont certaines sont utilisables en gestion de la diversité génétique des populations naturelles ou exploitées, en amélioration génétique dans des programmes de sélection, ou encore pour une meilleure compréhension de l'architecture génétique des caractères d'intérêt tels que des résistances à des maladies.

Mots-Clés : Génétique des populations, Aneuploïdie, Amélioration, Cartes génétiques, QTLs, Huîtres, Crassostrea, Ostrea.

Abstract

In the framework of the French diploma "Habilitation à Diriger des Recherches", Sylvie Lapègue's synthesis of research includes ten years (1998-2007) of work in bivalve genetics, and mainly cupped and flat oysters. This research has been developed in (1) flat oyster population genetics at the European level and cupped oyster populations and species genetics at a global scale, (2) the characterization of a cytogenetic particularity observed in oysters that corresponds to a high rate of aneuploidy in somatic cells, and (3) more recently in the use of molecular markers for the construction or improvement of genetic maps, allowing (4) the identification of areas of the genome related to the resistance to summer mortality in the Pacific oyster and the resistance to the parasite responsible for bonamiosis in the European flat oyster. This research has achieved many scientific advances, some of which can be used in the management of the genetic diversity of natural or cultivated populations, in the genetic improvement through breeding programs, or in a better understanding of the genetic architecture of characters of interest such as resistance to diseases.

Key words : Population genetics, Aneuploidy, Breeding, Genetic maps, QTLs, Oysters, Crassostrea, Ostrea