

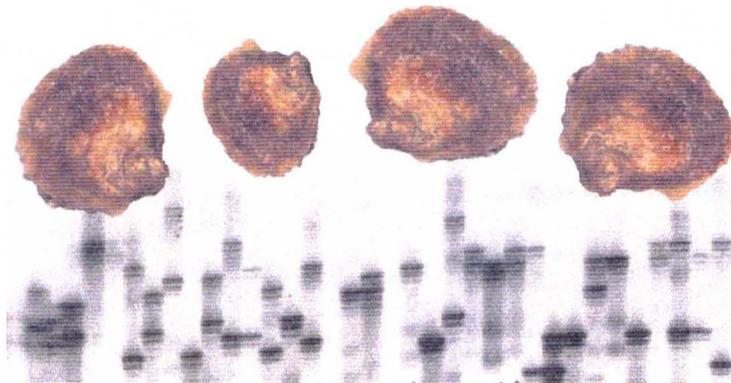
INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS GRIGNON

Thèse présentée par

Sophie LAUNEY

pour obtenir le titre de Docteur de l'INA-PG

**MARQUEURS MICROSATELLITES CHEZ L'HUITRE PLATE
OSTREA EDULIS L.:
CARACTERISATION ET
APPLICATIONS A UN PROGRAMME DE SELECTION
POUR UNE RESISTANCE AU PARASITE *BONAMIA OSTREAE*
ET A L'ETUDE DE POPULATIONS NATURELLES**



Soutenue le 16 janvier 1998 devant le jury composé de

Jacques BOUGLER

Dennis HEDGECKOCK

Jérôme GOUDET

Bernard CHEVASSUS

François BONHOMME

André GERARD

Yamama NACIRI-GRAVEN

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse



IFREMER

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS GRIGNON

Thèse présentée par

Sophie LAUNEY

Pour obtenir le titre de Docteur de l'INA-PG

**MARQUEURS MICROSATELLITES CHEZ L'HUITRE PLATE
OSTREA EDULIS L. :
CARACTERISATION ET APPLICATIONS A UN PROGRAMME DE
SELECTION POUR UNE RESISTANCE AU PARASITE *BONAMIA
OSTREAE* ET A L'ETUDE DE POPULATIONS NATURELLES**



Soutenue le 16 janvier 1998 devant le jury composé de

Jacques Bougler
Dennis Hedgecock
Jérôme Goudet
Bernard Chevassus
François Bonhomme
André Gerard
Yamama Naciri-Graven

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

"L'huitre mène une vie terrible mais palpitante. Quand on y songe, ses chances de vivre sont des plus minces, et si elle échappe aux traits que lui décoche sa propre outrageuse fortune, et parvient à trouver au cours des deux semaines que dure son insouciante jeunesse un endroit propre et lisse où se fixer, les années qui suivent regorgent de tensions, de passions et de dangers."

M.F.K. Fisher, Biographie sentimentale de l'huitre.

REMERCIEMENTS

Au terme de trois ans de thèse, la liste est longue de tous ceux qui sont intervenus de près ou de loin dans ce travail. J'espère que tous trouveront à travers ces lignes l'expression de toute ma gratitude pour leur aide et leur amitié.

Les deux personnes auxquelles va tout d'abord ma gratitude sont André Gérard et Yamama Naciri-Graven. Ils m'ont proposé ce sujet de thèse qui conciliait pour mon plus grand plaisir génétique des populations, zootechnie et biologie moléculaire ; je les remercie pour la confiance qu'ils m'ont accordé en m'accueillant chaleureusement dans leur laboratoire.

Yamama Naciri-Graven a été très présente pour accompagner mes premiers pas dans le monde méconnu et passionnant des bivalves marins ; elle n'a pas ménagé ses efforts pour que ma thèse se déroule le mieux possible en dépit des aléas de la zootechnie ; malgré l'éloignement géographique dans la dernière ligne droite, elle m'a toujours apporté son soutien et son aide dans les moments difficiles. J'ai énormément appris à son contact, aussi bien scientifiquement qu'au niveau personnel. Pour tout ce qu'elle a apporté à ce travail et tout ce qu'elle m'a apporté, je la remercie du fond du cœur.

J'ai trouvé en André Gérard un 'chef' comme on en souhaite, attentif et efficace. Je le remercie chaleureusement pour avoir mis à ma disposition les moyens matériels et intellectuels dont j'avais besoin, d'avoir réglé pour moi de nombreuses (je n'ose dire d'innombrables) petites tracasseries administratives, et d'avoir partagé avec moi ses vastes connaissances sur les bivalves.

François Bonhomme a accepté de parrainer mon travail. Il m'a accueillie dans son laboratoire de Sète (où le français est loi) pour de nombreux et fructueux séjours, aussi bien pour l'acquisition des résultats que pour l'analyse et la rédaction. Il a su m'accorder beaucoup de son temps (et je sais combien il lui est compté) pour de nombreuses discussions enrichissantes sur les points sensibles de la réflexion. Je le remercie sincèrement pour l'implication dont il a fait preuve tout au long de ce travail.

Je remercie le Pr Jacques Bougler d'avoir accepté de juger ce travail. C'est sous son égide que j'ai fait mes premiers pas de généticienne, et il a toujours su montrer son intérêt pour l'avancée des travaux.

Je remercie chaleureusement Jérôme Goudet et Dennis Hedgecock pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Ils ont tous les deux fait preuve d'une grande patience dans la réception du manuscrit, malgré les aléas de la poste, et ont su être infiniment plus rapides que moi dans la rédaction de leur rapport. J'espère qu'ils trouveront dans ce qui suit que leurs remarques, nombreuses et pertinentes, ont permis d'améliorer la réflexion. J'adresse des remerciements particuliers à Dennis Hedgecock pour avoir affronté ce long manuscrit en français. C'est pour moi un plaisir et un privilège de continuer à ses côtés d'explorer la génétique des bivalves marins. Je remercie Bernard Chevassus pour l'honneur qu'il me fait en participant à ce jury.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'URM N°16 (IFREMER/CNRS) et le temps qui m'était imparti a été divisé entre deux laboratoires : le Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie (IFREMER – La Tremblade) et le Laboratoire Génome et Populations (CNRS – Montpellier/Sète). Par ailleurs,

certaines des expériences abordées au cours de cette thèse ont impliqué différents laboratoires côtiers IFREMER, me permettant d'effectuer pendant ma thèse un certain nombre de tours de France, ou tout du moins de ses côtes. Cela explique l'aspect "géographique" des remerciements qui vont suivre.

A La Tremblade, je remercie tout d'abord MM. Henri Grizel et Jean-Pierre Flassch, directeurs successifs de la station, pour m'avoir accueillie dans leurs murs. J'y ai reçu au quotidien aide, soutien et amitié de la part de tous les membres de l'équipe et il me sera difficile de les remercier tous individuellement ; j'adresserai donc tout d'abord un grand merci collectif pour tous ceux qui pendant quelques mois ou toutes ces années ont partagé cette aventure à mes côtés.

Je voudrais tout d'abord adresser mes remerciements amicaux à Pierre Boudry. Il m'a souvent impressionné par ses vastes connaissances en génétique des populations, sa mémoire prodigieuse, son sens du raccourci saisissant, sa culture musicale (et ses coups de gueule légendaires...). Je lui ai souvent (et jamais en vain) demandé aide et conseil, et les discussions avec lui furent souvent stimulantes et toujours enrichissantes.

Christophe Ledu est intervenu à plusieurs niveaux dans le déroulement de mon travail. Il a fourni jour après jour le phytoplancton pour nourrir les huîtres ; mais surtout, quand le travail de biologie moléculaire s'est révélé trop lourd pour mes seules deux mains, il m'a apporté une aide précieuse pour obtenir à temps l'ensemble des résultats. Pour la conscience avec laquelle il s'est acquitté de toutes ces tâches et pour tout le soutien matériel et moral qu'il m'a apporté, je le remercie de tout cœur.

Marc Barré est arrivé en cours de route dans ce travail mais il s'y est rapidement impliqué ; outre de nombreuses discussions stimulantes où il m'a poussée dans mes retranchements pour me faire réagir, je lui dois en particulier le développement du programme de tirages aléatoires utilisé à de nombreuses reprises dans cette thèse, et la relecture critique de la majeure partie du manuscrit. Un grand merci également à Pascal Phélipot, cichlidophile en Harley-Davidson, qui a amoureusement veillé sur les premières journées de mes petites bêtes. Je n'oublie pas Serge Heurtebise et Emile Planche sans qui rien ne fonctionnerait comme il le faut, ni Emmanuel Goyard, qui m'a fait découvrir les charmes de la bohème organisée (mais plus organisée que bohème!) et les ressources insoupçonnées d'Excel.

*C'est une grande chance d'avoir pu travailler en collaboration avec l'équipe de pathologie de La Tremblade ; je voudrais remercier tout particulièrement Nathalie Cochenec qui m'a initiée à la purification de *Bonamia ostreae* et qui a beaucoup donné de sa personne pour l'avancée du programme de sélection, ainsi que Bruno Chollet. Un grand merci également à Frank Berthe et sa bonne humeur au quotidien malgré les difficultés (au quotidien également), à Tristan Renault, et à Cécile Lipart aux cotés de laquelle il est devenu si agréable de travailler (et pas seulement parce que nous partageons les mêmes goûts en matière de radio!).*

Je remercie chaleureusement Yvette Simian, Martine Grasset et Ginette Cailletaux pour avoir contribué à régler pour moi les divers "détails" administratifs, et pour leur sourire du matin (et du soir aussi). Florence Albert-Rivet gère d'une main de maître la bibliothèque; qu'elle soit remercié pour toutes les réponses qu'elle a apporté à mes requêtes bibliographiques.

J'ai partagé les joies et les galères avec un certain nombre de stagiaires et thésards. Je pense tout d'abord à Bertrand Collet (et il en est fier), mais également à Arnaud Huvet, ainsi qu'à Florence, Joël, Katia, Ludovic, David, Michaël, Manuella, Marie, Magali, Qinggang le discret, Bérénice & Patrick, Xavier, Nicolas, Isabelle, Catherine et tout ceux que j'oublie....

J'ai passé au total 8 mois dans le laboratoire Génome et Populations situé à la Station Biologique de Sète, et toujours avec le même plaisir. Outre l'agréable proximité de Montpellier et de sa bouillonnante

activité scientifique, j'y ai reçu un excellent accueil, et les conditions de travail sont parfaites pour répondre au rythme de travail du thésard, espèce par nature toujours en retard dans ses manips.

Mes remerciements vont tout d'abord vers Claude Delsert sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. C'est lui qui a encadré mes premiers pas hésitants dans la biologie moléculaire ; je le remercie d'avoir dépassé ses idées (reçues?) sur les capacités des Agros en matière de travail à la paillasse et de m'avoir guidée sur la piste des microsattellites. J'espère qu'il n'a pas trouvé en moi une élève trop difficile ; il a en tout cas été un excellent professeur.

Le laboratoire de Sète ne tournerait pas comme il le fait sans la bienveillante houlette de Jean-Jacques Versini ; c'est lui de plus qui m'a initiée au séquençage. Un grand merci aussi à Marc Ohresser, l'apprenti-sorcier de la biologie moléculaire et ses "trucs et astuces pour la biomol facile" qui ont beaucoup contribué à alléger le fastidieux travail quotidien.

Je voudrais ici élever pour Christophe Lemaire (l'homme de la Pampa) la statue promise. Sa contribution à ce travail est immense puisque c'est lui qui m'a fourni le protocole (très puissant) pour extraire l'ADN sans effort. Je me souviens également de quelques soirées très conviviales...

Un grand merci également à tout le personnel et les stagiaires de la Station Biologique de Sète qui m'ont si bien accueillie sur les rives de l'Etang de Thau (avec une majuscule!) : merci à Monsieur A. Raibaut, Monique et Yolande, M. Euzet, Marie-Claude, Inès, Samia, Cheikhna, Claude, Alain, Hervé, Eve, Lounès, Antonia, Nicolas, Sophie, Christophe, Ivan, Claire et tous les autres.

Merci également à tous ceux que j'ai cotoyés à Montpellier, et surtout Annie Orth (et son sourire) pour avoir aplani pour moi tous les obstacles administratifs, ainsi qu'à Erick Desmarais pour ses conseils toujours bien vus.

J'ai utilisé dans le chapitre VII certains des résultats obtenus par Yves Vigouroux lors de son stage de DEA ; Nicolas Bierne a avancé en même temps que moi dans la mise au point des microsattellites, et ces résultats de DEA ont été d'une aide précieuse dans la discussion de nombreux points de ma thèse. Un grand merci à tous les deux.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à toute l'équipe de la station IFREMER de Bouin (Vendée) et tout d'abord à son directeur, Jean-Pierre Baud. C'est un plaisir de travailler avec quelqu'un d'aussi passionné, rigoureux et enthousiaste. Un grand merci également à Max Nourry et Nicolas Lebayon pour le soin qu'ils ont apportés à l'élevage des huîtres plates, à Joël Haure et tous ceux qui ont participé avec bonne humeur aux (nombreuses) journées de mesure de la croissance des huîtres, tâche qui donne tout son sel à la génétique quantitative.

Je n'oublie pas les équipes des stations IFREMER de La Trinité sur Mer, et notamment Anne-Geneviève Martin, Joseph Mazurié et Aimé Langlade ; de Palavas, et notamment Denis Coatanea, Catherine Vercelli, Jocelyne Oheix, Dominique Buestel et Yves Pichot ; de Port en Bessin et notamment Jean-Pierre Joly ; et d'Argenton et notamment René Robert. Le travail en réseau des différentes stations côtières dans le cadre du REGEMO (REseau GENétique Mollusques) a été un des aspects particulièrement enthousiasmant de cette thèse.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidée à obtenir des échantillons de populations d'huîtres plates un peu partout en Europe. Du Nord au Sud, je voudrais remercier

: Stein Mortensen (populations de Norvège), Paul van Banning (population des Pays-Bas), Catherine Collins et Sarah Culloty (populations d'Irlande), Jean-Pierre Joly (population de Normandie), Anne-Geneviève Martin (population de Bretagne), Marie-José Dardignac et un pêcheur anonyme (population de La Rochelle), Pierre Boudry et Jaime Montes (population d'Espagne et du Portugal), Yves Pichot et Catherine Vercelli (population de Méditerranée française), Nicoletta Riccardi (population de Venise) et Jean Prou (population de Croatie). Merci aussi à Françoise Blanc qui m'a fourni des échantillons du Maroc que je n'ai malheureusement pas pu exploiter.

Sophie Hubert, de l'University College of Galway, a pris beaucoup de son temps, alors que rien ne l'y obligeait, pour effectuer des électrophorèses enzymatiques dans le cadre de la recherche de groupes de marqueurs génétiques liés. Qu'elle en soit vivement remerciée.

Au Département des Sciences Animales de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, c'est grâce à Catherine Mariojouis que s'est éveillé mon intérêt pour la biologie en milieu aquatique, qui s'est confirmé pendant mon stage de DEA au Laboratoire de Génétique des Poissons (INRA), où j'ai reçu mon baptême des microsatellites. Merci aussi à Xavier Rognon et son oreille toujours attentive quand on a besoin de lui.

J'ai mis pour la première fois les pieds dans un laboratoire de recherche grâce à Frédéric Marion-Poll. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est aussi un peu de sa faute! Un grand et amical merci.

Enfin, je n'oublie pas toute la joyeuse bande d'Agros (et autres...) qui m'a offert son amical soutien pendant ces années (et j'espère que ça n'est pas fini!) et particulièrement à Carole Kerdelhué, championne (entre autre) dans l'organisation des vacances pour thésarde débordée.

Ce travail a pu être mené à terme grâce au soutien financier de l'IFREMER à travers ma bourse de thèse et les crédits alloués à l'URM N°16 dont j'ai largement bénéficié, et également grâce à la Région Poitou-Charente qui a co-financé ma bourse de thèse.

Mes parents et mon frère n'ont cessé tout au long de cette thèse de me soutenir tant matériellement que moralement, sans toujours trop savoir si tout ça servait vraiment à quelque chose. J'espère que ce manuscrit, qu'ils ne seront jamais obligé de lire mais dont ils jaugeront l'épaisseur en connaisseur, les rassurera quelque peu... De simples remerciements semblent bien dérisoire face à tout l'amour et la confiance qu'ils me donnent.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	9
------------------------------	----------

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE MODELE BIOLOGIQUE	15
A. DONNEES BIOGEOGRAPHIQUES SUR L'ESPECE <i>OSTREA EDULIS</i>	15
1. Eléments de systématique	
2. Répartition géographique d' <i>Ostrea edulis</i>	
3. Cycle biologique	
4. Elevage de l'huître plate	
B. LA BONAMIOSE : UNE CONTRAINTE MAJEURE SUR L'ELEVAGE D'<i>OSTREA EDULIS</i> EN EUROPE	19
1. Données historiques sur l'élevage de l'huître plate	
2. <i>Bonamia ostreae</i> et la bonamiose	
3. Programme de sélection	
4. Problèmes pathologiques récents en éclosion	
C. ETUDES GENETIQUES	32
1. Sélection pour la croissance	
2. Variabilité génétique et structuration des populations	
II. L'OUTIL GENETIQUE : LES MARQUEURS MICROSATELLITES	37
A. QU'EST CE QU'UN MICROSATELLITE?	37
B. CARACTERISTIQUES DES MICROSATELLITES	42
1. Fonction biologique	
2. Mutation	
3. Conservation des locus entre espèces	
4. Allèles nuls	
C. UTILISATION DES MICROSATELLITES	45
1. Identification d'individus et assignation de parenté	
2. Cartographie	
3. Structure des populations	
D. POURQUOI LES MICROSATELLITES?	47
CONCLUSION : PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE	49

**DEUXIEME PARTIE : IDENTIFICATION, SEGREGATION ET
LIAISON DE LOCUS MICROSATELLITES CHEZ *OSTREA EDULIS***

INTRODUCTION	51
III. IDENTIFICATION DE MARQUEURS MICROSATELLITES	53
A. MATERIELS ET METHODES	53
1. Identification de marqueurs polymorphes	
2. Test de polymorphisme chez <i>Ostrea edulis</i> et transfert à d'autres espèces d'huîtres plates	
B. RESULTATS	57
1. Identification de marqueurs microsatellites	
2. Mise au point des conditions de PCR et premières études de polymorphisme	
C. DISCUSSION	63
IV. SEGREGATION ET LIAISON DES MARQUEURS MICROSATELLITES	67
A. INTRODUCTION ; LA CARTOGRAPHIE GENIQUE	67
B. MATERIEL ET METHODES	68
1. Matériel biologique	
2. Marqueurs utilisés dans cette étude	
3. Méthodes statistiques	
C. RESULTATS	71
1. Ségrégations et liaisons	
2. Liaisons génétiques	
D. DISCUSSION	79
CONCLUSION	82

**TROISIEME PARTIE : VARIABILITE GENETIQUE DANS DES
POPULATIONS SELECTIONNEES ET SAUVAGES D'HUITRE PLATE**

INTRODUCTION	83
V. VARIABILITE GENETIQUE DANS DES POPULATIONS D'HUITRE PLATE SELECTIONNEES POUR UNE RESISTANCE A <i>BONAMIA OSTREAE</i>	87
A. INTRODUCTION : PROGRAMME DE SELECTION POUR LA RESISTANCE A <i>BONAMIA OSTREAE</i>	87
1. Première population sélectionnée (P85)	
2. Deuxième population sélectionnée (P89)	
3. Croisements entre populations sélectionnés	
B. MATERIEL ET METHODES	91
1. Matériel biologique	
2. Géotypage	
3. Analyses génétiques	
C. RESULTATS	103
1. Appui à la gestion des populations en sélection	
2. Variabilité génétique des populations sélectionnées	
D. DISCUSSION	115
1. Estimation du nombre de géniteurs	
2. Effet du goulot d'étranglement sur la variabilité génétique	
3. A posteriori : qu'a t'on fait en 1995?	
E. CONCLUSIONS : PISTES POUR LA GESTION FUTURE DES ANIMAUX	121
VI. STRUCTURATION DES POPULATIONS NATURELLES D'<i>OSTREA EDULIS</i>	123
A. LES ALLOZYMES : MARQUEURS NEUTRES OU SELECTIONNES?	123
B. NOTIONS DE GENETIQUE DES POPULATIONS	128
1. Equilibre de Hardy-Weinberg	
2. Populations structurées	
C. MATERIELS ET METHODES	133
1. Echantillonnage	
2. Analyses génétiques	
3. Analyses statistiques	
D. RESULTATS	140
1. Déséquilibre de liaison.	
2. Variabilité intra-population	
3. Différenciation génétique dans des populations naturelles d' <i>Ostrea edulis</i>	
E. DISCUSSION	149
1. Déficits en hétérozygotes	
2. Comparaison avec la structuration géographique révélée par les allozymes	
3. Apport de nos données à l'étude des marqueurs microsatellites	

**QUATRIEME PARTIE : VARIABILITE GENETIQUE ET
CROISSANCE DANS DES POPULATIONS NATURELLES ET DES
CROISEMENTS CONTROLES D'*OSTREA EDULIS***

VII. APPORT DES MARQUEURS MICROSATELLITES DANS LA COMPREHENSION DE LA RELATION HETEROZYGOTIE- CROISSANCE CHEZ LES BIVALVES MARINS	159
A. INTRODUCTION	159
B. MATERIELS ET METHODES	162
1. Matériel biologique	
2. Analyses du polymorphisme	
3. Analyses statistiques	
C. RESULTATS	165
1. Mortalité.	
2. Croissance	
3. Variabilité génétique	
4. Hétérozygotie multilocus et monolocus	
D. DISCUSSION	171
1. Structure génétique de l'échantillon étudié	
2. Conformité à Hardy-Weinberg	
3. Consanguinité	
4. Pourquoi n'y a-t'il pas de corrélation dans l'échantillon AV?	
E. CONCLUSION	177
VIII. PERFORMANCES DE CROISSANCE ET VARIABILITE GENETIQUE DANS DES CROISEMENTS CONTROLES	179
A. INTRODUCTION	179
B. MATERIELS ET METHODES	180
1. Matériel biologique	
2. Dispositif expérimental	
3. Mesures	
4. Analyses statistiques	
C. RESULTATS	184
1. Différence de croissance entre populations	
2. Différence de croissance entre familles	
D. DISCUSSION	188
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	191
BIBLIOGRAPHIE	195
ANNEXES	215

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les bivalves marins : des organismes originaux pour le généticien des populations...

La description de la variabilité génétique des êtres vivants est une étape indispensable pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'adaptation et l'évolution des espèces, mais aussi pour la gestion des ressources biologiques. Un des objectifs de la génétique des populations est de caractériser la variation génétique intra-spécifique. On peut trouver au sein d'une même espèce différentes populations génétiquement distinctes, évoluant plus ou moins indépendamment et ayant pu s'adapter à des conditions locales particulières. Chaque population, qui peut être considérée comme une unité évolutive, peut elle-même présenter une certaine diversité phénotypique, résultat de l'interaction de la variabilité génétique et de la plasticité phénotypique. La génétique des populations s'attache à décrire la variabilité génétique dans les populations naturelles, à en déterminer l'ampleur, l'origine, et à caractériser les forces qui la maintiennent. Notamment, elle vise à l'étude de l'équilibre entre la dérive génétique (changement des fréquences alléliques entre générations sous l'effet du seul hasard) qui conduit à la différenciation des populations, et les flux de gènes, qui conduisent à l'homogénéisation génétique des populations. Deux méthodes peuvent être utilisées pour analyser la structure des populations :

- la méthode directe qui repose sur l'observation de la mobilité des individus. Si les individus sont identifiables, et sur la base par exemple des techniques de capture-marquage-recapture, il est possible d'analyser les flux migratoires et de dispersion, ainsi que l'impact des extinctions et colonisations. Cependant cette méthode souffre de différents biais pour estimer le flux de gènes, et elle est limitée dans le temps (l'impact du flux de gènes en termes évolutifs devrait se mesurer sur un grand nombre de générations) et dans l'espace (problème de l'échelle géographique à retenir)
- la méthode indirecte repose sur l'observation des fréquences des allèles à un locus donné pour évaluer la structuration des populations et l'importance des flux géniques. Ces fréquences alléliques peuvent changer au cours du temps, soit par apparition de nouveaux allèles par mutation ou migration, soit par disparition d'allèles par contre-sélection ou suite à la dérive génétique.

L'approche indirecte est en général l'approche la plus aisée, notamment quand l'accès au terrain est difficile et quand les techniques de marquage et capture sont délicates chez l'organisme étudié.

La génétique des populations des bivalves marins a connu un développement récent, depuis une trentaine d'années seulement. Le milieu marin est en effet un milieu difficile à appréhender, en comparaison avec le milieu terrestre. Les organismes marins ont des histoires de vies parfois mal connues, présentant fréquemment des phases contrastées, avec par exemple une phase larvaire libre pélagique et une phase adulte benthique ou fixée. De plus, certaines notions sous-jacentes aux modèles évolutifs développés pour les organismes terrestres sont difficilement applicables dans le milieu marin ; par exemple la notion de barrière géographique, qui a une réalité concrète en milieu terrestre (cours d'eau, massifs montagneux), est moins évidente en milieu marin.

Parmi les organismes marins, les populations de mollusques bivalves ont été particulièrement étudiées depuis le début des années 1970, et cela pour plusieurs raisons : ils sont abondants, faciles à récolter et l'on compte parmi eux plusieurs espèces d'intérêt économique (huître, moule, palourde, coquille Saint-Jacques...). De plus, leur cycle de vie est représentatif de nombreux organismes marins : fécondation externe, phase larvaire pélagique de durée variable, puis métamorphose et recrutement des juvéniles, vie adulte immobile (fixée à un support ou sur les fonds). Ce cycle de vie intéresse le généticien des populations pour plusieurs raisons :

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

Ces caractéristiques pourraient donc faire des bivalves marins un organisme modèle pour le généticien des populations, organisme qui réunit toutes les conditions pour répondre aux principes élémentaires de la génétique des populations, notamment l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Les nombreuses études réalisées sur les bivalves marins ont cependant mis en évidence l'existence de deux phénomènes caractéristiques :

- déficit en hétérozygotes par rapport aux fréquences théoriques attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg
- corrélation positive entre l'hétérozygotie d'un individu à plusieurs locus enzymatiques et certains caractères liés à sa valeur sélective (croissance, survie...)

Ces phénomènes seront présentés de façon plus approfondie dans les chapitres VI et VII. Cependant, l'ensemble de ces études ont essentiellement été réalisées avec des marqueurs allozymes et il semble de plus en plus vraisemblable que la neutralité de ces marqueurs doive être remise en cause; le développement, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, de marqueurs ADN neutres, notamment RAPDs, RFLPs, microsatellites ou analyses de séquences d'ADN, permet de porter une lumière nouvelle sur ces questions.

... et exploités commercialement

Nous l'avons dit plus haut, un certain nombre de bivalves marins ont aujourd'hui une grande importance économique. L'histoire de la conchyliculture est émaillée d'une succession de phases d'exploitation d'une espèce, suivies de phases de surexploitation conduisant au déclin, souvent lié à des maladies, de cette même espèce, et enfin de recherche d'une espèce de remplacement. De plus, d'une simple phase de récolte des populations naturelles, la conchyliculture est passée à une étape de semi-domestication, et la maîtrise de l'élevage permet ainsi la mise en place de programme de sélections et d'amélioration génétique. La caractérisation de la variabilité génétique dans les populations naturelles est un apport considérable dans les problèmes de gestion des ressources génétiques. On peut espérer comprendre comment les différentes populations sont interconnectées, et éventuellement prévenir les surexploitations. La connaissance de la diversité génétique liée à la variabilité des biotopes et à la structuration des populations peut également être exploitable dans des programmes de sélection. En effet, la sélection naturelle peut favoriser différents allèles dans différents milieux, conduisant à la création de plusieurs entités génétiques discernables au sein d'une même espèce, entités qui peuvent posséder des gènes ou des combinaisons de gènes

intéressantes pour des programmes de sélection. Les populations naturelles peuvent alors être considérées comme des "réservoirs de gènes" utilisables en sélection.

Ostrea edulis : un modèle biologique

Cette thèse s'attache, dans ce cadre, à développer un nouvel outil moléculaire et à l'utiliser pour répondre à des questions liées à la génétique des populations et aux programmes d'amélioration génétique de l'huître plate *Ostrea edulis*. Cette espèce est l'huître endémique des côtes européennes, atlantiques et méditerranéennes. Elle est exploitée depuis l'Antiquité mais a quasiment disparu depuis la fin des années 60, au moins sur les côtes atlantiques, suite à la progression de deux maladies parasitaires successives, vraisemblablement introduites. Le premier parasite, *Marteilia refringens*, qui atteint les animaux en zone infra-littorale, a provoqué le déplacement de l'élevage de l'huître plate vers les zones d'eau profonde. Le deuxième parasite, *Bonamia ostreae*, attaquant aussi les élevages en profondeur, la production d'*Ostrea edulis* en Europe de l'Ouest est maintenant confidentielle, et elle reste un produit de luxe. Afin de relancer sa culture à grande échelle, un programme de sélection contre le principal agent pathogène, *Bonamia ostreae*, a été engagé au laboratoire IFREMER de La Tremblade, depuis 1985. Pour des raisons historiques, la variabilité génétique dans les populations sélectionnées était inconnue au démarrage de cette thèse, ce qui lui a donné sa première justification.

Les caractères quantitatifs sont souvent déterminés par un grand nombre de gènes dont certains ont un effet plus important que les autres. Plus le nombre de gènes impliqués dans un caractère est grand, plus le nombre de combinaisons alléliques possibles pour l'ensemble des gènes est important. Cela peut rendre difficilement décelable l'action de chaque gène. Au démarrage d'un programme d'amélioration génétique, le sélectionneur devrait donc s'attacher à disposer d'un grand nombre de ces combinaisons génotypiques afin de pouvoir effectuer la sélection sans perdre trop d'allèles ou d'association d'allèles intéressants, ou simplement pour en créer d'autres par le jeu des recombinaisons. De plus, au cours de la sélection, il est important de ne pas éliminer certaines de ces combinaisons. Ainsi, après 10 ans de sélection, il apparaissait donc nécessaire de faire un bilan de la variabilité génétique encore présente dans les populations issues de ce programme de sélection pour la résistance au parasite.

Buts de notre travail et plan de l'étude

Notre travail, qui s'inscrivait au départ directement dans le programme de sélection, a été élargi vers des problématiques plus larges concernant la génétique des populations des bivalves marins. Nous nous sommes attachés à caractériser des locus microsatellites chez *Ostrea edulis* et à développer leur utilisation comme outil de recherche pour comprendre la biologie évolutive et aider aux programmes d'amélioration génétique chez *Ostrea edulis*.

Ce travail est articulé en 4 parties :

- 1) La première partie est une synthèse bibliographique sur le modèle biologique, l'huître plate *Ostrea edulis*, et sur l'outil moléculaire utilisé, les marqueurs microsatellites. Dans le Chapitre I, après un rappel de systématique et de biogéographie, nous présentons un historique de l'élevage de l'huître plate et des problèmes pathologiques servant de cadre à ce travail, ainsi qu'un aperçu des travaux sur cette espèce dans les domaines de l'amélioration génétique par sélection et de la structuration des populations. Le Chapitre II permet de présenter les caractéristiques de l'outil moléculaire utilisé, et la justification de son choix. La problématique de l'étude est alors présentée.
- 2) La deuxième partie est consacrée à la recherche et la caractérisation de locus microsatellites chez l'huître plate. Dans le Chapitre III, nous évoquons la recherche de microsatellites par construction et clonage d'une banque génomique, et les potentialités de ces marqueurs chez cette espèce. Dans le Chapitre IV, nous présentons les études de ségrégations de ces locus, et leur utilisation pour poser les premières bases d'une cartographie de liaison du génome de cette espèce.
- 3) La troisième partie aborde les études de variabilité génétique chez *Ostrea edulis*. Le chapitre V porte sur l'étude de la variabilité génétique dans les populations du programme de sélection, en comparaison avec des populations témoins, et l'apport des marqueurs microsatellites pour la gestion de ce programme, notamment pour évaluer le nombre de géniteurs à l'origine des populations sélectionnées. Dans le chapitre VI, nous étudions plus largement la structuration des populations naturelles observées à l'aide de marqueurs microsatellites en comparaison avec des données allozymes existantes. Dans une discussion générale, nous proposons des voies de réflexion pour la gestion de la variabilité génétique des populations sélectionnées d'*Ostrea edulis*.
- 4) Dans une quatrième partie, nous abordons les liens entre paramètres génétiques et croissance. Le chapitre VII s'intéresse à l'apport des marqueurs microsatellites dans la

compréhension du phénomène de la relation entre hétérozygotie à des locus marqueurs et croissance dans des populations naturelles de bivalves marins. Le chapitre VIII aborde, quant à lui, les bases génétiques de la croissance chez *Ostrea edulis*, dans des familles biparentales suivies en conditions contrôlées.

PREMIERE PARTIE

LE MODELE BIOLOGIQUE ET

L'OUTIL MOLECULAIRE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE MODELE BIOLOGIQUE

A. DONNEES BIOGEOGRAPHIQUES SUR L'ESPECE *OSTREA EDULIS*

1. Eléments de systématique

Ostrea edulis (Linné, 1758) appartient à l'embranchement des Mollusques, classe des Bivalves (ou Lamellibranches), ordre des Filibranches et famille des Ostreidae (Grassé, 1960). (voir Tableau I-1).

L'histoire du genre *Ostrea* est complexe. Linné (1758) employa tout d'abord le terme *Ostrea* pour désigner un ensemble de Mollusques qui ne comptait pas que les huîtres. Il donna par la suite pour *Ostrea* la diagnose (basée sur des critères morphologiques) de l'huître plate *Ostrea edulis*. Plus tard, Lamarck (1801) regroupa sous le nom *Ostrea* toutes les espèces de la famille Ostreidae. Actuellement, cette famille, outre le genre *Ostrea*, regroupe les genres *Crassostrea* (Sacco, 1897), *Saccostrea* (Dollfus & Dautzenberg, 1920), *Pycnodonta* (Fischer de Waldheim, 1835) et *Tiostrea* (Chanley & Dinamani, 1980).

La validité de la notion d'espèce chez les huîtres est complexe et reste parfois non élucidée (Stenzel, 1971). En effet le polymorphisme important de la coquille (associé à une grande plasticité phénotypique) peut amener à considérer comme espèces différentes des "variétés" de forme ou de coloration, ou inversement à regrouper sous le même nom des espèces différentes, mais dont la coquille adulte se ressemble. La systématique de la famille des Ostreidae a été fréquemment remaniée, essentiellement sur des critères morphologiques, et certaines espèces ont été décrites à différentes reprises sous des genres différents (citons par exemple *Ostrea rivularis* Gould, qui a été maintenant reclassée dans le genre *Crassostrea*). Le nombre d'espèces du genre *Ostrea* reste aujourd'hui mal connu. Trente-quatre espèces sont bien documentées, auxquelles s'ajoutent une vingtaine de taxons qui n'apparaissent qu'épisodiquement dans de la littérature relativement ancienne et n'ont pas été repris ensuite, et peuvent être considérés comme "douteux".

Le genre *Ostrea* possède une répartition très large dans les eaux chaudes et tempérées de tous les océans (Jaziri, 1985), avec une distribution cependant préférentiellement pantropicale. Parmi les principales espèces, citons notamment :

- *Ostrea angasi* (Sowerby), que l'on trouve en Australie, Nouvelle-Zélande, mais également en Mer Rouge, à l'Ile Maurice, à Singapour, aux Philippines, et qui commence à être commercialement exploitée en Australie.
- *Ostrea densalamellosa* (Lischke), trouvée en Chine, Corée, Japon, mais dont l'exploitation commerciale est en déclin, l'espèce étant peut-être en voie d'extinction
- *Ostrea folium* (Linné), à répartition géographique très large : du Maroc au Gabon, mais aussi Australie, Malaisie, Inde... Elle a fait l'objet de cultures expérimentales en Malaisie.
- *Ostrea lurida* (Carpenter), sur la cote pacifique américaine, depuis l'Alaska jusqu'au Mexique. De nombreux auteurs considèrent cette espèce comme un synonyme de *O. conchaphila* (Carpenter) mais Baker (1995) recommande l'utilisation du nom *lurida* plus répandu.
- *Ostrea permollis* (Sowerby), trouvée aux Antilles, Floride, Caroline du Nord
- *Ostrea puelchana* (D'Orbigny), répartie sur la cote atlantique sud-américaine, depuis le Brésil jusqu'en Argentine où elle fait l'objet d'une exploitation commerciale.
- *Ostrea stentina* (Payraudeau), trouvée au Sud de la Méditerranée et sur l'ensemble des cotes africaines, mais trop petite pour être exploitée commercialement

2. Répartition géographique d'*Ostrea edulis*

De caractère plus océanique que l'huître creuse, *Ostrea edulis* vit dans des eaux salées et peu turbides. Les bancs et les cultures sont situées sur des zones infralittorales ou toujours immergées. L'huître plate *Ostrea edulis* est l'huître indigène des côtes françaises. Son aire de répartition naturelle couvre cependant une zone géographique beaucoup plus vaste sur les côtes européennes, depuis la Norvège (65^{ème} degré de latitude Nord) jusqu'à la baie d'Agadir au Maroc, en passant par le pourtour méditerranéen, en France, Italie, Sicile mais aussi au Maroc et en Tunisie, et jusqu'en Adriatique et en Mer Noire (Ranson, 1967; Marteil, 1976; Jaziri, 1990; voir Figure I-1). 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 & Haley, 1982) et au Japon.

Cette distribution géographique, essentiellement en milieu tempéré, distingue *Ostrea edulis* des autres espèces du genre *Ostrea* à distribution plutôt tropicale. Une telle distribution pose le problème de l'origine de l'espèce. Les hypothèses possibles sont rappelées par Jaziri (1990) : certains auteurs penchent pour une origine atlantique (Ranson, 1948, Trochon, 1976), alors



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 Changement de sexe soit annuellement soit au cours d'une même saison

Tableau I-1 : Position systématique et particularités morphologiques d'*Ostrea edulis*

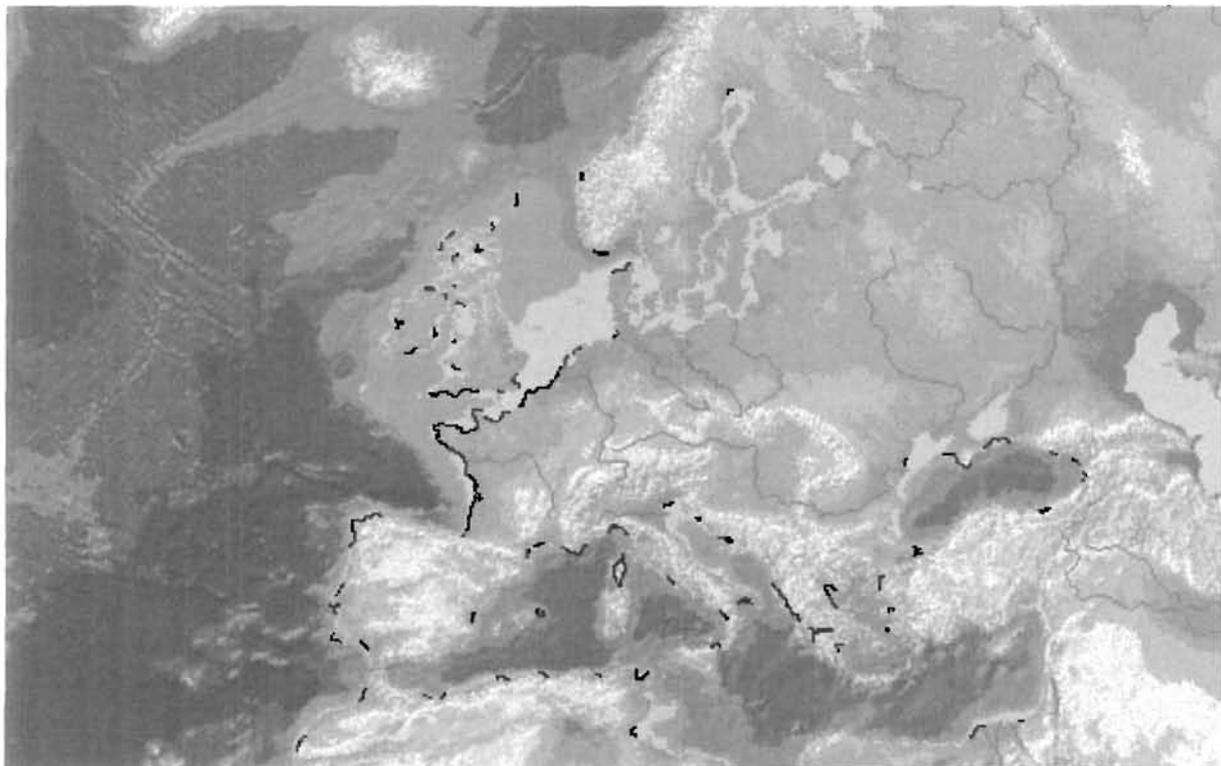


Figure I-1 : Répartition géographique d'*Ostrea edulis* L. (en rouge) (d'après Jaziri, 1985)

que d'autres supposent, sur la base de données paléontologiques, sa présence en Catalogne, l'espèce étant assimilée à la descendante d'une espèce plus ancienne, *Ostrea lamellosa*. La Méditerranée aurait joué un rôle refuge au cours des glaciations du quaternaire et les gisements actuels de la façade atlantique européenne se seraient reconstitués à partir de populations méditerranéennes (voir Jaziri, 1990). Enfin, sur la base d'analyses portant sur le polymorphisme enzymatique (voir chapitre VI), Saavedra *et al.* (1995) envisagent la séparation des populations européennes en deux stocks atlantique et méditerranéen pendant le Quaternaire, les deux stocks ayant ainsi évolués séparément puis étant entrés par la suite en contact secondaire.

3. Cycle biologique

L'huître plate est un animal hermaphrodite asynchrone à sexualité consécutive rythmique. Elle est généralement protandrique mais peut changer de sexe plusieurs fois dans la même saison de ponte. Elle constitue ses gonades au printemps et prend un aspect laiteux. Elle se reproduit en été et en automne dans le milieu naturel. *Ostrea edulis* est une espèce larvipare (ou incubatrice) contrairement à *Crassostrea gigas*. Le mâle libère le sperme dans le milieu, la femelle filtre les gamètes et la fécondation a lieu dans la cavité palléale. Pendant huit à dix jours la femelle incube les larves dans la cavité palléale puis les libère dans le milieu à raison d'un million par ponte en moyenne. Les larves mesurent alors 160 µm environ. La vie pélagique de ces larves pédivéligères dure encore 10 jours, au terme desquels elles se fixent sur un support. Les juvéniles sont capables de se reproduire dès le premier été. Ce cycle est résumé sur la Figure I-2.

4. Elevage de l'huître plate

a) Techniques ostréicoles

L'ostréiculture actuelle repose essentiellement sur la mise en élevage de juvéniles en milieu naturel. Ces juvéniles (naissain) peuvent être obtenus selon plusieurs techniques: pêche de juvéniles sur les gisements huîtres classés (très réglementée dans le cas de l'huître plate), captage naturel des juvéniles produits par les géniteurs des gisements naturels et les huîtres en élevage, ou approvisionnement à partir d'une éclosérie. Actuellement, c'est le captage de naissain sur des collecteurs, quelle que soit leur nature (coquilles vides, tuiles chaulées, ardoises, tubes plastiques...) qui est la principale source d'approvisionnement des éleveurs d'huîtres plates. Cinq écloséries commerciales existent en France et certaines d'entre elles

produisent du naissain d'huître plate. Ces établissements possèdent des géniteurs qu'ils reproduisent de façon contrôlée; les larves sont élevées pendant leur phase pélagique et la fixation après métamorphose se fait sur des collecteurs fournis par l'éleveur. Ce maillon de l'élevage ostréicole apparaît comme indispensable à la diffusion du progrès génétique découlant du programme de sélection.

Actuellement, l'élevage de l'huître plate ne se pratique quasiment plus qu'en Bretagne, selon des techniques culturales visant à produire des huîtres de taille marchande en 2 ans avant que les mortalités massives dues à *Bonamia ostreae* ne se produisent. Pour l'essentiel, elles sont élevées en semis direct sur le sol en eau profonde, à des densités 5 à 10 fois plus faibles que pour les huîtres creuses (100 kg à l'hectare contre 500 à 800 kg), et parfois en mélange avec ces dernières (Bodoy, 1993). La récolte se fait par simple dragage. Cependant, il semble que certains producteurs d'huîtres creuses tentent de diversifier leur production en élevant des huîtres plates en poches (élevage en surélévation dans la zone de balancement des marées) ou en prélevant les huîtres plates captées spontanément sous les tables ostréicoles (notamment à l'Aber Wrach' et à Paimpol) (E. Goyard, comm.pers.).

b) *Maîtrise du cycle de vie en éclosion*

L'ensemble du cycle de vie peut être réalisé en éclosion. Il est possible, essentiellement par des augmentations de la température, d'amener les huîtres à la maturité sexuelle et d'obtenir des reproductions (les connaissances actuelles sur la maîtrise du cycle de vie en éclosion sont rappelées en Annexe C). Cependant, les fécondations *in vitro* sont difficiles (taux de survie extrêmement faible, A. Gérard, comm.pers.) et la phase d'incubation des larves dans la cavité palléale de la femelle semble donc indispensable dans l'état actuel des connaissances. De plus, des difficultés zootechniques notables ont été rencontrées dans l'obtention de maturations synchrones et dans l'induction de la ponte. L'induction de la ponte par choc thermique permet difficilement l'identification des sexes, et tous les animaux ne répondent pas de façon synchrone à un tel stimulus. Des essais de synchronisation et d'obtention de pontes par utilisation d'inducteurs chimiques (sérotonine) ont donné des résultats sur les individus mâles, sans toutefois permettre une utilisation en routine de cette technique (Y. Naciri-Graven, A. Gérard, comm.pers.). En conséquence, les familles de demi-frères sont pour l'instant hors de portée.

Deux techniques sont ainsi possibles pour reproduire, de façon efficace, les huîtres plates en éclosion. La première technique, dite de ponte en masse, consiste à faire murer ensemble un nombre important d'animaux dans le même bac et à récupérer les larves quand elles sont

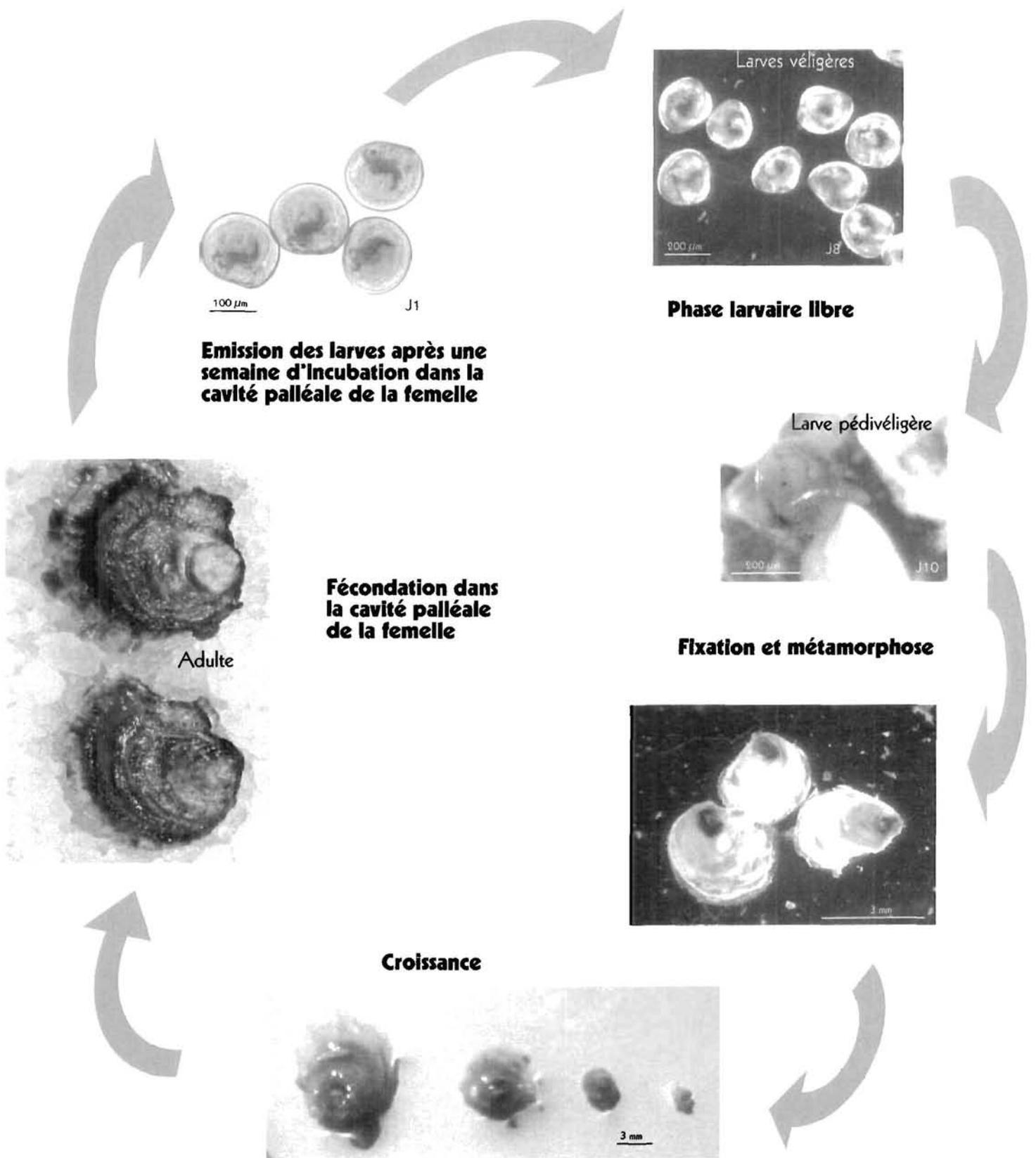


Figure I-2 : Schéma du cycle biologique d'*Ostrea edulis*

émises par les femelles. Cependant, cette technique ne permet pas de connaître le nombre et l'identité des animaux ayant pondu et ne permet donc pas le contrôle des croisements. La seconde technique permet d'obtenir des croisements contrôlés, uniquement du type plein-frères : les croisements sont en effet obtenus en faisant maturer les huîtres deux par deux dans des aquariums et en récupérant les larves après la ponte. Cette technique a été réadaptée au laboratoire par A. Gérard et Y. Naciri-Graven d'après Newkirk (1986). Comme il est difficile de connaître le sexe de chaque animal a priori, les couples sont réalisés au hasard et on a donc une chance sur deux (en espérance) d'avoir "apparié" deux animaux de sexe opposé.

B. LA BONAMIOSE : UNE CONTRAINTE MAJEURE SUR L'ELEVAGE D'*OSTREA EDULIS* EN EUROPE

1. Données historiques sur l'élevage de l'huître plate

L'huître plate est consommée depuis fort longtemps et était déjà expédiée jusqu'à Rome au début de notre ère (Gouletquer & Héral, 1997). En France, les gisements naturels ont été, pendant des siècles, intensément exploités par simple ramassage à marée basse ou par pêche à partir de bateau dans des eaux plus profondes. Des gisements importants (5 trillions de coquilles d'huîtres) observés dans le sud-ouest de la France et datés du 10^{ème} siècle témoignent de l'importance de cette activité de pêche (Gruet & Prigent, 1986). Les premiers arrêtés visant à limiter les récoltes pendant les périodes de reproduction ont été promulgués dès 1750 du fait de la surexploitation des bancs naturels de la côte Atlantique. C'est à cette même époque que les premières cultures d'huîtres se sont développées dans des réservoirs de marais salants puis dans des bassins spécialement aménagés. L'ostréiculture en marais s'est poursuivie parallèlement au déclin technique et économique des marais salants du centre ouest. L'ostréiculture moderne, qui se définit par la possibilité de capter du naissain, n'a pris naissance qu'aux alentours de 1850 (Héral, 1986).

Pendant le 19^{ème} siècle, les débuts de l'ostréiculture moderne et le développement du commerce se sont traduits par une augmentation sensible de la consommation et des ventes. Malgré les arrêtés successifs, l'intensification de l'effort de pêche a pesé lourd sur les gisements naturels d'huîtres plates. Pour faire face à la pénurie, des huîtres creuses (*Crassostrea angulata*) ont été importées dès 1860 depuis le Portugal vers le bassin d'Arcachon. Au cours d'un de ces transports, le bateau "Le Morlaisien", en perdition dans une tempête, a dû se réfugier dans l'estuaire de la Gironde et rejeter sa cargaison à la mer,

conduisant à l'implantation sur les côtes françaises de cette espèce. L'huître creuse portugaise a proliféré rapidement et a rapidement concurrencé l'huître plate. Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, la production ostréicole s'est équilibrée entre les deux espèces, puis l'huître plate a été affaiblie par un épisode de mortalité inexplicable dans les années 1920. La culture de l'huître plate a ensuite repris, en Bretagne essentiellement, et *Crassostrea angulata* a supplanté *Ostrea edulis* au sud de la Vilaine (Gouletquer & Héral, 1997). La production d'*Ostrea edulis* tourne aux alentours de 20.000 tonnes jusqu'à la fin des années 60.

Pendant les années 60, la production de *C. angulata* a connu un important déclin du fait de la surexploitation, et l'espèce a disparu des côtes françaises dans les années 1971-1972 suite à la généralisation de la "maladie des branchies" (iridovirus). L'espèce asiatique *Crassostrea gigas* a alors été introduite massivement depuis le Japon, avec un succès grandissant (Grizel & Héral, 1991). Concomitamment, la production de l'huître plate en France a connu un très important déclin du fait de deux attaques parasitaires successives: *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*. *Marteilia refringens*, protozoaire parasite du système digestif, est apparu en France à la fin des années soixante, causant de fortes mortalités dans les élevages en estuaires (Grizel *et al.*, 1974). Les élevages d'huître plate ont alors été transférés en eau profonde. *Bonamia ostreae* est apparu à la fin des années 70 et a porté la plus grave atteinte à l'élevage d'*Ostrea edulis*. (voir Figure I-3).

2. *Bonamia ostreae* et la bonamiose

a) *Epidémiologie*

Bonamia ostreae a été découvert en Europe suite à d'importantes mortalités recensées sur des huîtres de l'île Tudy (Bretagne) (Pichot *et al.*, 1979; Comps *et al.*, 1980). Cette parasitose hémocytaire, inconnue alors dans les élevages français, s'est ensuite répandue rapidement (Tigé *et al.*, 1981; 1982) et, dès l'année 1982, presque tous les centres importants d'élevage étaient touchés (Perraudin, 1983). La présence du parasite a été notée également dans d'autres régions d'Europe, Pays-Bas (Van Banning, 1985; 1991), Espagne (Polanco *et al.*, 1984, Figueras, 1991), Danemark (Elston *et al.*, 1987), Angleterre et Irlande (Rogan *et al.*, 1991) ainsi qu'en Amérique du Nord (Elston *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1989; Friedman & Perkins, 1994). *B. ostreae* touche les élevages en eaux profondes aussi bien que ceux en estuaires (Alderman, 1981).

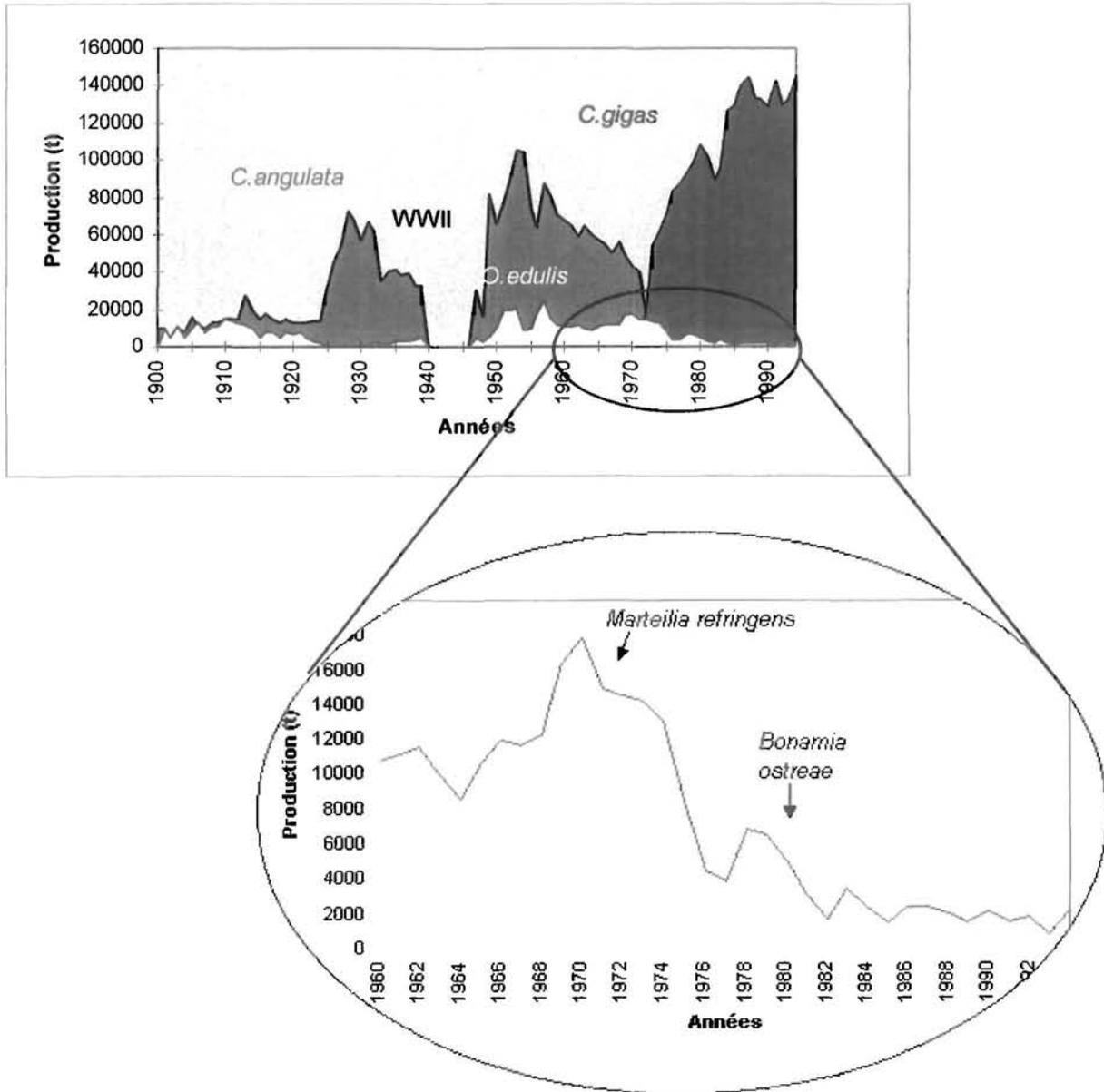


Figure I-3 : Production ostréicole en France depuis le début du siècle (D'après Gouletquer & Héral, 1997)

b) Pathologie

La bonamiose est une maladie parasitaire infectieuse, inoculable, contagieuse, dont l'agent pathogène, *Bonamia ostreae*, est un protozoaire proche des Haplosporidies, qui se développe dans le cytoplasme des cellules sanguines (voir Figure I-4).

Les animaux atteints présentent parfois des lésions branchiales plus ou moins prononcées, mais seul un diagnostic histologique permet d'identifier à coup sûr le parasite. (Perraudin, 1983). Le cycle de développement semble très simple (Comps, 1983) : les parasites présents dans la cellule hôte se multiplient par simple scissiparité, ce qui se traduit par la destruction de cette cellule.

Bonamia ostreae est associé à la présence dans les tissus de deux types de cellules :

- cellules denses, les plus fréquentes dans les tissus. Elles sont constituées d'un cytoplasme dense, riche en ribosomes. Le noyau contient un matériel granuleux opaque aux électrons. La cellule contient également des mitochondries, ainsi que des corps très denses sans structure apparente, qui pourraient être une forme résistante du parasite. En effet, on les retrouve sous forme libre dans les tissus altérés, et elles pourraient assurer l'extension de la maladie.
- cellules claires, plus rares dans les tissus, et supposées être végétatives.

Des formes plasmodiales ont été observées, qui permettraient d'expliquer le développement explosif du parasite avant la mort de l'animal. En effet, on peut envisager deux types de multiplication: une multiplication simple (division binaire) à un stade précoce de la maladie, et une multiplication à partir des plasmodies, de type schizogonique permettant un développement explosif du parasite en fin de maladie.

Van Banning (1990) propose un cycle d'infection du parasite qui passerait par un premier stade dans le tissu ovarien (voir Figure I-5) qui pourrait expliquer certaines caractéristiques de la maladie:

- La maladie se développerait seulement chez les individus femelles; dans ses 1-2 premières années, *Ostrea edulis* est plus souvent mâle, et moins sensible au parasite.
- L'infection aurait une période de développement (ou d'incubation) dans l'ovaire, avant que la phase finale ne se déroule dans les hémocytes avec infiltration dans les autres tissus.
- Le cycle ovarien d'*Ostrea edulis* déterminerait la phase du parasite. Pendant la saison de ponte, le parasite se développe, tuant l'animal à la fin de l'été ou au début de

l'automne, et relâchant des formes infectieuses pouvant infecter d'autres huîtres femelles.

La bonamiose peut être décelée chez des huîtres de tous âges mais le naissain est en général peu parasité. Grizel (1985) note que entre 1980 et 1985, pour des cohortes originaires de la Baie de Quiberon, le taux de parasitisme avoisine 0% pour le naissain et est inférieur à 10% pour les animaux de 18 mois, les animaux de 30 mois et plus étant parasités à plus de 30%. La bonamiose semble infecter particulièrement les animaux au cours de leur deuxième été et l'âge critique pour le développement semble être deux ans : au delà, la maladie se développe très rapidement (voir Grizel & Tigé, 1982; Grizel *et al.*, 1988; van Banning, 1990; McArdle *et al.*, 1991; Culloty & Mulcahy, 1996).

Le parasite semble être présent tout au long de l'année et le cycle d'infection et de mortalité est continu (Grizel *et al.*, 1988; Culloty & Mulcahy, 1996). La transmission de la maladie s'effectue probablement par contamination directe par des parasites provenant de cadavres d'animaux parasités (Grizel, 1985).

Un protocole de purification fiable du parasite a été mis au point (Hervio *et al.*, 1995) et permet l'infection expérimentale des animaux par inoculation des animaux purifiés.

c) *Origine possible du parasite*

Katkansky *et al.* (1969) ont étudié les possibilités d'élevage d'*Ostrea edulis* en Californie en 1963. En 1969, les élevages ont subi des mortalités de 100%, attribuées à un parasite intrahémocytaire du type "microcell". Elston *et al.* (1986) ont par la suite analysé les mortalités d'huîtres plates sur les côtes de l'état de Washington, et les ont attribuées à la présence de *Bonamia ostreae* qui a été identifié comme étant le parasite "microcell" précédemment décrit, sur la base d'observations en microscopie électronique. Cette identité a été récemment confirmée par des techniques immunologiques (Renault, 1996). Friedman *et al.* (1989) indiquent par ailleurs que *B. ostreae* est le parasite le plus fréquent dans les élevages d'huîtres plates en Californie.

L'hypothèse qui prévaut actuellement est que des importations d'huîtres plates infectées de Californie seraient à l'origine de l'épidémie de *Bonamia ostreae* en France (Balouet *et al.*, 1983; Elston *et al.*, 1986; Renault, 1996), en Espagne (Figueras, 1991), et dans les autres pays européens, ainsi que dans l'état de Washington (Elston *et al.*, 1986) et dans le Maine (Friedman & Perkins, 1994).

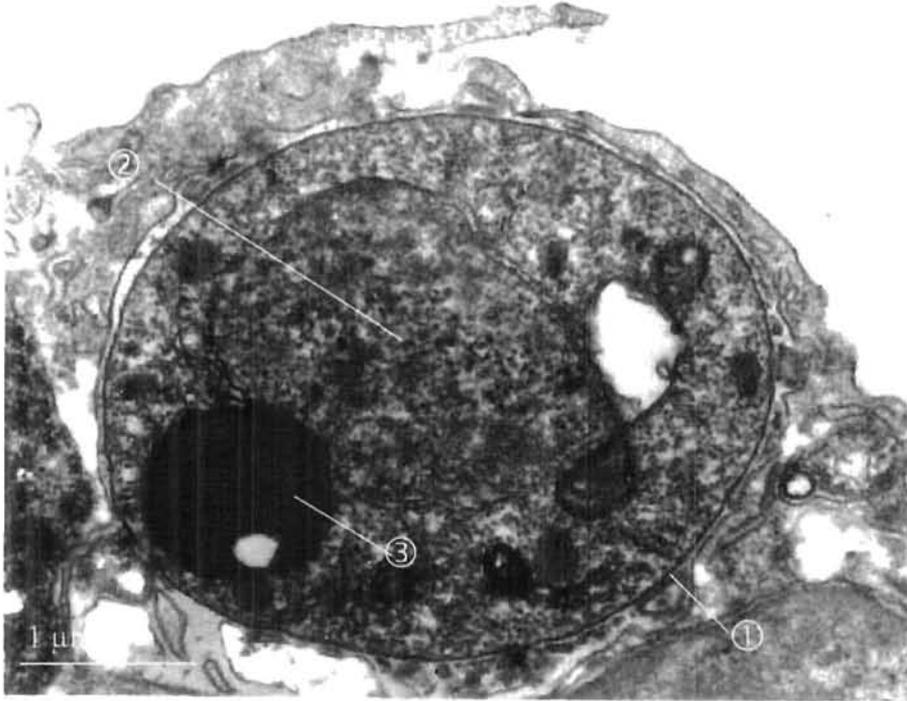


Figure I-4 : Cellule de *Bonamia ostreae* vue en microscopie électronique (photo N. Cochenec)

① : Membrane cellulaire, ② : Noyau, ③ : Corps dense

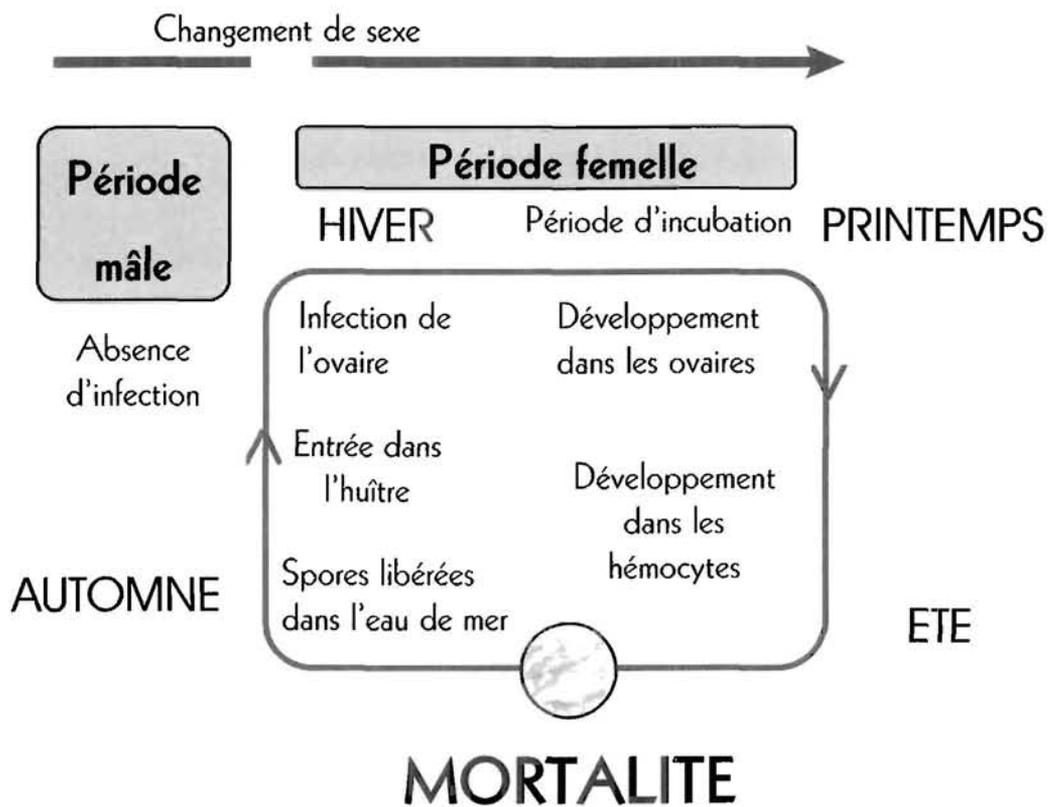


Figure I-5 : Cycle de développement possible de *Bonamia ostreae* (d'après Van Banning, 1990)

d) *Conséquences zootechniques et économiques*

La culture de *Crassostrea gigas* s'est développée en Bretagne parallèlement à la propagation de *Marteilia refringens*. Puis progressivement, *C. gigas* s'est substituée à *Ostrea edulis* dans la plupart des centres ostréicoles (Grizel, 1985). L'ostréiculture française connaît maintenant une situation de quasi-monoculture de *C. gigas*, *Ostrea edulis* n'étant plus produite que dans quelques zones en Bretagne et en Méditerranée (Etang de Thau), et la production restant faible (2120 tonnes en 1994 contre 131000 tonnes pour *C. gigas*, Source FAO).

L'impact économique des maladies de l'huître plate a été évalué par Meuriot & Grizel (1984) et Grizel (1985). Les deux épizooties ont entraîné d'importantes modifications des pratiques culturales d'*Ostrea edulis* (déplacement des élevages en eau profonde, baisse des densités et de la durée des cycles d'élevage) et l'essor de la culture de *Crassostrea gigas*. Les conséquences économiques ont été également importantes, puisque les pertes cumulées entre 1980 et 1983 ont été évaluées à 1,6 milliard de francs de chiffres d'affaires et 1,3 milliard de valeur ajoutée. De plus, si le développement de la marteiliose n'a pas conduit à une perte d'emploi en raison de la reconversion des élevages vers l'huître creuse, près de 20% des emplois ont disparu entre 1980 et 1982, du fait de l'extension de la bonamiose.

e) *Réponses possibles*

L'impact de la bonamiose a été plus important que celui de la marteiliose, le parasite ayant touché tous les centres de production et la maladie étant survenue à la suite d'une période moins prospère pour les entreprises. La relance de l'huître plate paraît cruciale pour l'ostréiculture française, qui se trouve en situation de quasi-monopole, avec tous les risques que cela suppose. De plus, *Ostrea edulis* (la fameuse "belon") reste très appréciée des gourmets, en France mais aussi dans d'autres pays européens et notamment en Espagne où peu d'huîtres creuses sont consommées. Son prix de vente dépasse largement celui de l'huître creuse : de 40 F/kg au départ des exploitations (contre 10 F/kg pour l'huître creuse), son prix de détail peut atteindre 100 F/kg (voir Figure I-6). Les ostréiculteurs sont donc fortement demandeurs d'une relance de la culture à grande échelle, bien que l'éventuel impact économique de la relance de cette espèce sur le marché ostréicole reste encore à étudier.

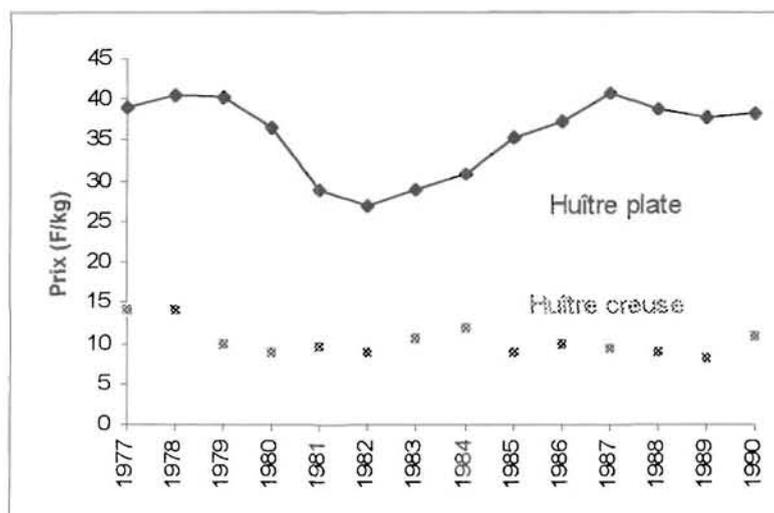


Figure I-6 : Evolution depuis 20 ans du prix du kilo d'huîtres au départ des exploitations

Différentes mesures prophylactiques sont possibles pour lutter contre une épizootie: prophylaxie médicale, prophylaxie sanitaire ou prophylaxie zootechnique.

Les huîtres n'ayant pas à proprement parler de système immunitaire, une prophylaxie médicale semble difficile à mettre en oeuvre. Le système de défense des Invertébrés se distingue, entre autres, de celui des Vertébrés par l'absence de réponse immunitaire faisant intervenir des cellules spécialisées (type lymphocytes T ou B). Chez les bivalves, les mécanismes de défense observés sont immédiats et non inductibles, à médiation cellulaire et reposent essentiellement sur l'activité phagocytaire des hémocytes (cellules circulantes trouvées dans l'hémolymphe, voir revue dans Cochenec, 1997).

(1) Prophylaxie sanitaire

Après la découverte de *Bonamia ostreae* en Europe, des mesures préventives ont été prises, en particulier la destruction des stocks infectés et l'interdiction des transferts d'animaux des zones infestées vers les zones saines. En France, ces mesures préventives ont permis de continuer la production en eaux profondes dans la Baie du Mont Saint Michel et dans la Baie de Saint-Brieuc (Grizel, 1987). L'absence d'infection sur les juvéniles permet de continuer à capter le naissain même dans des zones infectées.

En réponse aux deux maladies qui déciment l'huître plate, un plan de sauvegarde a été mis en place à partir de 1982. Il visait à éviter la disparition totale de l'huître plate en Bretagne et à préserver l'outil de production ainsi que les emplois, afin de permettre une relance de cette activité, après assainissement de la situation épizootologique. Résultat d'une concertation entre le Ministre de la Mer, les représentants des organisations professionnelles et les

scientifiques de l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes), ce plan de sauvegarde comportait trois séries de mesures :

- * mesures techniques et sanitaires, ayant pour but l'assainissement des zones parasitées et le redémarrage de la production bretonne. Ces mesures concernaient l'éradication du parasite par destruction des stocks contaminés et le contrôle de l'élevage et des transferts d'animaux entre zones touchées et zones indemnes;

- * mesures financières d'indemnisation des professionnels touchés par la parasitose et participant à la mise en oeuvre de ce plan;

- * mesures financières en faveur des entreprises ostréicoles pour le maintien de l'emploi permanent et leur reconversion vers d'autres activités conchyloles ou aquacoles.

(2) Prophylaxie zootechnique

Elle s'est traduite par trois séries de mesure : l'adaptation des conditions d'élevage, l'acclimatation d'autres espèces d'huîtres plates et la recherche de souches d'*Ostrea edulis* résistantes.

Les pratiques culturales ont dû être adaptées pour permettre de mener l'huître plate jusqu'à une taille marchande tout en limitant, avant la vente, les mortalités dues à *Bonamia ostreae*. Cela s'est fait en diminuant les densités d'élevage pour limiter la transmission du parasite ou en évitant de manipuler inutilement les animaux, le stress étant supposé favoriser la maladie (Grizel, 1987). En pratique, il est impossible d'estimer les effets réels de ces mesures, essentiellement en raison de l'extrême difficulté à prendre en compte tous les paramètres environnementaux qui influent sur les infections. Les stratégies d'élevage doivent être adaptées en fonction de l'âge des huîtres, le taux d'infection semblant varier avec ce paramètre. Le naissain âgé de 1 an est ainsi semé au printemps en eaux profondes (exemptes de *Marteilia*) et élevé jusqu'à la fin de l'année du deuxième été. Les éleveurs préfèrent en général vendre les huîtres à cet âge (2 ans ½) même à des poids souvent inférieurs à 40 g plutôt que de risquer des mortalités importantes durant l'été suivant (rappelons que la taille commerciale traditionnelle de l'huître plate se situe entre 50 et 75g pour les plus gros calibres).

Des essais d'acclimatation d'autres espèces d'huîtres plates (*Ostrea chilensis*, *O. densalamellosa*, *O. angasi* et *O. puelchana*) ont été tentées dans les années 80, mais sans succès, ces espèces se révélant peu adaptées au milieu (survie et croissance médiocres) et/ou

également sensibles aux deux parasitoses (Grizel *et al.*, 1983; Leborgne & Le Pennec, 1983; Bougrier *et al.*, 1986; Robert *et al.*, 1991).

Malgré le plan de relance, *Bonamia ostreae* n'a pas disparu des côtes françaises. C'est en 1985 que l'IFREMER décide alors d'orienter les recherches vers la sélection d'animaux résistants.

3. Programme de sélection

a) Exemples de sélection pour la résistance à un parasite chez les bivalves

Des exemples encourageants de sélection pour la résistance à une maladie existent chez les mollusques bivalves. Dès la fin des années 50, suite à de fortes mortalités dues à une maladie d'étiologie inconnue ("Malpeque disease"), la réhabilitation de l'industrie ostréicole sur la côte est du Canada (Malpeque Bay, Logie *et al.*, 1961) a été possible grâce à l'utilisation d'animaux ayant naturellement résisté à la maladie.

Le principal programme documenté est celui concernant la sélection de *Crassostrea virginica* pour une résistance à *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Celui-ci a démarré au début des années 1960, dans la baie de Delaware dans le New-Jersey (Haskin & Ford, 1979). La première génération a été produite à partir d'individus ayant survécu à une exposition naturelle de 2 ans ½ au parasite (90 à 95% de mortalité dans la population). Chaque nouvelle génération, produite par ponte en masse, était soumise à la même période d'exposition et testée régulièrement pour la résistance mais également la croissance et la prévalence du parasite. La mortalité était comparée à celle d'animaux témoins, produits à partir de populations n'ayant pas ou peu été en contact avec le parasite antérieurement à l'expérience. La première génération sélectionnée montrait une mortalité de 65% contre 90% pour le témoin, et dans les générations suivantes le progrès s'est confirmé (58%, 41%, 49% et 30% pour les générations 2 à 5, Ford & Haskin, 1987). Les auteurs notent cependant que les animaux nommés résistants ne sont pas pour autant réfractaires à l'infection. Ces derniers sont en effet parasités, mais les infections restent localisées. Les animaux résistants semblent capables de tolérer le parasite, mais après plusieurs années d'exposition, même les animaux les plus sélectionnés meurent suite à l'infection (Ford & Haskin, 1987). Ces animaux atteignent néanmoins une taille commerciale en 2-3 ans, soit avant la période critique des mortalités importantes.

En ce qui concerne plus directement la sélection pour une résistance à *Bonamia ostreae*, signalons les travaux d'Elston *et al.* (1987) aux Etats-Unis. Une souche dite "Casco", originaire

de la côte Est et supposée n'avoir jamais été en contact avec la maladie, a été élevée avec une souche dite "Washington", originaire de la côte Ouest et supposée avoir survécu à une épizootie à *Bonamia ostreae* (avec des taux d'infection estimés à 30%). Après 10 mois de maintien en laboratoire, 99 % des huîtres de la souche "Casco" étaient mortes et 93% d'entre elles étaient porteuses de parasites, alors que seulement 26% des huîtres de la Côte Ouest étaient mortes avec présence de parasites dans 50% des cas. Les auteurs avaient alors conclu que la souche "Washington" était résistante au parasite. Cependant, des expériences complémentaires portant sur la survie comparée après infestation artificielle (Hervio *et al.*, 1995) de cette souche et d'une souche méditerranéenne semblent indiquer qu'en réalité "Washington" n'est pas plus résistante que les huîtres européennes, et que, plus vraisemblablement, la souche "Casco" présente une sensibilité exceptionnelle à la maladie (Hervio, 1992).

*b) Programme français de sélection pour la résistance à
Bonamia ostreae*

Notre programme de sélection a été initié en 1985 par l'équipe de Pathologie alors en place à la station de la Tremblade. Le but était à cette époque d'améliorer et de valider le test de reproduction artificielle de la bonamiose par purification et inoculation du parasite (Miahle *et al.*, 1988) et d'utiliser ces possibilités de reproduction artificielle de la maladie pour sélectionner des animaux résistants. A partir des populations ainsi créées, le programme est devenu un programme d'amélioration génétique *per se* au début des années 1990 (Martin *et al.*, 1993) et a été poursuivi par l'équipe de Génétique de la station de La Tremblade, où la présente thèse a été réalisée.

Le programme de sélection, tel qu'il est dessiné actuellement, vise d'abord à sélectionner des animaux résistants mais s'attache aussi à améliorer les performances de croissance. En effet, les conséquences économiques de la bonamiose peuvent être surmontées de deux manières : en augmentant la survie au cours du troisième été, ce qui permettrait d'obtenir un an supplémentaire de croissance, ou en obtenant des huîtres d'une taille commerciale plus intéressante (plus de 50g) dès la fin de la deuxième année.

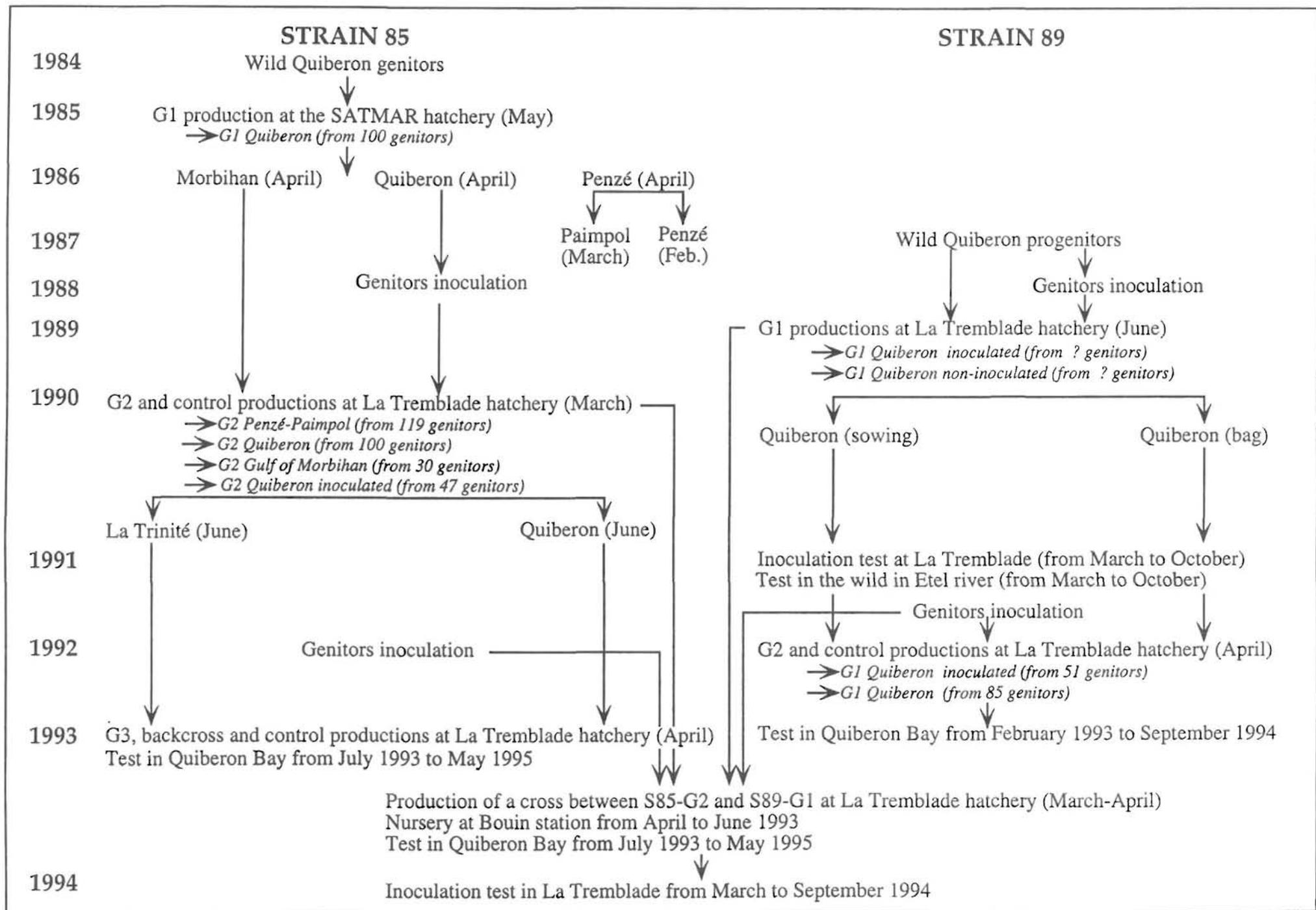


Figure I-7 : Historique des populations sélectionnées jusqu'en 1994 (D'après Naciri-Graven *et al.*, 1997).

L'historique des premières générations de sélection est rapporté par Naciri-Graven *et al.* (1997). Il est également schématisé dans la Figure I-7 et sera détaillé dans le chapitre III, car une partie importante du matériel biologique utilisé dans ce travail en est issu. Nous résumerons simplement ici les premiers résultats. Deux populations ont été sélectionnées, l'une depuis 1985 (P85) et l'autre depuis 1989 (P89). Après respectivement 2 et 1 génération(s) de sélection, la survie des populations sélectionnées est significativement meilleure que celle d'animaux témoins issus de captage naturel en zone infestée. Il y a donc une évidence pour une résistance vraisemblablement fortement additive chez *Ostrea edulis*, renforcée par l'observation de performances intermédiaires d'un croisement entre la deuxième génération de P85 et un témoin. Cependant, les premières générations ont été produites par ponte en masse c'est à dire sans contrôle des appariements et surtout sans connaissance du nombre de géniteurs impliqués. Pour des raisons liées à l'histoire du laboratoire, beaucoup de renseignements sur les premières années du programme ont été perdus, notamment des renseignements sur le nombre de pontes et le nombre de larves recueillies, qui pourraient donner des indications sur le nombre de géniteurs fondateurs. On soupçonne l'existence de goulots d'étranglement, qui pourraient conduire à de la consanguinité, bien que les performances des populations sélectionnées ne soutiennent pas vraiment cette hypothèse (Baud *et al.*, 1997).

En parallèle aux progrès du programme de sélection, l'équipe de Pathologie du laboratoire a poursuivi ses travaux sur *Bonamia ostreae*, notamment dans l'étude de ses interactions avec son hôte. Cochenec (1997) s'est particulièrement attaché à la caractérisation enzymatique, antigénique et moléculaire du parasite, et a étudié ses interactions avec les cellules hématocytaires d'*Ostrea edulis*. En étudiant la formule hématocytaire (nombre et répartition des différents types d'hématocytes) sur des animaux issus des populations sélectionnées et sur des animaux témoins issus de zone bonamiosée, Cochenec a observé que non seulement les animaux sélectionnés (considérés résistants) comptaient un nombre d'hématocytes total plus faible que les populations témoins (considérés sensibles), mais que, de plus, les trois différents types hématocytaires n'étaient pas en même proportions dans les populations sélectionnées et sensibles. En effet, un type hématocytaire (cellules agranuleuses) est beaucoup moins abondant chez les animaux sélectionnés; or, il se trouve que ce type cellulaire est celui qui est préférentiellement infesté par *Bonamia ostreae*. De plus, dans une population sensible, le pourcentage de ces cellules agranuleuses diminue après inoculation. Ces résultats, bien que devant être confirmés, sont encourageants car ils apportent une première base à la compréhension des mécanismes de résistance d'*Ostrea edulis* à la bonamiose. En effet, chez les

animaux résistants, les cellules-hôtes du parasite sont en nombre réduit. Il n'est pas encore clairement établi si la réduction du nombre de cellules agranuleuses est une cause, ou une conséquence, de la résistance, bien que la dernière hypothèse soit soutenue par les expériences d'inoculation. Il semble donc que, plutôt que des animaux résistants, on ait sélectionné des animaux tolérants au parasite. Cette tolérance pourrait correspondre à un décalage de l'infection, lié à une moindre probabilité pour le parasite de rencontrer sa cellule-hôte et de s'y multiplier, entraînant à terme la mort de l'animal. Ces résultats pourraient contribuer à la mise au point d'un test précoce de la résistance à la bonamiose, puisque les populations sensibles ou résistantes ont une formule hémodique caractéristique. Cependant, pour l'instant, les techniques d'obtention des formules hémodiques nécessitent le sacrifice de l'animal pour prélever l'hémolymphe au niveau de la cavité péricardique.

4. Problèmes pathologiques récents en éclosion

Depuis quelques années, un important problème pathologique est apparu dans de nombreuses éclosions expérimentales et industrielles sous la forme d'importantes mortalités estivales associées à la présence d'un virus de type herpes. L'existence chez les mollusques bivalves de virus apparentés aux *Herpesviridae* était déjà connue depuis une vingtaine d'années.

En effet, au cours d'une étude concernant les effets de la température sur la croissance de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*, Farley *et al.* (1972) ont noté l'incidence de mortalités plus importantes sur les lots maintenus en élevage à 28-30°C (52%) comparativement aux lots placés à 12-18°C (18%). L'examen histologique des huîtres placées à forte température a révélé la présence d'inclusions Feulgen positives, dans le noyau des hémocytes. Une étude plus approfondie en microscopie électronique a permis de mettre en évidence, dans les inclusions nucléaires, des particules virales de forme hexagonale, de 70 à 90 nm de diamètre, ainsi que des particules virales enveloppées dans le cytoplasme des cellules infectées. Les caractéristiques structurales et la localisation des particules virales ont permis d'apparenter ce virus à la famille des *Herpesviridae*.

En étudiant des échantillons prélevés à différentes périodes de l'année, Farley *et al.* (1972) ont montré que l'infection virale se développe préférentiellement à des températures élevées. Ils en concluent que le virus se trouve à l'état latent ou endémique à température peu élevée, et qu'une augmentation de celle-ci semble favoriser la propagation de la maladie, éventuellement en faisant passer le virus d'une phase latente à une phase d'expression clinique.

Des mortalités massives, associées à la détection d'un virus apparenté aux *Herpesviridae*, ont été récemment décrites en France sur des larves d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, (Nicolas *et al.*, 1992) et d'huître plate, *Ostrea edulis*, (T.Renault et N.Cochennec, comm.pers.) élevées en éclosérie. Un virus similaire a également été décrit sur des larves d'huître creuse, *C. gigas*, en éclosérie, en Australie (Hine *et al.*, 1992). A l'heure actuelle, ces infections virales n'ont pas été observées chez des individus adultes de ces espèces. Toutefois, chez les juvéniles de moins d'un an, des virus apparentés aux *Herpesviridae* ont été observés en association avec des mortalités importantes sur des lots particuliers d'*O. edulis* (Comps & Cochennec, 1993) et de *C. gigas* (Renault *et al.*, 1994a).

Une étude comparative de l'ensemble des virus apparentés aux *Herpesviridae* décrits chez les mollusques bivalves a été réalisée (Renault *et al.*, 1994b). Une caractéristique commune à tous ces virus peut ainsi être relevée. En effet, lors de la première description de ce type de virus, chez l'huître américaine *C. virginica*, les animaux originaires d'un milieu à 12-18°C avaient été placés dans une eau chauffée à 28-30°C (Farley *et al.*, 1972). Les observations ultérieures de mortalités de larves et de naissains de *C. gigas* et d'*O. edulis*, en association avec des virus de type herpès ont, elles, été réalisées pendant des périodes chaudes de l'année (Nicolas *et al.*, 1992; Hine *et al.* 1992; Comps & Cochennec, 1993; Renault *et al.*, 1994a). Ces observations suggèrent que des températures plus élevées sont un facteur favorable au développement de l'infection virale. En effet, la température peut influencer la durée du cycle viral productif, mais elle peut également intervenir dans l'activation d'un virus présent chez les animaux sous une forme latente.

Cette infection pose un grave problème du fait de l'impossibilité de distinguer les animaux infectés de ceux communément appelés "porteurs sains". Des mesures prophylactiques ont été prises dès 1994 pour tenter de limiter l'apparition et la propagation des mortalités, à défaut d'éradiquer le virus. Cependant, cette menace de mortalité subite (jusqu'à 100% en quelques jours sur les larves) a pesé tout au long de cette étude et a parfois contrarié certains aspects du travail prévu.

Les points importants à retenir de ce chapitre :

- Quasi-disparition de l'huître plate des côtes de France (et même d'Europe) suite à l'apparition de *Bonamia ostreae*, conduisant à une situation de monoculture dans l'ostréiculture française alors qu'il y a une forte demande économique sur cette espèce.
- Pas de solution sanitaire ou zootechnique à court terme → Sélection d'animaux résistants (solution à moyen, voire long terme).
- Deux populations sélectionnées (P85 et P89), production des premières générations sans contrôle des croisements.
- Preuves fortes de l'existence d'une résistance additive chez *Ostrea edulis*, additivité soutenue par les résultats encourageants des premières générations de sélection et par les performances intermédiaires d'un croisement entre P85-G2 et une population témoin.
- Existence soupçonnée de goulots d'étranglement pouvant conduire à l'existence de consanguinité dans les populations sélectionnées.
- Des menaces pathologiques fortes pèsent sur la production d'*O. edulis* en écloserie du fait d'un *Herpesvirus*.

C. ETUDES GENETIQUES

Deux axes de recherches ont été privilégiés touchant aux domaines de la génétique quantitative et de la génétique des populations d'*Ostrea edulis*. Il s'agit en premier lieu d'un ensemble d'études visant à sélectionner des animaux sur des critères de croissance et à estimer des paramètres génétiques liés à la croissance chez cette espèce. L'autre série d'études porte sur l'estimation de la variabilité génétique et de la structuration génétique des populations naturelles d'*Ostrea edulis*.

1. Sélection pour la croissance

Dans l'une des seules expériences d'amélioration génétique de la croissance chez *Ostrea edulis*, Newkirk & Haley (1982; 1983) rapportent les résultats de deux cycles de sélection. La population d'origine était une population maintenue depuis plusieurs générations en écloserie au Canada suite à une importation depuis les Pays-Bas. Cinq lignées ont été créées par ponte en masse de 10 individus choisis parmi les 50 plus gros d'un échantillon de 470 individus de 2

ans. La première génération montrait une bonne corrélation ($r=0.67$; $P<0.05$) entre l'intensité de sélection des parents (de 0 pour la lignée témoin non sélectionnée à 1,85 pour la lignée la plus sélectionnée) et la réponse de la descendance, mesurée par la différence entre la moyenne de cette descendance et celle de la population totale (Newkirk & Haley, 1982). Les lignées sélectionnées étaient toutes entre 8 et 38% plus grosses que la lignée témoin, avec une moyenne de 23%. Ce résultat, très variable d'une lignée à l'autre, posait néanmoins le problème de l'importance des effets environnementaux. Une deuxième génération a été créée à partir d'animaux de 2 ans, choisis parmi les 5% les plus gros. La réponse à la sélection pour cette génération a été plus faible que pour la première génération (Newkirk & Haley, 1983). Cette baisse de performance a été surtout attribuée à une possible consanguinité dans les familles. En effet, les animaux sélectionnés étaient issus d'une population maintenue en éclosérie depuis une dizaine d'années, et issue elle-même d'une ponte en masse dont les larves n'ont été recueillies que sur 2 jours. En conséquence, il est possible que la population initiale ne descende que de 2 femelles dans le pire des cas, et en tous cas vraisemblablement d'un nombre très faible de parents fondateurs. Cette expérience n'a de ce fait apparemment pas été prolongée.

Une deuxième expérience de sélection individuelle sur des descendance de familles de plein-frères a été menée par Toro & Newkirk (1990), pour estimer la réponse à la sélection et les paramètres génétiques de la croissance chez *Ostrea edulis*. Des animaux issus de 40 familles ont été sélectionnés en fonction de leur poids après la première saison de croissance. Les auteurs ont appliqué une sélection divergente et recroisé entre eux les animaux les plus gros ("High") et les animaux les plus petits ("Low"), créant ainsi 24 familles de l'un ou l'autre type. Plus de 6500 animaux ont été individuellement suivis pour la taille et le poids pendant deux saisons. Les descendance des 2 groupes ("High" et "Low") ont montré des différences significatives ($p<0,05$) pour les deux caractères pendant les deux saisons, mais pas de différences de survie. Cette étude donne les premières estimations d'héritabilité pour la taille de la coquille et le poids final chez l'huître plate, avec des h^2 estimées entre 0,112 et 0,243. Les deux caractères étudiés se sont révélés être fortement corrélés ($r>0,96$).

En conclusion, on retiendra :

- La sélection pour la croissance semble possible chez cette espèce
- mais ces possibilités ont pour l'instant été peu exploitées.
- Les variations environnementales importantes rendent difficiles de tels programmes de sélection, comme le confirment les faibles valeurs estimés d'héritabilité.
- Pour réaliser une sélection efficace sur des caractères de croissance, il sera nécessaire au préalable de mettre au point des protocoles précis, afin de contrôler les variations environnementales.

2. Variabilité génétique et structuration des populations

Le polymorphisme aux locus enzymatiques a été très utilisé pour analyser la différenciation génétique des populations de bivalves marins. Les études montrent souvent des niveaux de différenciation faibles ou tout du moins modérés, du fait de l'existence d'un panel d'allèles commun apparaissant dans de nombreuses populations couvrant de larges zones géographiques. Ceci a été expliqué par la combinaison de deux phénomènes : grandes tailles de populations et flux génique élevé (Koehn *et al.*, 1976; Buroker *et al.*, 1979; Buroker, 1983; Skibinski *et al.*, 1983; Hedgecock & Okazaki, 1984; Macaranas *et al.*, 1992; Borsa *et al.*, 1994). Cependant, de récentes comparaisons entre polymorphisme enzymatique et polymorphisme de marqueurs neutres remettent en cause la neutralité des gènes enzymatiques et posent l'hypothèse que la sélection naturelle serait la cause de l'uniformité observée aux locus enzymatiques (Karl & Avise, 1992; Pogson *et al.*, 1995). Nous verrons cependant que les conclusions tirées de ces études doivent être envisagées avec précaution (voir Chapitre VI).

Toutes les études de la variabilité génétique au sein et entre les populations naturelles d'*Ostrea edulis* sont basées sur l'analyse du polymorphisme enzymatique. Les premières études ont porté sur un nombre réduit de locus et/ou de populations. Elles ne couvrent qu'une partie de l'aire de répartition, en général la côte Atlantique, et montrent une grande uniformité génétique (Wilkins & Mathers, 1973 ; Buroker, 1982 ; Magennis *et al.*, 1983 ; Le Pennec *et al.*, 1985 ; Blanc *et al.*, 1986 ; Jaziri *et al.*, 1987 ; Saavedra *et al.*, 1987 ; Johannesson *et al.*, 1989).

On peut conclure de ces études qu'*Ostrea edulis* est une espèce à faible variabilité génétique, aussi bien intra qu'inter-populations. Ainsi, Saavedra *et al.* (1987) montrent que des populations d'Angleterre, d'Irlande et des Etats-Unis (cette dernière importée depuis les Pays-

Bas) sont très similaires avec une identité $I=0,99$ (estimation non biaisée de Nei) pour 10 locus en commun. Les flux de gènes relativement restreints devraient cependant entraîner des variations interpopulations plus importantes qu'il n'est observé. La génétique des populations d'*Ostrea edulis* est fortement affectée par les activités humaines, présentes et passées, et il n'est pas toujours facile de savoir dans quelle mesure les traits d'histoire de vie ont influencé la structuration des populations de cette espèce. La surexploitation et les épidémies ont détruit d'importantes populations naturelles sur toutes les côtes Atlantiques (Héral, 1986). De nombreuses transplantations d'animaux ont eu lieu à travers l'Europe afin de repeupler les stocks appauvris (Yonge, 1960; Alderman, 1979; Magennis *et al.*, 1983; Van Banning, 1991) et le mélange de populations d'origines géographiques diverses peut avoir réduit le niveau de différenciation génétique original.

Contrairement aux gisements atlantiques, les populations méditerranéennes n'ont pas souffert d'épizooties, et bien que certaines introductions de populations atlantiques soient mentionnées (Magennis *et al.*, 1983, Jaziri *et al.*, 1987), il ne semble pas y avoir eu en Méditerranée de surexploitation des stocks et de mélanges subséquents de populations d'origines différentes. Les études de variabilité génétique portant sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce montrent une faible différenciation entre les populations atlantiques (Jaziri *et al.*, 1987, Jaziri, 1990, Saavedra *et al.*, 1993).

Saavedra *et al.* (1987, 1993, 1995) ont réalisé l'étude la plus complète sur cette espèce en analysant 19 populations couvrant l'ensemble de l'aire de répartition naturelle d'*Ostrea edulis* (depuis la Norvège jusqu'à la Turquie). Cette étude montre que les populations méditerranéennes ne sont pas plus variables que les populations atlantiques. L'hétérozygotie moyenne sur 22 locus enzymatiques est de $0,094 \pm 0,005$, l'hétérozygotie étant la plus forte dans les populations de l'ouest de la Méditerranée et la plus faible pour les populations de Méditerranée orientale (Turquie, Grèce). Ils ont étudié les variations des fréquences alléliques de 13 locus polymorphes en fonction de la distance géographique. Cette corrélation s'est révélée être significative pour 10 des 13 locus. Dans 8 cas (*AP-2*, *ARK*, *ME-1*, *PGM*, *EST-4*, *MDH-2*, *6PGDH* et *PGI*), il s'agissait de clines monotones (remplacement progressif d'un allèle "atlantique" par un allèle "méditerranéen" ou baisse progressive de la fréquence de l'allèle le plus commun). Les 5 autres locus (*ALDH*, *EST-3*, *EST-5* et dans une moindre mesure *IDH-2* et *MDH-1*) présentent des patrons de distribution des fréquences alléliques en "V", avec des clines d'une part (ou de part et d'autres) du détroit de Gibraltar. La diversité génétique moyenne pour ces 13 locus polymorphes est de $0,176 \pm 0,042$ et elle est la plus faible dans les

populations du Nord de l'Atlantique et du Sud de la Méditerranée. Les distances génétiques entre populations permettent de distinguer 3 groupes géographiques : Atlantique Nord, Atlantique Sud + Méditerranée Ouest, Méditerranée Est. Du fait de l'apparition de clines parallèles à de nombreux locus, les auteurs privilégient l'hypothèse de clines formés après un contact secondaire de populations préalablement isolées et différenciées, plutôt que l'hypothèse de clines résultant de réponse sélective des allozymes à des variations de paramètres environnementaux. Plus précisément, comme le point médian des clines se situe au niveau du Déroit de Gibraltar, ils suggèrent un contact secondaire entre un stock atlantique et un stock méditerranéen qui se seraient différenciés au cours des variations de climat et de niveau de la mer pendant les glaciations du Quaternaire. L'équilibre des tailles efficaces et du flux génique ne serait pas encore atteint.

De ces études génétiques, on peut retenir les points suivants :

- Toutes les études publiées sur la variabilité génétique des populations d'*Ostrea edulis* utilisent l'outil enzymatique.
- Les populations d'*Ostrea edulis* montrent des niveaux de variabilité aux locus enzymatiques très faibles (He dépasse rarement 10% sur des locus pris au hasard).
- Les populations atlantiques montrent un niveau de différenciation faible.
- La répartition actuelle des populations d'*Ostrea edulis* pourrait résulter d'un contact secondaire au niveau du déroit de Gibraltar entre deux stocks (atlantique et méditerranéen) ayant évolués séparément pendant les glaciations du Quaternaire.

II. L'OUTIL GENETIQUE : LES MARQUEURS MICROSATELLITES

A. QU'EST CE QU'UN MICROSATELLITE?

L'existence de séquences d'ADN répété chez les eucaryotes a été mis en évidence depuis près de 30 ans (Britten & Kohne, 1968). Cet ADN répété peut être classé en 2 catégories: l'ADN satellite, composé d'un grand nombre de séquences répétées, qui peut être isolé du reste de l'ADN par des centrifugations sur gradient de chlorure de césium, et l'ADN répété dispersé, nommé aussi VNTR (pour "Variable Number of Tandem Repeats" ou "nombre variable de répétitions en tandem") (Nakamura *et al.*, 1987). Ces dernières séquences ont été appelées mini et microsatellites par simple analogie avec l'ADN satellite.

Les minisatellites sont des séquences répétées dont le motif de base est de grande taille (de une à quelques dizaines de paire de bases (pb)) pour une longueur totale de 0.1 à 7 kb (Jeffreys *et al.*, 1985). Les minisatellites semblent fréquemment localisés près des régions télomériques et centromériques.

Les microsatellites sont des régions de l'ADN constituées de répétition en tandem de petite taille (entre 1 et 5 pb), pour une taille totale en général inférieure à 200 pb (Rassman *et al.*, 1991). Ils sont répartis aléatoirement le long du génome (Hearne *et al.*, 1992) mais sont sous-représentés dans les régions télomériques et centromériques des chromosomes (Wong *et al.*, 1990; Winterø *et al.*, 1992).

Ces locus montrent un important polymorphisme dû à la variation du nombre de répétitions du motif de base (Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989). Les séquences répétées sont en général encadrées par des séquences uniques elles-mêmes peu variables appelées séquences flanquantes (voir Figure II-1) La définition d'amorces dans ces régions flanquantes permet d'amplifier spécifiquement une séquence microsatellite par PCR (polymerase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne, Saiki *et al.*, 1988). La taille relativement faible des fragments amplifiés permet une bonne séparation des fragments sur un gel de polyacrylamide et une détermination précise de chaque allèle.

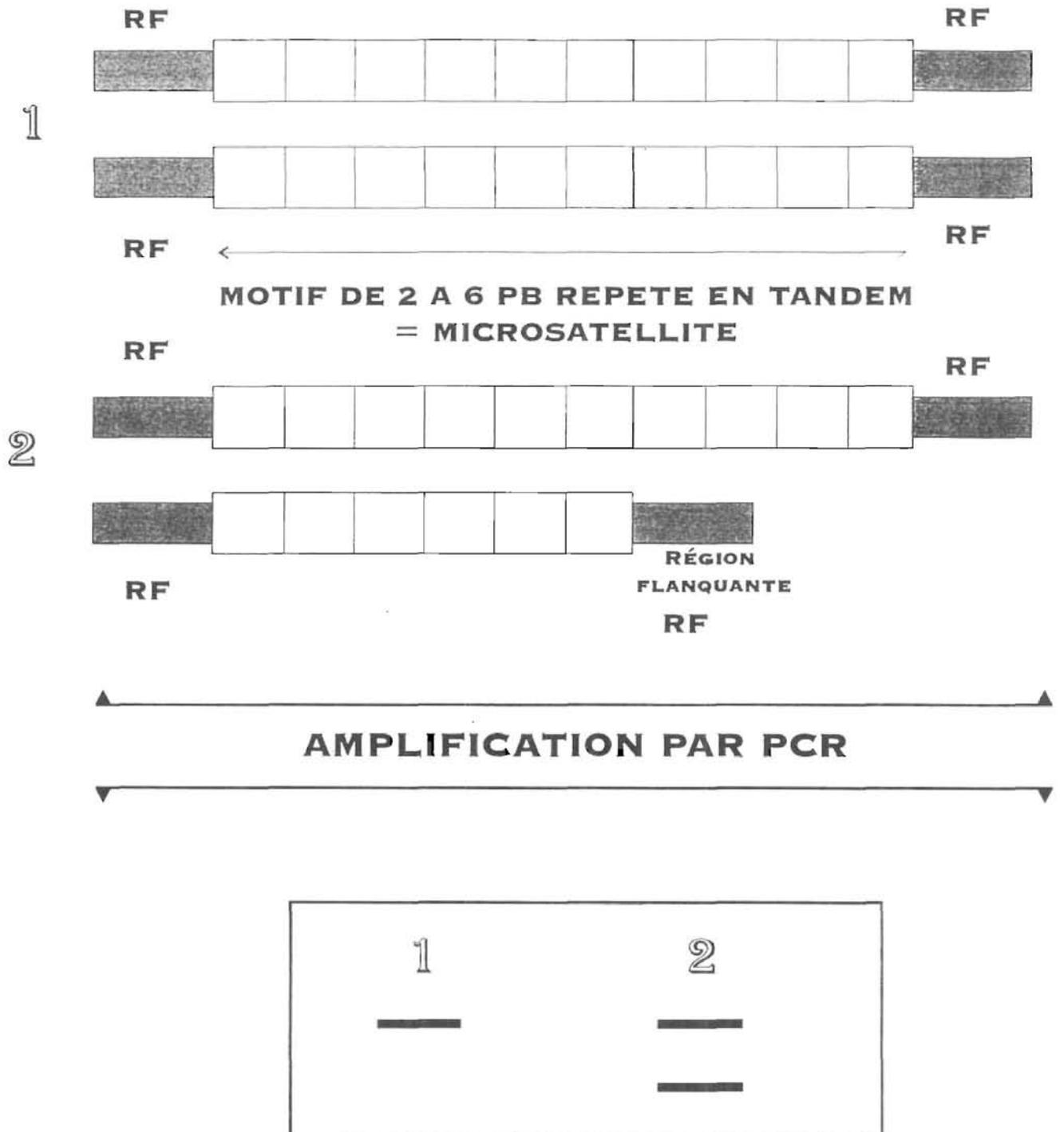


Figure II-1 : Description schématique d'une séquence microsatellite
RF = région flanquante

Les microsatellites ont d'abord été trouvés chez l'homme, où ils se sont révélés être abondants et dispersés dans tout le génome (Hamada & Kakunaga, 1982; Hamada *et al.*, 1982; Weber & May, 1989; Weber, 1990; Hearne *et al.*, 1992; Barendse *et al.*, 1994, Perez-Lezaun *et al.*, 1997). Depuis, des microsatellites ont été identifiés chez un très grand nombre d'organismes eucaryotes, aussi bien chez les animaux que chez les plantes (voir Tableau II-1). De plus, Field & Wills (1996) ont détecté, par interrogation de base de données, des séquences du type microsatellite de grande taille (essentiellement di et trinuécléotides), dans des organismes "simples" : levures, champignons, protistes, procaryotes, virus... Chez les procaryotes, Moxon *et al.* (1994) ont souligné l'importante contribution des microsatellites au succès évolutif des organismes.

Le but de ce catalogue, qui ne se veut pas exhaustif (loin s'en faut) mais qui aspire à être le plus complet possible, est de souligner le très faible nombre d'études rapportant des recherches de marqueurs microsatellites chez les mollusques et en particulier chez les mollusques bivalves. En effet, à notre connaissance les seules recherches publiées de marqueurs microsatellites chez les mollusques sont celle de Jarne *et al.*(1993) sur le bulin (*Bulinus truncatus*, mollusque gastéropode d'eau douce) et celle émanant de notre laboratoire sur *Ostrea edulis* (Naciri *et al.*, 1995). Chez les bivalves, les microsatellites qui ont pu être publiés semblent résulter plus du hasard que d'une recherche systématique de ce type de locus. Ainsi, deux microsatellites polymorphes ont été trouvés dans un intron du gène de l' α -globine chez *Anadara trapezia* (Nassif & Mackinlay, 1996). Enfin, des travaux de caractérisation de locus microsatellites sont en cours chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (McGoldrick & Hedgecock, 1996a), avec l'identification de 30 locus microsatellites pendant le travail de thèse de D. McGoldrick (1997); enfin, pour cette espèce, trois séquences contenant des motifs microsatellites ont été déposées sur les banques de données sur Internet (Genbank) par l'équipe de E. Zouros et A.Magoulas (IMBC, Crète).

Tableau II-1 : Principales espèces chez qui ont été caractérisés des marqueurs microsatellites
(entre crochets : le nombre de locus caractérisés)

Vertébrés
Mammifères
Souris (<i>Mus musculus</i>) Love <i>et al.</i> , 1990
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>) Jacobs <i>et al.</i> , 1995
Bœuf (<i>Bos taurus</i>) Fries <i>et al.</i> , 1990; Hirano <i>et al.</i> 1996 [42]
Porc (<i>Sus scrofa</i>) Wintero <i>et al.</i> , 1992; Moran, 1993 [23]; Alexander <i>et al.</i> , 1996 [414]
Mouton (<i>Ovis</i>) Buchanan <i>et al.</i> , 1993, Lumdsen <i>et al.</i> , 1996
Chien (<i>Canis lupus</i>) Rothuizen <i>et al.</i> , 1994; Fredholm & Winterø, 1995 [20]; Ostrander <i>et al.</i> , 1995 [101]
Cheval (<i>Equus caballus</i>) Vega-Pla <i>et al.</i> , 1996; Breen <i>et al.</i> , 1997
Grizzly (<i>Ursus arktos</i>) Paetkau & Strobeck, 1994 [8]
Cerf (<i>Cervus elaphus</i>) DeWoody <i>et al.</i> , 1995 [7]
Koala (<i>Phascolarctos cinereus</i>) Houlden <i>et al.</i> , 1996 [6]
Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Van Lith & Van Zutphen, 1996
Hérisson (<i>Erinaceus europaeus</i>) Becher & Griffiths, 1997 [6]
Musaraigne (<i>Crocidura russula</i>) Favre & Balloux, 1997
Musaraigne commune (<i>Sorex araneus</i>) Wyttenbach <i>et al.</i> , 1997
Oiseaux
Poulet (<i>Gallus domesticus</i>) Moran, 1993; Crooijmans <i>et al.</i> , 1994
Eider à lunettes (<i>Somateria fischeri</i>) Fields & Scribner, 1997 [7]
Oie à front blanc (<i>Anser albifrons</i>) Fields & Scribner, 1997 [2]
Lagopède des saules (<i>Lagopus lagopus scoticus</i>) Piertney & Dallas, 1997
Reptiles
Tortues marines (<i>Chelonia midas</i> , <i>Caretta caretta</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i>) FitzSimmons <i>et al.</i> , 1995
Alligator (<i>Alligator mississippiensis</i>) Glenn <i>et al.</i> , 1996
Lézard (<i>Tiliqua rugosa</i>) Cooper <i>et al.</i> , 1997
Poissons
Daurade (<i>Sparus aurata</i>) Batargias & Zouros, 1993 [3]
Bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) García de León <i>et al.</i> , 1995
Truite commune (<i>Salmo trutta</i>) Estoup <i>et al.</i> , 1993a
Saumon atlantique (<i>Salmo salar</i>) Slettan <i>et al.</i> , 1993; O'Reilly <i>et al.</i> , 1996 [4]
Saumon sockeye (<i>Oncorhynchus nerka</i>) Scribner <i>et al.</i> , 1996
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Morris <i>et al.</i> , 1996
Barbaud (<i>Barbus</i> sp.) Chenuil <i>et al.</i> , 1997
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) Lee & Kocher, 1996 [140]
Crapet arlequin (<i>Lepomis macrochirus</i>) Colbourne <i>et al.</i> , 1996 [17]
Esquille (<i>Syngnathus scovelli</i>) Jones & Avise, 1997 [4]

Tableau II-1 (suite)

Invertébrés	
Insectes	
Drosophile (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Pardue <i>et al.</i> , 1990
Abeille (<i>Apis mellifera</i>)	Estoup <i>et al.</i> , 1993b
Bourdon (<i>Bombus terrestris</i>)	Estoup <i>et al.</i> , 1993b
Guêpes (<i>Polistes</i> sp.)	Strassman <i>et al.</i> , 1997
Guêpes (<i>Vespula rufa</i>)	Thorèn <i>et al.</i> , 1995
(<i>Phylloscopus occipitalis</i>)	Bensch <i>et al.</i> , 1997 [7]
Anophèle (<i>Anopheles gambiae</i>)	Zheng, 1997
Mollusques	
Bulin (<i>Bulinus truncatus</i>)	Jarne <i>et al.</i> , 1993
Huitre plate (<i>Ostrea edulis</i>)	Naciri <i>et al.</i> , 1995
Crustacés	
Crevette (<i>Penaeus vannamei</i>)	Bagshaw & Buckholt, 1997 [1]; Garcia <i>et al.</i> , 1996 [2]
Homard (<i>Homarus americanus</i>)	Tam & Kornfield, 1995 [3]
Plantes	
Riz (<i>Oryza sativa</i>)	Akagi <i>et al.</i> , 1996 [35]; Wu & Tanskley, 1993; Panaud <i>et al.</i> , 1995, 1996
Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	Liu <i>et al.</i> , 1996 [45]
Blé (<i>Triticum aestivum</i>)	Ma <i>et al.</i> , 1996
Maïs (<i>Zea mays</i>)	Taramino & Tingey, 1996
Sorgho (<i>Sorghum bicolor</i>)	Brown <i>et al.</i> , 1996
Soja (<i>Glycine max</i>)	Akkaya <i>et al.</i> , 1992
Betterave (<i>Beta vulgaris</i>)	Mörchen <i>et al.</i> , 1996 [4]
Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	Kawchuk <i>et al.</i> , 1996 [3]
Vigne (<i>Vitis vinifera</i>)	Bowers <i>et al.</i> , 1996 [4]
Melon d'eau (<i>Citrullus lanatus</i>)	Jarret <i>et al.</i> , 1997
Kiwi (<i>Actinidia chinensis</i>)	Weising <i>et al.</i> , 1996
Pin sylvestre (<i>Pinus sylvestris</i>)	Kostia <i>et al.</i> , 1995 [8]
Eucalyptus (<i>Eucalyptus</i> sp.)	Byrne <i>et al.</i> , 1996 [4]
Epicea (<i>Picea abies</i>)	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1997

B. CARACTERISTIQUES DES MICROSATELLITES

1. Fonction biologique

Les fonctions biologiques des microsatellites, si elles existent, restent inconnues. Les microsatellites sont considérés comme une source cryptique de variabilité génétique, point chaud de recombinaison, ou semblent impliqués dans la structure de la chromatine (Schlötterer & Tautz, 1992). Stallings *et al.* (1991) suggèrent que les microsatellites jouent un rôle dans la régulation génique ou comme "point chaud" de recombinaison, sans toutefois identifier de fonctions certaines pour ces séquences. Certains motifs microsatellites se trouvent localisés à l'origine de réplication et semblent avoir une fonction dans la réplication de l'ADN. C'est le cas par exemple de la longue chaîne poly(C) trouvée dans le génome mitochondrial de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Cantatore *et al.*, 1987), d'une répétition (ATT)_n trouvée dans le génome mitochondrial des paramécies (Pritchard *et al.*, 1983) et d'une répétition (CTT)_n trouvé dans le plasmide nucléaire de *Dictyostelium discoideum* (Farrar *et al.*, 1994).

Un nombre important de microsatellites à motif trinuécléotides a été associé chez l'homme à des maladies génétiques, notamment le syndrome du X fragile (Fu *et al.*, 1991, Yu *et al.*, 1991), la dystrophie musculaire myotonique (maladie de Duchêne) (Brook *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 1992,), l'ataxie cérébro-spinale (Zoghbi *et al.*, 1993), ou encore certains cancers (Rhyu *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 1996). Les répétitions de trinuécléotides qui accompagnent ces maladies génétiques pourraient ainsi être des "séquences de régulation à fort taux de mutation" (King, 1994).

2. Mutation

Les microsatellites se caractérisent par de forts taux de mutation, qui provoquent l'apparition de nouveaux allèles. Les mécanismes mutationnels sont probablement liés à des *crossing-overs* inégaux (Brook *et al.*, 1992), ou à des phénomènes de glissement de la polymérase pendant la réplication, suivis de l'absence de réparation ("Slipped Strand Mismatching" ou SSM: Levinson & Gutman, 1987; Strand *et al.*, 1994). Ces mécanismes restent cependant mal connus. Des expériences *in vitro* suggèrent fortement que le glissement pendant la réplication est le principal mécanisme de mutation des microsatellites (Schlötterer & Tautz, 1992). Les taux de mutations chez les microsatellites sont environ de 10^{-2} - 10^{-4} (Weissenbach *et al.*, 1992, Dallas, 1992).

Le modèle de mutation des microsatellites reste discuté. Au modèle classique en nombre infini d'allèles (IAM; Kimura & Crow, 1964), généralement utilisé dans de nombreuses études de génétique des populations, est souvent opposé un modèle de type pas-à-pas ("stepwise mutation model" ou SMM; Valdès *et al.*, 1993) ou un modèle à deux phases ("two-phase model" ou TPM; Di Rienzo *et al.*, 1994). Sous le modèle SMM, chaque mutation fait apparaître un nouvel allèle par addition ou suppression d'un motif de base. Sous le modèle TPM, une proportion p de mutation suit le modèle SMM tandis qu'une proportion $1-p$ conduit à une addition ou une suppression de plusieurs motifs. Certaines études, en particulier des études de la distribution des fréquences alléliques de plusieurs locus dans des populations humaines (Di Rienzo *et al.*, 1994) semblent en faveur d'un modèle type TPM. Par contre, d'autres études ne permettent pas de rejeter le modèle IAM (Estoup *et al.*, 1995a). Contrairement au modèle IAM, qui suppose que chaque mutation fait apparaître un nouvel allèle, absent au préalable de la population, les modèles SMM ou TPM génèrent de l'homoplasie, deux allèles pouvant être identiques par état sans être identiques par descendance. La présence d'homoplasie a pu être montrée chez l'homme et le chimpanzé (Garza & Freimer, 1996), ainsi que chez des sous-espèces éloignées de bourdon et d'abeille (Estoup *et al.*, 1995b).

3. Conservation des locus entre espèces

Les microsatellites sont avantageux parce qu'ils sont très variables et codominants, et qu'ils peuvent être étudiés facilement en routine par PCR (polymerase chain reaction). En revanche, le développement de ce type de marqueurs est une étape assez longue et délicate (voir Chapitre III). Les séquences microsatellites isolées sur une espèce peuvent parfois servir à détecter des microsatellites sur d'autres espèces proches. Chez les mammifères, il y a une très grande conservation de ces locus à travers des genres entiers, notamment chez les primates (Blanquer-Maumont & Crouau-Roy, 1995; Crouau-Roy *et al.*, 1996; Coote & Bruford, 1996). Entre les bovins et les ovins, environ 60% des amorces peuvent être transférées d'un groupe à l'autre (Moore *et al.*, 1991; Forbes *et al.*, 1995) contre seulement 15% entre le rat et la souris (Kondo *et al.*, 1993). Quatorze paires d'amorces de bovin sur 27 testées ont permis l'amplification de fragments polymorphes chez le cerf (Kühn *et al.*, 1996). Des exemples d'utilisation croisée d'amorces sont mentionnées également entre les bovins et les caprins (Pépin *et al.*, 1995; Engel *et al.*, 1996), ainsi qu'entre certaines espèces de félidés (Menotti-Raymond & O'Brien, 1995), de canidés (Fredholm & Winterø, 1995) ou de cétacés (Schlötterer *et al.*, 1991).

Cette conservation des locus microsatellites ne se limite pas aux mammifères. Ainsi, de nombreux exemples d'utilisation croisée des amorces ont été décrits chez des salmonidés, même entre genres différents (Estoup *et al.*, 1993a; Presa & Guyomard, 1996; Morris *et al.*, 1996; Scribner *et al.*, 1996). De même, des séquences conservées ont été décrites chez certains genres d'oiseaux (Hanotte *et al.*, 1994), chez les tortues (FitzSimmons *et al.*, 1995), chez 2 espèces de homard (Tam & Kornfield, 1996). Chez les plantes, des amorces PCR hétérologues ont donné des résultats positifs chez différentes sous-espèces d'orge (Saghai Maroof *et al.*, 1994) et de riz (Wu & Tanksley, 1993), entre deux espèces de soja (Morgante *et al.*, 1994), entre 3 espèces de *Brassica* (Szewc-McFadden *et al.*, 1996). Cinq microsatellites de raisin ont été conservés à travers 7 autres espèces de *Vitis* (Thomas & Scott, 1993). Quatre locus polymorphes sont utilisables dans plusieurs espèces d'eucalyptus (Byrne *et al.*, 1996).

Le succès des tentatives de transfert dépend probablement du temps de divergence entre les taxons étudiés, et du fait que celui-ci, pas toujours connu, peut varier considérablement entre espèces et genres, ce qui peut expliquer certains échecs (Liu *et al.*, 1996a)

Cependant, de tels transferts posent parfois des problèmes, car l'utilisation de marqueurs hétérologues semble augmenter la fréquence des allèles nuls (par mutations dans les régions flanquantes) et semble également révéler un polymorphisme plus faible (Liu *et al.*, 1996a; Menotti-Raymond & O'Brien, 1995).

4. Allèles nuls

L'existence d'allèles "nuls" (non visualisés) aux locus microsatellites a été fréquemment reportée (Koorey *et al.*, 1993; Callen *et al.*, 1993; Pemberton *et al.*, 1995; Paetkau & Strobeck, 1995). Ces allèles nuls peuvent avoir comme origine une mutation dans la séquence homologue à l'amorce, et dans ce cas le choix d'une nouvelle amorce peut permettre de résoudre le problème (Callen *et al.*, 1993). Ils peuvent également résulter d'un artefact au moment de l'amplification : si les deux allèles d'un individu hétérozygote sont de tailles très différentes, l'amplification du plus petit allèle sera favorisée .

La présence d'allèles nuls peut poser problème dans l'identification des génotypes hétérozygotes et donc fausser les estimations de taux d'hétérozygotie dans une population.

Dans le cas d'une mutation dans la séquence des amorces, des individus homozygotes pour l'allèle nul peuvent exister dans une population et ne montreront aucune amplification. Des méthodes existent qui permettent d'estimer la fréquence des allèles nuls en prenant en compte

l'existence de déficits en hétérozygotes ou la fréquence des individus non amplifiés (Voir Chakraborty *et al.*, 1992; Brookfield, 1996).

C. UTILISATION DES MICROSATELLITES

1. Identification d'individus et assignation de parenté

Les empreintes génétiques de "cultivars" et de clones ont été déterminées grâce à des microsatellites chez le soja *Glycine max* (Rongwen *et al.*, 1995), le raisin *Vitis vinifera* (Thomas and Scott, 1993) et la pomme de terre *Solanum tuberosum* (Kawchuk *et al.*, 1996). Il est également possible de discriminer 6 cultivars relativement proches de kiwi (*Actinidia chinensis*) par l'utilisation d'un seul marqueur microsatellite (Weising *et al.*, 1996).

Du fait de leur fort polymorphisme, les microsatellites sont un outil puissant d'assignation de parenté. L'utilisation de locus microsatellites permet donc de résoudre de façon non ambiguë des cas d'exclusion. Fredholm & Winterø (1996) ont étudié 15 portées de chien et ont montré que 6 à 9 locus sont suffisants pour déterminer le père pour 12 portées, et mettre en évidence une double fécondation (2 pères) dans les trois autres; les probabilités de maternité ont été estimées à 99,99% à l'aide de 12 locus. Les microsatellites se sont révélés également un outil très intéressant pour l'exclusion de paternité chez le koala (Houlden *et al.*, 1996). Otsen *et al.* (1995) ont réussi à différencier de manière stricte 61 lignées de laboratoire de rat (*Rattus norvegicus*) à l'aide de 37 marqueurs microsatellites. Chaque lignée peut être caractérisée par un profil unique, ce qui permet non seulement l'identification mais également des études de similitude entre les lignées et la rationalisation du choix de géniteurs pour des croisements par exemple. Chez les bovins, les erreurs d'attribution de paternité (qui peuvent aller jusqu'à 20%, voir Ron *et al.*, 1996) provoquent d'importants retards dans les programmes d'amélioration génétique et des pertes économiques majeures. De plus, l'identification de la parenté par les techniques usuelles (groupes sanguins) est lourde à mettre en oeuvre (les 2 parents doivent être typés). Ron *et al.* (1996) montrent que les microsatellites sont un outil puissant pour déterminer les erreurs d'identification dans des programmes d'amélioration génétique bovine; du fait du polymorphisme des microsatellites, il est possible de se restreindre au typage des pères, ce qui permet d'augmenter le progrès génétique en même temps que le profit économique, qui reste significatif si le coût des analyses est pris en compte.

2. Cartographie

Les microsatellites, éléments répétitifs abondants, multi-alléliques et codominants, répartis uniformément sur le génome de nombreuses espèces sont des marqueurs adéquats pour produire rapidement les cartes de liaison indispensables à l'identification de locus intéressants. Des cartes de liaison, récemment publiées chez le porc (Ellegren *et al.*, 1994; Archibald *et al.*, 1995), le boeuf (Barendse *et al.*, 1994; Bishop *et al.*, 1994) et le mouton (Crawford *et al.*, 1995), ont permis de cartographier des gènes économiquement intéressants (ETL: economic trait loci). Plus récemment, des cartographies moléculaires de haute densité, basées uniquement sur des marqueurs microsatellites, ont été construites chez l'homme et chez le rat (Dib *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 1996). Chez les plantes, des marqueurs microsatellites ont été intégrés dans des études de cartographies géniques chez le soja *Glycine max* (Morgante *et al.*, 1994; Akkaya *et al.*, 1995), l'orge *Hordeum vulgare* (Becker & Heun, 1995; Liu *et al.*, 1996), *Arabidopsis thaliana* (Bell & Ecker, 1994), le maïs *Zea mays* (Senior & Heun, 1993) ou encore le riz *Oryza sativa* (Wu & Tanksley, 1993, Zhao & Kochert, 1993). Les microsatellites ont montré leur utilité dans plusieurs études, comme avec la mise en évidence par exemple de la liaison entre marqueur et gène de résistance à un virus chez le soja (Yu *et al.*, 1994) ou l'identification d'une région chromosomique impliquée dans le rendement chez le riz (Zhang *et al.*, 1994).

3. Structure des populations

Les microsatellites se sont révélés extrêmement utiles pour l'étude de populations animales se caractérisant par un faible niveau de polymorphisme détecté avec d'autres types de marqueurs (Hughes & Queller, 1993; Viard *et al.*, 1996; Paetkau & Strobeck, 1994; Taylor *et al.*, 1994; Tam & Kornfield, 1996).

Les microsatellites ont été beaucoup utilisés pour étudier la structuration génétique des populations humaines (Edwards *et al.*, 1992; Urbanek *et al.*, 1996; Pérez-Lezaun *et al.*, 1997). Le plus grand nombre d'études de structuration des populations utilisant des microsatellites a été publié chez les poissons, notamment les salmonidés : *Salmo salar* (McConnell *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 1996, Tessier *et al.*, 1997), *Salmo trutta* (Presa *et al.*, 1994) *Onchorhynchus mykiss* (Nielsen *et al.*, 1994), et les poissons marins : *Gadus morhua* (Bentzen *et al.*, 1996, Ruzzante *et al.*, 1996), *Dicentrarchus labrax* (Garcia de Leon *et al.*, 1997), *Esox lucius* (Miller & Kapuscinski, 1996). Ce sont également des marqueurs de plus en plus utilisés dans les études de microdifférenciation des populations d'insectes (Lehmann *et al.*, 1997) et notamment

pour estimer les structures génétiques fines des populations d'insectes sociaux (Estoup *et al.*, 1995a; Chapuisat *et al.*, 1997).

Cependant, pour une utilisation en génétique des populations, il est indispensable de tenir compte des caractéristiques présentées plus haut, notamment les taux de mutation élevés et le modèle mutationnel, ainsi que la présence possible d'allèles nuls.

D. POURQUOI LES MICROSATELLITES?

Les principaux marqueurs aujourd'hui utilisés en génétique des populations sont les allozymes, les RFLPs (Restriction Fragments Length Polymorphisms ou Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction), les RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA ou ADN Polymorphe Amplifié au Hasard), et les microsatellites. Nous ne nous intéressons ici qu'à des marqueurs du génome nucléaire. Les marqueurs de l'ADN mitochondrial ont été largement utilisés en génétique des populations (Awise, 1986; Ovenden, 1990) mais l'ADN mitochondrial présente le désavantage d'être à transmission uniparentale (maternelle).

Dans notre cas, le choix du type de marqueur a été réalisé selon plusieurs critères. Ces marqueurs devaient être suffisamment polymorphes pour permettre leur utilisation comme aide au programme de sélection. Ils devaient être codominants pour des études de parenté. Ils devaient, si possible, être neutres vis-à-vis de la sélection naturelle pour les études de génétique des populations. L'analyse de ces marqueurs devait être autant que possible aisée, non destructive, et envisageable dès les stades les plus précoces.

Jusqu'à récemment, les allozymes ont été la principale source de marqueurs polymorphes pour les études de structuration des populations (Pasteur *et al.*, 1989). Ils ont l'avantage d'être codominants mais il existe certaines limitations à leur utilisation. Le niveau de polymorphisme est en général faible, et de plus il existe certaines limitations purement techniques : problème de conservation des échantillons, analyse destructive car de nombreux locus sont étudiés sur des organes vitaux (glande digestive, foie, ...) et problèmes d'interprétation des résultats (locus potentiellement non neutres). Nous reviendrons largement sur ce dernier point dans la suite du travail.

Les marqueurs basés sur l'utilisation de la PCR ont l'avantage de ne pas être exigeants en quantité ni même en qualité de matériel, et permettent donc des analyses non destructives (prélèvement de tissus par biopsie, prise de sang...). On s'intéresse alors à des séquences d'ADN non transcrites, pour lesquels l'hypothèse de neutralité est plus robuste que lorsqu'on

observe directement le produit des gènes comme c'est le cas pour les allozymes. Les RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA ou polymorphisme d'amplification au hasard; Williams *et al.*, 1990) sont relativement faciles à développer car ils ne nécessitent pas de connaissance *a priori* du génome et les marqueurs peuvent être échangés rapidement par simple communication des séquences des amorces. Cependant, ces marqueurs ont l'inconvénient (pour notre travail du moins) d'être dominants car le polymorphisme est du type présence/absence d'une bande particulière. De plus, cette méthode est limitée par la nécessité de comparer des photographies de gels, dont l'interprétation génétique peut être ambiguë ainsi que par la reproductibilité des analyses RAPD qui dépend de façon importante de la qualité de l'ADN ou des conditions de PCR (voir par exemple Staub *et al.*, 1996a).

Les microsatellites s'avèrent alors être d'excellents marqueurs, car ils sont polymorphes comme les RAPDs et codominants comme les allozymes. Cependant, leur mise au point peut se révéler longue et délicate.

En résumé : les microsatellites

- marqueurs codominants, potentiellement neutres et polymorphes,
- analyse non destructive possible à tous les stades de vie,
- abondants et répartis aléatoirement dans le génome,
- identification longue et utilisation en routine aisée,
- taux de mutation élevés et mode de mutation mal connu,
- utilisés pour répondre à de nombreuses questions biologiques.

CONCLUSION : PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

Ce travail, qui s'inscrivait au départ directement dans le programme de sélection, a été élargi dans un triple but :

i) *Caractériser les marqueurs microsatellites chez Ostrea edulis.*

Après une étape d'identification de nouveaux marqueurs, nous étudierons ces marqueurs en termes de polymorphisme, ségrégation et liaisons génétiques, pour évaluer leur potentiel pour la cartographie génique, l'aide à la sélection et la génétique des populations.

ii) *Utiliser ces marqueurs dans le cadre du programme de sélection*

Les microsatellites seront utilisés pour quantifier la variabilité génétique dans les populations sélectionnées en comparaison avec une population naturelle, et pour estimer le nombre de géniteurs potentiels de chaque population. Les performances des populations sélectionnées en terme de croissance seront étudiées, en relation avec la variabilité observée aux marqueurs microsatellites. Enfin, les possibilités de mettre en évidence un marqueur moléculaire d'un caractère de résistance seront étudiées.

iii) *Utiliser ces marqueurs pour étudier des problématiques plus vastes de la génétique des populations de bivalves marins.*

Nous étudierons en premier lieu la structuration géographique des populations d'huître plate sur l'ensemble de son aire de répartition, telle qu'elle est révélée par les marqueurs microsatellites, en comparaison avec les résultats publiés avec les marqueurs allozymes. Nous nous intéresserons ensuite à l'apport des marqueurs microsatellites dans le cadre de la compréhension des mécanismes conduisant à la relation hétérozygotie/croissance. Cela nous conduira à une réflexion sur les caractéristiques comparées des marqueurs traditionnels que sont les allozymes et des marqueurs plus récents tels que les microsatellites, en termes de neutralité et mécanismes mutationnels. Nous étudierons dans quelles mesures ces différences peuvent influencer sur les conclusions que l'on peut tirer des résultats en terme de diversité génétique.

DEUXIEME PARTIE

IDENTIFICATION, SEGREGATION ET LIAISONS DE LOCUS MICROSATELLITES CHEZ *OSTREA EDULIS*

INTRODUCTION

Le but premier de notre étude est d'augmenter le nombre de marqueurs (locus) polymorphes du type microsatellites chez l'huître plate. L'identification de marqueurs microsatellites peut se faire soit en recherchant des séquences répétées dans des banques de données existantes (voir par exemple Litt & Luty, 1989; Moran, 1993), soit en identifiant ces séquences par criblage d'une banque génomique (Rassman *et al.*, 1991). Chez *Ostrea edulis*, il n'existe pas de séquences référencées dans les bases de données. Nous présentons ici tout d'abord le travail de biologie moléculaire (construction et criblage d'une banque génomique, séquençage des fragments, mise au point de l'amplification par PCR et premier test de polymorphisme). Cette partie de notre travail a fait l'objet d'une publication soumise à Molecular Ecology (voir Annexe B).

Nous présentons ensuite l'étude de la transmission mendélienne et des liaisons génétiques pour 12 de ces locus, travail nécessaire dans le but futur d'identifier un marqueur génétique de la résistance à *Bonamia ostreae*.

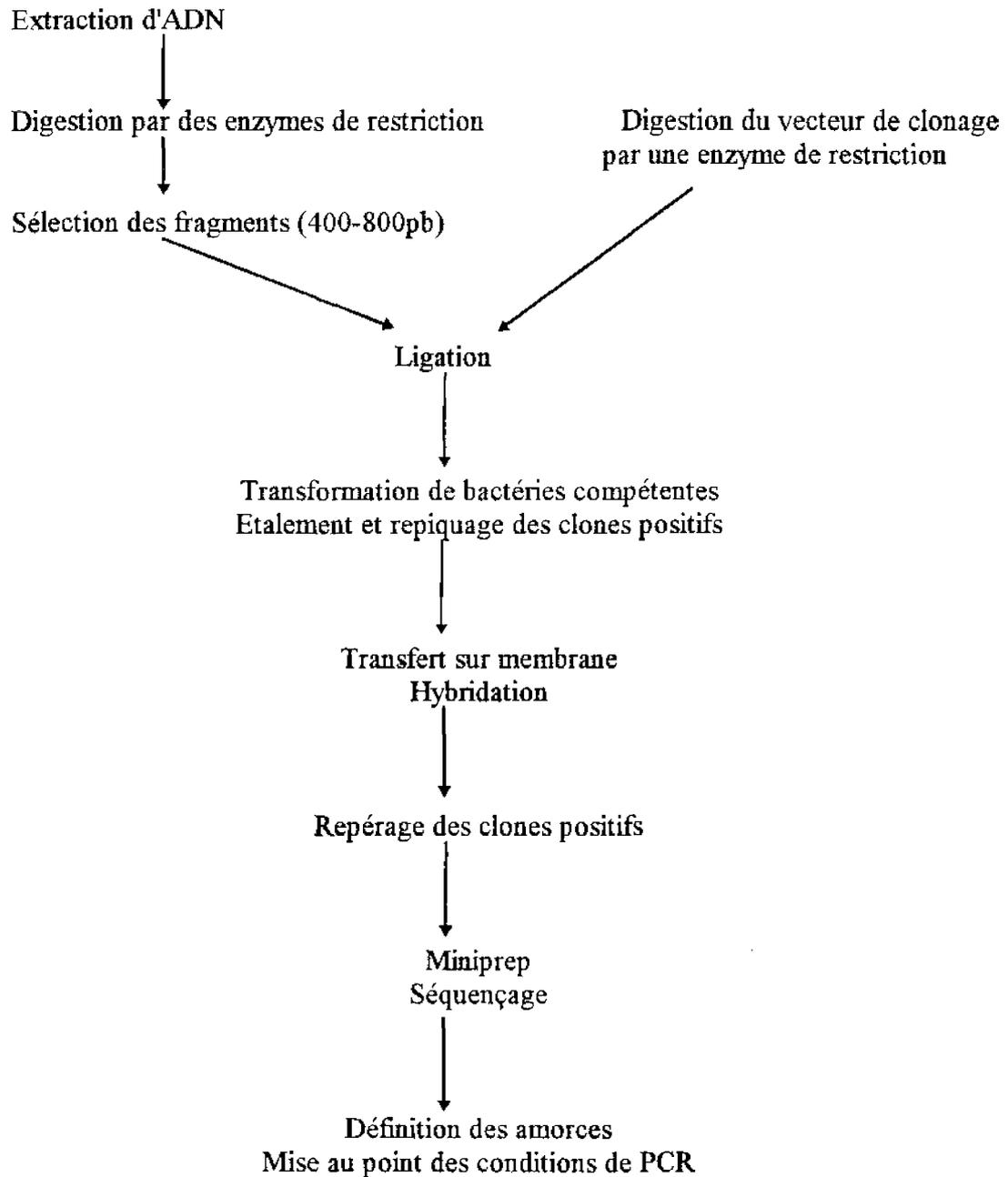


Figure III-1 : Protocole général de construction d'une banque génomique et de son criblage pour la recherche de marqueurs microsatellites
 (d'après Arnaud Estoup et Olivier Martin, communication personnelle, protocoles disponibles par le WEB à l'adresse <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>.)

III. IDENTIFICATION DE MARQUEURS MICROSATELLITES

Une première banque a été réalisée et criblée en 1993, permettant l'identification de 12 locus microsateellites, trois d'entre eux étant d'ores et déjà utilisables en routine (Naciri *et al.*, 1995). Ces trois locus ont montré un polymorphisme variable (entre 5 et 48 allèles). Cependant, trois marqueurs n'étaient pas suffisants pour réaliser les études prévues au cours de ce travail et une nouvelle banque a été construite et criblée.

A. MATERIELS ET METHODES

1. Identification de marqueurs polymorphes

Le protocole suivi est schématisé dans la Figure III-1. Les principales étapes sont rappelées ci-dessous, les détails des protocoles étant donnés en annexe D.

i) *Extraction d'ADN*. La banque a été construite à partir de l'ADN génomique d'un seul individu de captage naturel en Baie de Quiberon, extrait selon une méthode classique au phénol-chloroforme (Sambrook *et al.*, 1989).

ii) *Construction des banques partielles*

Deux banques ont été construites et criblées, qui différaient entre elles par les enzymes de restriction utilisées pour digérer l'ADN et le vecteur plasmidique:

- clonage I. Il s'agit d'un clonage en bouts francs : digestion de l'ADN par un mélange *AluI*, *RsaI* et *HaeIII* et ligation des fragments de 400 à 800 bp dans le plasmide pBluescript II KS- (Stratagene) linéarisé par *SmaI*. Ce protocole est identique à celui décrit dans Naciri *et al.* (1995).
- clonage II : Il s'agit d'un clonage en bouts collants : digestion de l'ADN par *BspI43I* (isoschizomère de *Sau3A*) et ligation dans le plasmide pBluescript II KS+ (Stratagene), linéarisé par *XhoI*. Ce protocole a été utilisé car il évite la refermeture du plasmide sur lui-même et surtout l'apparition de fragments d'ADN chimères (composés de deux fragments qui n'étaient pas voisins dans le génome), phénomène qui semble être à l'origine de l'impossibilité de dessiner des amorces pour un certain nombre de locus microsateellites mis en évidence lors du clonage décrit dans Naciri *et al.* (1995) (Y. Naciri & Y. Vigouroux, comm. pers.) (voir Figure III-2).

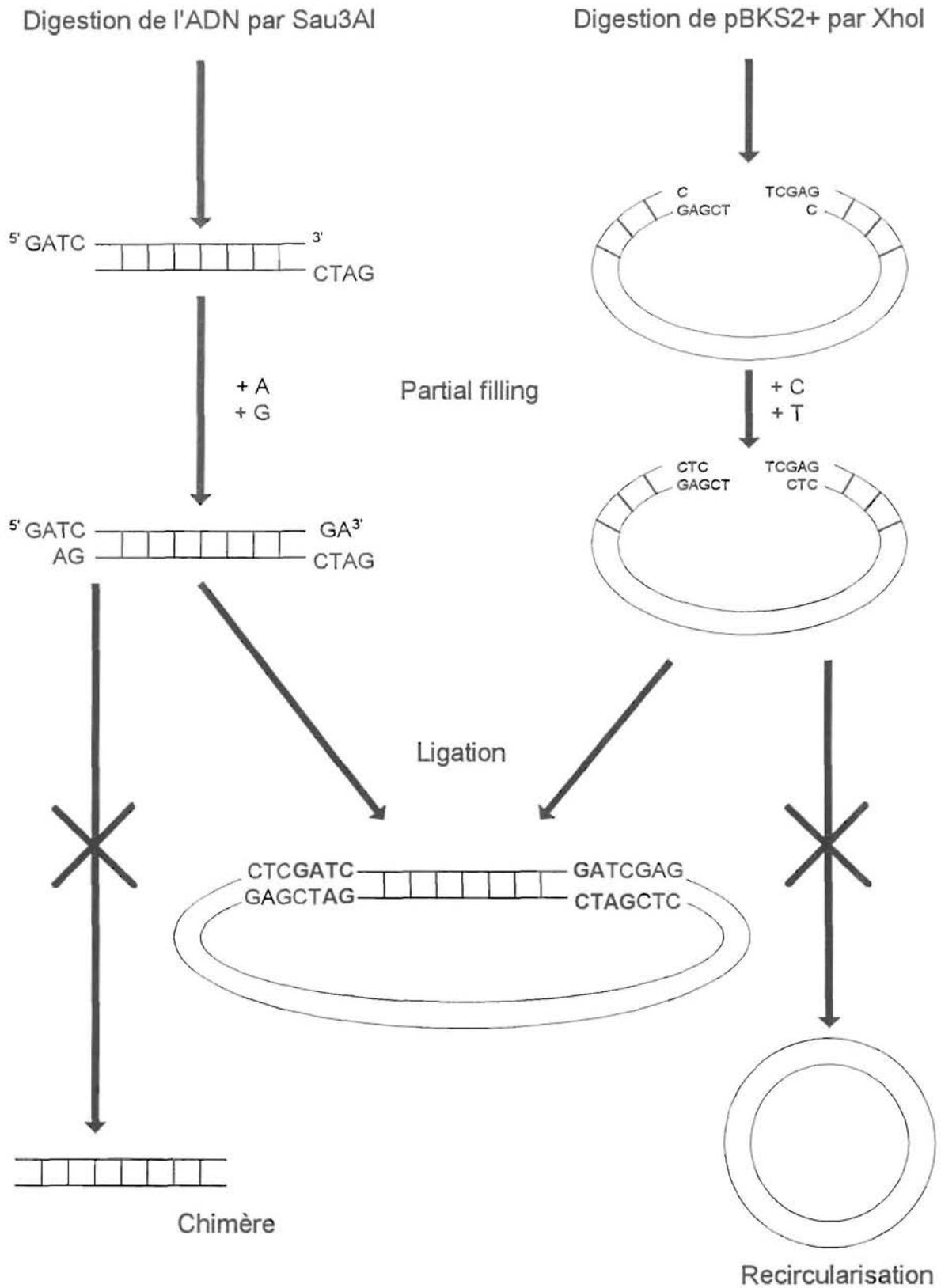


Figure III-2 : Principe du clonage en bouts collants (clonage II)

Les plasmides ont ensuite servi à transformer des bactéries *E. coli* compétentes et les clones recombinants ont été individuellement repiqués.

iii) *Criblage*. Les banques partielles ont été criblées avec un mélange équimolaire de trois sondes dinucléotidiques : (dAdC)_n/(dTdG)_n, (dAdG)_n/(dTdC)_n, (dAdT)_n/(dTdA)_n marquées au γ ³³P-dATP par random-priming. Des essais de criblage ont été effectués avec des sondes trinuécléotidiques ((TGT)₈, (TCT)₈, (TAT)₈, (TAG)₈) et tétranucléotidiques ((TACT)₇, (TTAT)₇ et (ACTC)₇). Les clones positifs ont été identifiés par autoradiographie. Ils ont été repiqués, puis mis en culture en milieu liquide, et l'ADN en a été extrait par minipréparation (lyse alcaline).

iv) *Séquençage et définition des amorces*. La séquence des clones positifs a été déterminée par la technique du séquençage alcalin double brin (Sanger *et al.*, 1977, Sambrook *et al.*, 1989). Chaque fois que cela a été possible, des amorces ont été déterminées autour de la séquence microsatellite, à l'aide du logiciel Primer (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). En raison d'une taille élevée des inserts, il a parfois été nécessaire de déterminer une amorce interne en amont du microsatellite et de refaire une réaction de séquence.

2. Test de polymorphisme chez *Ostrea edulis* et transfert à d'autres espèces d'huîtres plates.

a) Matériel biologique

Le polymorphisme de chaque locus a été déterminé par le génotypage de 77 individus d'une population d'*Ostrea edulis* issus de captage naturel en Baie de Quiberon. Des essais d'amplification ont par ailleurs été tentés sur d'autres espèces d'huîtres plates :

- *Ostrea stentina* (Payraudau): Cette huître est trouvée en sympatrie avec *Ostrea edulis* sur la partie sud de son aire de répartition (Méditerranée et Atlantique Sud). Elle est morphologiquement proche d'*Ostrea edulis* mais semble différente de cette dernière au niveau du polymorphisme enzymatique. Blanc *et al.* (1986) ont trouvé trois locus enzymatiques diagnostic permettant de distinguer les deux espèces en sympatrie dans la lagune de Nador (Maroc). Notre échantillon de 11 individus provient de la Baie de Dakhla (à 1800 km au sud de Casablanca).

- *Ostrea densalamellosa* (Lischke) : Cette espèce est distribuée sur la côte pacifique du continent asiatique (ex-URSS, Corée, Chine, Vietnam) et sur les côtes japonaises. Notre échantillon est constitué d'un seul individu récolté en Corée du Sud.

- *Tiostrea lutaria* = *T. chilensis* (Philippi): *T.lutaria* est une huître plate endémique des côtes de la Nouvelle Zélande. Elle était autrefois classifiée dans le genre *Ostrea*, mais sur la base d'observations portant sur la biométrie des larves, un nouveau genre *Tiostrea* a été créé (Chanley & Dinamani, 1980). Ce genre ne contient que 2 espèces, *T. lutaria*, et *T. chilensis*, toutes deux endémiques des côtes pacifiques sud-américaines. Sur la base d'étude du polymorphisme enzymatique, Buroker *et al.* (1983) ont établi que *T. chilensis* et *T. lutaria* sont en fait la même espèce. Notre échantillon est constitué de 12 individus originaires de Foveaux Strait en Nouvelle-Zélande.

b) *Extraction d'ADN*

Deux méthodes d'extraction ont été utilisées lors de cette étude.

⇒ Méthode dite au « phénol chloroforme ».

Le principe est la digestion des protéines cellulaires par action de la protéinase K dans un tampon de lyse. Les résidus de digestion sont ensuite éliminés par un lavage au phénol suivi d'un lavage au chloroforme. La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée après centrifugation. L'ADN est précipité à l'éthanol absolu puis dissout dans de l'eau ultrapure ou du tampon TE (Tris-EDTA).

Cette technique à l'avantage de fournir de l'ADN propre en forte concentration; elle est cependant coûteuse en temps et utilise des produits toxiques (phénol, chloroforme) de manipulation délicate.

⇒ Méthode dite « au Chelex® »

Cette méthode, adaptée de Walsh *et al.* (1991) et publiée par Estoup *et al.* (1996), s'appuie sur l'utilisation de Chelex®, une résine chélatante des ions métalliques qui pourraient être impliqués en tant que co-facteur enzymatique dans la dégradation de l'ADN (Singer-Sam *et al.*, 1989). Après digestion des tissus en présence de protéinase K et de Chelex® à 5%, une simple centrifugation après homogénéisation suffit pour récupérer l'ADN dans la phase surnageante. L'ADN semble être de moins bonne qualité et se conserver moins longtemps. De plus, l'ADN est beaucoup moins concentré que dans le cas de la méthode précédente. Cependant, le protocole est très simple et ne fait pas intervenir de produits toxiques. De plus, cette technique

très sensible, utilisée pour extraire l'ADN de traces de sang ou de sperme à des fins de médecine légale (Walsh *et al.*, 1992), permet d'extraire l'ADN à partir d'échantillons de très petite taille. Cette méthode a été utilisée sur la plus grande partie des individus analysés, avec un succès estimé de plus de 95%. Le succès s'entend ici comme une amplification réussie par PCR tentée. La contrainte sur la qualité et la stabilité des ADN extraits par cette technique ne nous est pas apparue très forte, puisque des ADN extraits en février 1995 et conservés au congélateur donnaient encore des résultats satisfaisants en PCR deux ans plus tard.

c) Amplification et visualisation (voir Annexe D)

L'analyse en routine des individus se fait par PCR après marquage en 3' d'une amorce à l'aide d'ATP radioactif (isotope ^{33}P). La réaction de PCR se fait dans un volume total de 10 μl contenant 5 μl d'ADN à amplifier (ou 2 μl dans le cas d'extraction au phénol-chloroforme), 1.5 μM de MgCl_2 , 75 μM de chaque dNTP, 0.25 μM d'amorce marquée, 0.4 μM de l'amorce non marquée, 0.35 unités d'enzyme polymérase et son tampon.

Le cycle d'amplification retenu est un cycle standard: une pré-dénaturation (94°C) suivie de 30 cycles de dénaturation/annealing/élongation (94°C/Ta/72°C) et une élongation finale (72°C). Ta est la température d'appariement spécifique à chaque couple d'amorces.

Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse sur un gel dénaturant d'acrylamide-bisacrylamide à 6%, sous une puissance constante de 55W. Après autoradiographie, les génotypes de chaque individu sont relevés par comparaison avec des témoins de génotype connu. Les allèles sont en général nommés par leur taille en paires de bases (pb), estimée par comparaison avec la taille du clone séquencé.

B. RESULTATS

1. Identification de marqueurs microsatellites

a) Identification et caractéristiques

Les résultats sont présentés ci-dessous en séparant les deux types de clonage utilisés.

Tableau III-1: Caractéristiques des motifs microsatellites identifiés

Nom du locus	Motif	Clonage	Utilisation
<i>OeduP7</i>	(AC) ₂₀	I	Bandes
<i>OeduK7</i>	(CT) ₂₈	I	Bandes
<i>OeduO9</i>	(GA) ₃₆	I	Routine
<i>OeduT18</i>	(CT) ₂₁	I	Ponctuelle
<i>OeduD8</i>	(GA) ₂₄	I	Aucun
<i>OeduI22</i>	(CT) ₁₁ CCC(CT) ₆	I	Non défini
<i>OeduR10</i>	(CT) ₆ TTT(CT) ₂₂	I	Aucun
<i>OeduE10</i>	(GA) ₃₀ TT(TG) ₂₃	I	Aucun
<i>OeduH10</i>	(CA) ₁₈ (TA) ₃₀	I	Aucun
<i>OeduG12</i>	(CA) ₂₆ (TA) ₃	I	Aucun
<i>OeduO3</i>	(TA) ₈ (GA) ₂₆	I	Non défini
<i>OeduN8</i>	(AT) ₈ ..(AT) ₂₂ ..(CT) ₂₆ *	I	Ponctuelle
<i>OeduP8</i>	(TA) ₇ (GA) ₂₂	I	Non défini
<i>OeduE8</i>	(AT) ₁₇ AC(AG) ₂₃	I	Ponctuelle
<i>OeduU2</i>	(CA) ₂₁ (GA) ₁₇	I	Routine
<i>OeduH15</i>	(ATCT) _n (dégradé) **	I	Routine
<i>OeduJ12</i>	(GT) ₁₄	II	Routine
<i>OeduI9</i>	(CA) ₂₆	II	Bandes
<i>OeduT5</i>	(CA) ₁₅	II	Routine
<i>OeduB113</i>	(GA) ₂₂	II	Ponctuelle
<i>OeduG11</i>	(AT) ₂₀	II	Aucun
<i>OeduB16</i>	(CT) _n TTT(CT) ₉	II	Ponctuelle
<i>OeduW18</i>	(GT) ₂₄ ..(GTGTGC) ₆ (GT) ₄₁	II	Aucun
<i>OeduG9</i>	(AT) ₄ (GT) ₃₅	II	Routine
<i>OeduZ44</i>	(AT) ₆ (GT) ₁₄	II	Non défini
<i>OeduM14</i>	(TA) ₂₀ (CA) ₁₃	II	Aucun
<i>OeduR9</i>	(CT) ₂₇ C(CA) ₁₉	II	Aucun
<i>OeduD1</i>	(AGG) ₅	II	Aucun

* séquence complète du motif du locus N8:

(AT)₈AAATTTT(AT)₂₂AACACGACCAATTGATTATT(CT)₂₆

** séquence complète du motif du locus H15:

(ATCT)₄ATGT(ATCT)₂ATGTATCTATATATCTATGT(ATCT)₅(TACC)₄AATTTTCT(ATCT)₃
AAATATCTCTTACCTACTAACCTACCA(ATCT)₃

Conditions d'utilisation :

Routine

Ponctuelle (mise au point non achevée mais utilisation possible dans des croisements contrôlés où les allèles attendus sont connus),

Bandes (Beaucoup de bandes et patrons illisibles)

Non défini (amorces non définies car trop grande proximité du site de coupure),

Aucun (aucune amplification obtenue).

(1) clonage I en bouts francs.

Un nombre total de 3639 clones a été repiqué, ces derniers étant d'une taille moyenne de 650 pb. En supposant que chaque insert est unique, la taille du génome ainsi criblée a été estimée à 2300 kb. En se basant sur une moyenne des tailles du génome chez deux autres espèces du genre *Ostrea* (Hinegardner, 1974), il est possible d'estimer la taille du génome haploïde d'*Ostrea edulis* à 1100 Mb; la librairie étudiée représente alors 0.2% du génome.

Le criblage à l'aide des sondes dinucléotidiques a permis l'identification de 24 clones positifs, soit 0.65 % des clones obtenus. Quatorze clones contenaient un microsatellite, et un clone en contenait deux.

Sur les 16 microsatellites mis en évidence, 5 sont constitués de motifs dinucléotidiques purs de type $(AC/GT)_n$ ou $(AG/CT)_n$, deux sont constitués d'un motif dinucléotidique impur, 8 sont des motifs composés, et un est un tétranucléotide interrompu.

(2) clonage II en bouts collants

Un nombre total de 4259 clones a été repiqué, ceux-ci étant d'une taille moyenne de 650 pb. La taille de la portion de génome ainsi criblée est évaluée à 2700 kb, soit 0.25% du génome.

Le criblage par les sondes dinucléotidiques a permis de mettre en évidence 19 clones positifs, soit 0.45 % des clones obtenus. Onze clones contenaient un microsatellite, et un clone en contenait deux. Deux des microsatellites identifiés dans des clones différents se sont révélés être identiques (même séquence sur plus de 250 pb séquencées).

Sur les 12 microsatellites différents mis en évidence, 5 sont des motifs dinucléotidiques purs, 2 sont des motifs dinucléotidiques impurs, 4 sont des motifs composés, et un est un motif trinucleotide.

Les caractéristiques des 28 microsatellites identifiés sont présentés dans le Tableau III-1. Si l'on ajoute les 14 microsatellites mis en évidence par Naciri *et al.* (1995), on dispose alors pour *Ostrea edulis* de 42 microsatellites identifiés.

b) *Estimation des densités*

Les calculs de densité ont été effectués sur les microsatellites de types $(AC/GT)_n$ et $(AG/CT)_n$, avec une méthode comparable à celle utilisée par Naciri *et al.* (1995) à partir de la première

banque. On considère pour ces calculs que les motifs composés sont en fait constitués de deux microsattellites accolés. Les résultats sont présentés dans le Tableau III-2.

Tableau III-2: Comparaison des résultats de clonage et estimations de densité des microsattellites entre les 3 banques réalisées sur *Ostrea edulis*

	Banque 1994		Banques 1995			
	(Naciri <i>et al.</i> , 1995)		Clonage I		Clonage II	
Nb de clones criblés	3560		3639		4259	
Taille moyenne des inserts	195		650		650	
Taille du génome criblé	700 kb		2300 kb		2700 kb	
% du génome criblé	0,064 %		0,2 %		0,25 %	
% de clones positifs	0,6 %		0,82 %		0,45 %	
Nb de μ sattellites identifiés	12		19		13	
(AC/GT) _n	5		6		11	
Nb estimé et densité*	7900	139 Kb*	3000	380 Kb	4400	250 Kb
(AG/TC) _n	8		13		2	
Nb estimé et densité	12700	87 Kb	6500	176 Kb	800	1375 Kb
(AT/TA) _n	ND		6		4	
Nb estimé et densité			3000	380 Kb	1600	840
Nb total estimé et densité	20600	54 Kb	12500	92 Kb	6800	198 Kb

* distance moyenne estimée entre deux microsattellites

L'estimation de la densité (et donc du nombre total de motifs microsattellites présents dans le génome) est plus faible pour les 2 clonages réalisés en 1995 que pour le clonage précédent. Par ailleurs, les deux clonages de 1995 montrent eux-même des résultats très différents, aussi bien en terme de densité des motifs microsattellites qu'en ce qui concerne le type de motifs mis en évidence. Le clonage II a essentiellement permis l'identification de répétitions de type (AC)_n (11 contre 2 répétitions (AG)_n) alors pour le clonage I, le ratio est inversé (13 motifs (AG)_n contre 6 motifs (AC)_n). Ce dernier ratio correspond à celui trouvé par Naciri *et al.* (1995) avec la même technique de clonage.

c) Définition des amorces

A l'aide du logiciel Primer, nous avons défini des couples d'amorces pour 24 microsattellites. (voir Tableau III-1). Pour trois autres microsattellites (*Oedu.Z44*, *Oedu.I22* et *Oedu.O3*), il n'a pas été possible de définir d'amorces en raison de la trop grande proximité du site d'insertion. L'un des clones (contenant le microsattellite *Oedu.P8*) n'a pu être séquencé entièrement et la définition d'amorces n'a pas été possible.

2. Mise au point des conditions de PCR et premières études de polymorphisme

a) *Etudes de polymorphisme chez Ostrea edulis*

Après définition des amorces et essais d'amplification, six locus issus des nouvelles banques I et II se sont révélés utilisables en routine (*OeduJ12*, *OeduU2*, *OeduH15*, *OeduO9*, *OeduG9*, *OeduT5*). Ils s'ajoutent aux trois locus (*OeduB0*, *OeduB11* et *OeduC6*) mis en évidence par Naciri *et al.* (1995). Le laboratoire dispose donc de 9 locus utilisables en routine, ce qui est un nombre tout à fait satisfaisant pour les études envisagées, aussi bien sur les populations sélectionnées que pour des études de populations naturelles.

Les principales caractéristiques de ces microsatellites sont résumées dans le Tableau III-3. Les premiers tests de polymorphisme effectués sur 77 individus de captage naturel en Baie de Quiberon révèlent un polymorphisme important pour tous les locus, soit entre 14 et 29 allèles selon les locus. Ces polymorphismes sont compris dans la fourchette trouvée par Naciri *et al.* (entre 5 et 48 allèles pour les premiers microsatellites identifiés); ils confirment la grande variabilité génétique révélée chez *Ostrea edulis* par les locus microsatellites.

Après les premiers essais, certains locus ne donnaient pas un patron suffisamment clair pour être utilisés dans des études de populations, mais pouvaient par contre être utilisés dans l'étude de familles ségrégeantes, car on connaît alors les allèles attendus. Ces locus peuvent en particulier être intégrés dans une analyse des liaisons génétiques entre marqueurs. Il s'agit des locus suivants: *OeduB16*, *OeduB113*, *OeduT18*, *OeduN8*, *OeduE8* et *OeduC1*, ce dernier locus étant issu de Naciri *et al.* (1995).

Les autres locus ne sont pas à l'heure actuelle utilisables, en raison de l'absence d'amplification ou de patrons alléliques trop confus.

Tableau III-3: Caractéristiques des microsatellites d'*Ostrea edulis* utilisables en routine

Locus	Motif du clone séquencé	Taille de l'allèle séquencé	Ta	Nombre d'allèles *	Taille du plus petit allèle	Taille du plus grand allèle
<i>OeduJ12</i> ¹	(GT) ₁₄	224	50°C	24	216	272
<i>OeduU2</i> ¹	(CA) ₂₁ (GA) ₁₇	178	50°C	29	146	206
<i>OeduH15</i> ¹	(ATCT) _n	213	50°C	14	165	225
<i>OeduO9</i> ¹	(GA) ₃₆	180	53°C	18	140	176
<i>OeduG9</i> ¹	(AT) ₄ (GT) ₃₅	247	50°C	29	197	279
<i>OeduT5</i> ¹	(GT) ₁₅	124	55°C	23	106	166
<i>OeduB0</i> ²	(GTT) ₇ GGG(GC) ₉		55°C	5	90	102
<i>OeduB11</i> ²	(TC) ₉ (AC) ₂₂		51°C	48	155	217
<i>OeduC6</i> ²	(TC) ₂₆		53°C	17	131	175

¹Cette étude, ²Naciri *et al.*, 1995

Le nombre d'allèles a été déterminé par le génotypage de 77 individus d'une population de captage naturel de la Baie de Quiberon pour les locus *OeduJ12*, *OeduU2*, *OeduH15*, *OeduT5* et *OeduO9* et un échantillon de 50 individus de cette même population pour le locus *OeduG9*. Pour les locus *OeduB0*, *OeduB11* et *OeduC6*, voir Naciri *et al.* (1995).

b) Amplifications hétérologues

Les 6 locus issus de ce travail (*OeduJ12*, *OeduG9*, *OeduU2*, *OeduO9*, *OeduH15* et *OeduT5*) ont été testés sur les différentes espèces d'huîtres plates à notre disposition. Les résultats sont présentés dans le Tableau III-4. Aucune amplification n'a pu être obtenue avec les autres espèces testées du genre *Ostrea*. Deux locus cependant, *OeduJ12* et *OeduT5*, ont permis l'amplification d'un marqueur polymorphe chez *Tiostrea chilensis*. Les allèles observés chez *T. chilensis* sont sensiblement différents des allèles observés chez *O. edulis*. En effet, pour le locus *OeduT5*, les allèles sont un peu plus grands chez *T. chilensis* (156 pb en moyenne contre 126 pour *O. edulis*). Pour le locus *OeduJ12*, les allèles observés chez *T. chilensis* sont décalés d'une paire de base par rapport à ceux de *Ostrea edulis*. On peut supposer l'existence de phénomènes d'insertion/délétion dans les zones flanquantes, mais un séquençage serait nécessaire pour répondre à cette question et le temps nous a manqué pour nous pencher sur ce problème.

Tableau III-4 : résultats des amplifications hétérologues

Espèce	Origine géographique	Effectif	Nombre d'allèles (tailles extrêmes)					
			<i>OeduJ12</i>	<i>eduU2</i>	<i>OeduT5</i>	<i>OeduO9</i>	<i>OeduH15</i>	<i>OeduG9</i>
<i>O. stentina</i>	Maroc	10	*	*	*	*	*	*
<i>O. densalamellosa</i>	Corée du Sud	1	*	*	*	*	*	*
<i>T. chilensis</i>	N ^{elle} Zélande	12	11	*	11	*	*	*
			(213-251)		(132-174)			

* pas d'amplification

C. DISCUSSION

Deux points sont importants en ce qui concerne l'identification de marqueurs microsatellites chez *Ostrea edulis*:

① il y a tout d'abord une grande différence, dans la banque réalisée en 1995, entre les types de motifs mis en évidence par les deux techniques de clonage utilisées. Dans le cas du clonage I, on a surtout révélé des motifs du type $(AG/CT)_n$, ce qui était également le cas lors du criblage de la banque réalisée par Naciri *et al.* (1995) avec la même technique. Par contre, lors du clonage II, ce sont surtout les motifs du type $(AC/GT)_n$ qui ont été révélés.

Quelques pistes de réflexion, qui tiennent à la nature des enzymes de restriction utilisées, sont envisageables pour expliquer ces divergences entre les deux types de clonage:

- les sites de coupure qui ne sont pas les mêmes selon les enzymes de restriction utilisées (voir Tableau III-5)

Tableau III-5 : Sites de restriction des différentes enzymes utilisées.

	Enzyme	Site de restriction
Clonage I	<i>AluI</i>	AG [^] CT
	<i>HaeIII</i>	GG [^] CC
	<i>RsaI</i>	GT [^] AC
Clonage II	<i>Sau3A</i>	[^] GATC

- Par ailleurs, dans le cas du clonage I, la digestion enzymatique n'a été que partielle, bien qu'elle ait permis de couper la quasi-totalité du génome en fragments compris entre 400 et 800 pb. En d'autres termes, la digestion a été arrêtée quand la majorité de l'ADN avait été coupé en fragments de taille 400-800 pb (visualisé sur gel d'agarose). On aurait donc une bonne représentativité du génome dans les fragments clonés. Par contre, dans le cas du clonage II, et malgré une digestion complète, les fragments compris entre 400 et 800 pb ne représentaient qu'une fraction du génome, la plupart du génome après digestion étant composé de fragments de taille supérieure à 800 pb. On peut alors se demander si la répartition des sites de restriction pour les enzymes utilisées, et la répartition des séquences microsatellites, sont vraiment aléatoires dans le génome, mais il est difficile de se prononcer davantage.

Si ces deux paramètres (nature des sites de restriction et qualité de la digestion) s'avèrent effectivement déterminants, une estimation correcte du ratio entre les motifs $(AC/GT)_n$ et $(AG/CT)_n$ peut être donnée en combinant les résultats du clonage I à ceux obtenus par Naciri *et al.* (1995); ce ratio serait de 1 motif $(AC/TG)_n$ pour 3 motifs $(AG/TC)_n$. Un ratio inverse a

été trouvé chez les vertébrés (homme, rat ou truite, Beckman & Weber, 1992; Estoup *et al.*, 1993b).

② Il est étonnant de voir une différence aussi grande, entre les banques génomiques criblées en 1995 et les résultats décrits par Naciri *et al.* (1995), dans les estimations du nombre et de la densité des motifs microsatellites dans le génome. La différence essentielle entre les deux banques tient au choix de la taille des fragments (environ 650 pb ici contre 195 pb pour Naciri *et al.*). Il est possible alors que l'on n'ait pas criblé la même population de microsatellites, et qu'il y ait davantage de "petits" microsatellites que de "grands".

Il est fréquent de trouver, dans les génomes humains et porcins, des microsatellites avec moins de 12 répétitions (Weber, 1990; Wintero *et al.*, 1992.). Si c'est le cas également chez *Ostrea edulis*, il est possible que dans le travail présenté ici, la (trop?) grande taille des fragments n'ait pas permis la détection de ces motifs, et que l'on ait donc sous-évalué le nombre de microsatellites potentiels et leur densité dans le génome.

La distance réelle entre deux microsatellites (de type (AC/GT)_n ou (AG/CT)_n) dans le génome d'*Ostrea edulis* doit se situer entre 54 Kb et 146 Kb. On peut espérer dans un futur proche, la parution d'études utilisant des microsatellites chez d'autres mollusques (en particulier *Crassostrea gigas*); nos résultats pourront alors être réexaminés à la lumière de ces nouvelles informations. En l'absence de données analogues chez d'autres mollusques, et à titre de comparaison, les résultats obtenus chez d'autres animaux et chez des plantes sont présentés dans le Tableau III-6.

La densité des motifs microsatellites ainsi que l'importance relative des motifs (AC)_n et (AG)_n chez *Ostrea edulis* semble être plus proche de celles des plantes que de celles des animaux vertébrés. Comme chez les plantes (Lagercrantz *et al.*, 1993), mais également comme chez les insectes, ou comme chez *Bulinus truncatus* (Jarne *et al.*, 1993), le motif (AG)_n semble être le plus fréquent. Les microsatellites semblent être moins densément répartis chez *Ostrea edulis* que chez les autres animaux (y compris les insectes).

Tableau III-6 : Distance moyenne estimée en Kb entre les motifs microsatellites chez différents organismes

	(AC/GT) _n	(AG/CT) _n	Total
Homme <i>Homo sapiens sapiens</i> (Stallings <i>et al.</i> , 1991; Beckmann & Weber, 1992)	30-50	115	
Rat <i>Rattus norvegicus</i> (Beckmann & Weber, 1992)	15	30	
Souris <i>Mus musculus</i> (Stallings <i>et al.</i> , 1991)	18		
Chien <i>Canis familiaris</i> (Rothuizen <i>et al.</i> , 1994)	42		
Porc <i>Sus scrofa</i> (Winterø <i>et al.</i> , 1992)	46		
Cheval <i>Equus caballus</i> (Ellegren <i>et al.</i> , 1992)	100	750	
Saumon <i>Salmo salar</i> (Slettan <i>et al.</i> , 1993)	90		
Truite commune <i>Salmo trutta</i> (Estoup <i>et al.</i> , 1993a)	23	76	
Abeille <i>Apis mellifera</i> (Estoup <i>et al.</i> , 1993b)	34	15	
Bourdon <i>Bombus terrestris</i> (Estoup <i>et al.</i> , 1993b)	500	40	
Guêpe <i>Vespula rufa</i> (Thorén <i>et al.</i> , 1995)	8	2.5	
Huître plate <i>Ostrea edulis</i> (Naciri <i>et al.</i>, 1995)	139	87	54
Huître plate <i>Ostrea edulis</i> (cette étude)	480	176	92
Bulin <i>Bulinus truncatus</i> (Jarne <i>et al.</i> , 1993)			40
Blé <i>Triticum aestivum</i> (Lagercrantz <i>et al.</i> , 1993)	110	80	
Blé <i>Triticum aestivum</i> (Röder <i>et al.</i> , 1995)	704	440	
Riz <i>Oryza sativa</i> (Wu & Tanksley, 1993)	480	225	150
Riz <i>Oryza sativa</i> (Panaud <i>et al.</i> , 1995)	365	330	
Orge <i>Hordeum vulgare</i> (Liu <i>et al.</i> , 1996)	620	330	
Maïs <i>Zea mays</i> (Condit & Hubbell, 1991)	166	111	
Colza <i>Brassica napus</i> (Lagercrantz <i>et al.</i> , 1993)	350	125	
Tabac <i>Nicotiana tabacum</i> (Lagercrantz <i>et al.</i> , 1993)	180	150	
Fausse arabette <i>Arabidopsis thaliana</i> (Bell & Ecker, 1994)	428	245	
Epicea <i>Picea abies</i> (Lagercrantz <i>et al.</i> , 1993)	180	150	
Pin <i>Pinus sylvestris</i> (Kostia <i>et al.</i> , 1995)	500	100	
Kiwi <i>Actinidia chinensis</i> (Weising <i>et al.</i> , 1996)	125	42	

Le motif microsatellite le plus fréquent chez les plantes serait en fait (AT)_n (Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante & Olivieri, 1993). Ce motif n'a pas été trouvé de façon abondante chez *Ostrea edulis*, mais cela peut s'expliquer par la nature même du motif. En effet, la sonde (AT)_n n'est pas souvent employée lors du clonage car elle est totalement complémentaire avec elle-même. Il est possible alors que de tels motifs existent mais n'aient pas été révélés par notre technique de clonage. Chez les plantes, ces motifs ont pu être mis en évidence par interrogation des bases de données.

Nous avons donc augmenté le nombre de marqueurs microsatellites identifiés chez *Ostrea edulis*. Six de ces locus semblent déjà utilisables en routine aussi bien pour des études de génétique des populations que pour des études touchant aux programmes d'amélioration génétique chez cette espèce. Les tentatives de transfert de ces marqueurs à d'autres espèces d'huîtres plates semblent par contre peu encourageantes. Il est curieux que la seule espèce chez qui des amplifications positives ont été trouvées soit *Tiostrea chilensis*, qui appartient à un autre genre. Rappelons que la classification actuelle des huîtres plates (et notamment la distinction entre les genres *Tiostrea* et *Ostrea*) n'est basée que sur des critères morphologiques. Or nous avons vu dans le chapitre II que le succès des transferts interspécifiques de locus microsatellites dépend probablement largement du temps de divergence entre les espèces. Les résultats obtenus ici suggèrent l'intérêt d'établir une phylogénie moléculaire des huîtres plates des genres *Ostrea* et *Tiostrea*.

IV. SEGREGATION ET LIAISON DES MARQUEURS MICROSATELLITES

A. INTRODUCTION : LA CARTOGRAPHIE GENIQUE

L'élaboration de cartes géniques est devenue une démarche importante pour aborder bon nombre de problèmes de biologie, depuis l'amélioration génétique des animaux et des végétaux jusqu'à des problèmes plus fondamentaux, tels que l'évolution et l'étude des maladies humaines.

On peut distinguer, dans un programme de cartographie, 3 étapes plus ou moins chevauchantes (Gellin & Chevalet, 1994) :

- i) Déterminer un réseau homogène et assez dense de marqueurs génétiques polymorphes.
- ii) En utilisant ce réseau de marqueurs, localiser des gènes contribuant de façon importante à la variabilité des caractères de production : gènes majeurs ou QTL (Quantitative Trait Loci)
La cartographie peut permettre de localiser des gènes majeurs qui auraient été mis en évidence par des tests statistiques. Il sera ainsi possible d'associer ces gènes à des marqueurs et donc de génotyper très précocement les individus. Notons que cette approche peut être utilisée avant même que le gène lui-même soit identifié, comme cela a été le cas par exemple chez le porc avec le gène de sensibilité à l'halothane (Guérin *et al.*, 1983; Fujii *et al.*, 1991).
- iii) Utiliser ces informations dans des programmes de sélection

L'amélioration génétique d'une espèce via la sélection artificielle dépend de la capacité à estimer des effets génétiques qui ne soient pas confondus avec des effets environnementaux. Les marqueurs génétiques - héréditaires, et qui peuvent être associés avec des caractères économiquement intéressants, gènes majeurs ou QTL - peuvent être des outils intéressants pour le sélectionneur (Darvasi & Soller, 1994; Staub *et al.*, 1996b). La sélection assistée par marqueur (SAM) offre en théorie des possibilités d'améliorer l'efficacité de la sélection en permettant une sélection précoce et en réduisant la taille des populations sous sélection.

Comme on l'a vu précédemment, les microsatellites sont un outil de plus en plus utilisé pour la cartographie en raison de leur nombre potentiellement élevé et de leur répartition sur l'ensemble du génome.

L'un des objectifs initiaux de cette étude était, après l'identification d'un grand nombre de marqueurs, d'établir une carte de liaison génétique entre un nombre important de marqueurs, et éventuellement d'identifier un marqueur lié au caractère de résistance à la bonamiose.

B. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

Le projet initial prévoyant la recherche d'un marqueur lié au caractère de résistance à la bonamiose, une structure familiale appropriée a été créée, qui a pu être analysée pour tester les transmissions mendéliennes et les liaisons entre marqueurs. Nous avons créé des familles de type "F2" qui étaient potentiellement en ségrégation pour le caractère de résistance.

En 1995, deux familles biparentales ont été produites en croisant un géniteur issu d'une lignée sélectionnée (P89-G1) et un géniteur issu d'une population naturelle de la Baie de Quiberon. Des pleins-frères de ces familles de type "F1" ont été recroisés en 1996 et 6 familles de type "F2" ont été produites. L'analyse des ségrégations mendéliennes et des liaisons possibles entre différents marqueurs a été réalisée sur 122 individus d'une de ces familles. Cette famille a été choisie comme celle dont les parents présentaient le maximum d'allèles différents à chaque locus. Notons que le croisement ayant été réalisé sans contrôle du sexe, il n'est pas possible de déterminer le parent femelle du parent mâle. En l'occurrence, nous les noterons dans la suite de l'étude "parent 1" et "parent 2".

Des prélèvements de tissus ont été réalisés sur les individus des trois générations (parents "F1" et "F2"): prélèvements de fragments de branchies (congelés à -20°C) pour l'extraction d'ADN en vue du typage aux locus microsatellites et prélèvement du muscle et de la glande digestive (congelés à -80°C) pour l'électrophorèse enzymatique. Les descendants F2 ont été sacrifiés lorsqu'ils ont eu atteint une taille compatible avec l'étude par électrophorèse enzymatique, soit à l'âge de 10 mois.

2. Marqueurs utilisés dans cette étude

Les distorsions de ségrégations et les liaisons entre locus ont été étudiées sur 14 marqueurs génétiques :

- Douze locus microsatellites, dont les 9 locus utilisables en routine mentionnés au chapitre précédent, ainsi que trois locus supplémentaires dont les patrons d'amplification ont pu être analysés dans le cadre d'une étude de descendance, à savoir *OeduT18*, *OeduB113* et *OeduC1*.
- Deux locus allozymes qui se sont révélés polymorphes, *Idh-1* et *EstD-3*.

3. Méthodes statistiques

La famille retenue pour l'analyse des liaisons entre marqueurs a été choisie de telle sorte que pour chaque marqueur les 2 parents soient hétérozygotes avec au plus un allèle en commun. Il est alors possible d'identifier dans la descendance "F2" l'origine parentale de chaque allèle. On a ainsi la possibilité d'accéder à la phase gamétique de chaque parent. En conséquence, les méthodes permettant d'établir des cartes génétiques lorsque l'accès à la phase haploïde est possible pourront s'appliquer ici.

Si on considère deux locus distincts A et B, 4 gamètes haploïdes différents peuvent être formés, soit de type "parental" soit de type "recombiné". Ces gamètes recombinés sont en proportion r correspondant au taux de recombinaison. Le taux de recombinaison rend compte de la distance entre les deux locus, mais ne peut être utilisé directement comme mesure de cette distance. En effet, en raison des possibilités de recombinaison multiples, et du phénomène d'interférence, cette quantité n'est pas additive. La valeur de r doit être transformée en une variable additive, en utilisant une fonction de cartographie. L'unité de mesure de la distance génétique entre deux locus est le centimorgan (cM). Un centimorgan correspond à la distance qui sépare deux locus entre lesquels l'espérance du taux de recombinaison est de 0,01. Deux formulations de la distance génétique existent :

- Distance de Haldane (1919) $m_H = 50 \text{ Log}(1-2r)$
- Distance de Kosambi (1944) $m_K = 25 \text{ Log} [(1+2r)/(1-2r)]$

Cette dernière prend en compte le phénomène d'interférence sur des grandes distances.

Avant de déclarer deux locus liés, un test statistique est nécessaire. Dans la pratique, on peut utiliser le test du χ^2 , qui permet en plus d'estimer les distorsions de ségrégation, mais le LOD score, dérivé des méthodes du maximum de vraisemblance, est le plus souvent utilisé.

a) *Test de la liaison entre deux locus par le test du χ^2*

Soient deux locus A et B ayant chacun deux allèles ($A_1 - A_2, B_1 - B_2$). En l'absence de liaison génétique et de ségrégation, les 4 génotypes possibles sont $A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1, A_2B_2$ en proportion théorique 1:1:1:1. En notant respectivement n_1, n_2, n_3 et n_4 les fréquences observées de chaque génotype, il est possible d'effectuer un test du χ^2 à 3 ddl, d'ajustement des fréquences observées aux fréquences théoriques.

La conclusion tirée d'un tel test peut cependant être ambiguë, car les écarts aux effectifs théoriques peuvent aussi être dûs à des distorsions de ségrégations à l'un ou l'autre des locus. Ce χ^2 peut alors se décomposer en trois tests à 1 ddl, deux pour tester la distorsion à chacun des locus, et le troisième pour tester la liaison entre les locus :

- ◆ distorsion de ségrégation au locus A : on teste $n_1+n_2=n_3+n_4$ contre $n_1+n_2 \neq n_3+n_4$
par un test $\chi^2_A = (n_1+n_2-n_3-n_4)^2/N$
- ◆ distorsion de ségrégation au locus B : on teste $n_1+n_3=n_2+n_4$ contre $n_1+n_3 \neq n_2+n_4$
par un test $\chi^2_B = (n_1+n_3-n_2-n_4)^2/N$
- ◆ liaison entre les deux locus : on teste $n_1+n_4=n_2+n_3$ contre $n_1+n_4 \neq n_2+n_3$
par un test $\chi^2_L = (n_1+n_4-n_2-n_3)^2/N$

NB : en cas de distorsions aux deux locus (et non pas un seul), le χ^2 de liaison peut être significatif même en l'absence de liaison réelle. En effet, dans ce cas, on aura forcément $n_1+n_4 \neq n_2+n_3$. Si la distorsion aux deux locus va dans le même sens (le même parent apporte les allèles sur ou sous-représentés), on observera une pseudo-liaison. Dans l'autre cas, on observera un taux de recombinaison supérieur à 0,5. Il faut alors utiliser un χ^2 d'ajustement des fréquences observées par rapport aux fréquences théoriques suivantes : abN , $a(1-b)N$, $(1-a)bN$ et $(1-a)(1-b)N$ respectivement pour A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 , et A_2B_2 , où a est la fréquence estimée de l'allèle A_1 et b est la fréquence estimée de l'allèle B_1 . Les fréquences théoriques peuvent en fait être calculées à partir des produits des fréquences alléliques au deux locus, puisque l'hypothèse H_0 est l'absence de liaison.

b) Test de la liaison entre deux locus par le LOD score

La façon la plus courante de tester une liaison entre deux locus est de calculer un rapport de vraisemblance, ou LOD score ("Likelihood of the Odds Ratio", ou logarithme du rapport des chances) (Morton, 1955).

Le calcul d'un maximum de vraisemblance pour estimer un taux de recombinaison repose sur le principe suivant : on considère que le résultat observé (ici les effectifs n_i des différents génotypes) est le plus probable étant donné la valeur du paramètre r que l'on cherche à estimer. On va chercher la valeur de r qui maximise la probabilité de la distribution des n_i , probabilité donnée par la loi suivante :

$$V = P(X_1=n_1, \dots, X_t=n_t) = [N! / \prod n_i!] \prod m_i^{n_i}$$

où N est l'effectif de la descendance, t le nombre de classes génotypiques et m_i l'effectif de la classe génotypique i (qui dépend de r).

Dans le cas qui nous intéresse où on a accès à la phase gamétique, on a $t = 4$ et

$$V(r) = [N!/\prod m_i][((1-r)/2)^{n_1+n_4}(r/2)^{n_2+n_3}]$$

Le LOD score se définit alors par

$$\text{LOD} = \log_{10}[V(r)/V(r_0)]$$

où $V(r)$ est la vraisemblance calculée avec la valeur la plus probable de r et $V(r_0)$ la vraisemblance calculée pour $r = 0,5$. Autrement dit, le LOD permet de comparer la probabilité d'observer les résultats réels sous l'hypothèse d'une liaison avec un taux de recombinaison estimé r , et la probabilité d'observer ce résultat sous l'hypothèse d'indépendance des locus. Ainsi, un LOD de 3 signifie que la liaison est 1000 fois plus probable que l'indépendance.

De nombreux logiciels existent qui permettent de construire des cartes génétiques. Nous avons utilisé le logiciel MAPMAKER (Lander *et al.*, 1987). Ce logiciel travaille de façon séquentielle. Dans un premier temps, il calcule les taux de recombinaisons et les LOD score de chaque couple de marqueurs possible. Il établit ainsi des groupes de liaisons. L'étape suivante consiste à déterminer l'ordre des marqueurs à l'intérieur de chaque groupe, en calculant le LOD score associé à chaque séquence possible, et à déterminer la séquence la plus probable.

C. RESULTATS

1. Ségrégations et liaisons

a) *Génotypes aberrants?*

Au locus *OeduB113*, deux individus présentent un allèle non attendu au regard des génotypes parentaux. Ils présentent le génotype 121/133 alors que les deux parents sont respectivement 131/137 et 121/137 (Figure IV-1). La première explication qui vient à l'esprit est celle d'un mélange de lots. En effet, la contamination de lots dans les écloséries de bivalves a été fréquemment évoquée pour expliquer des génotypes aberrants (voir notamment Foltz, 1986a ou McGoldrick & Hedgecock, 1997). La famille étudiée ici a été produite en même temps que 5 autres familles F2 du même type, et en même temps que des familles biparentales issues de populations naturelles de Normandie et de Charente-Maritime. Comme les fréquences alléliques dans ces populations pour ce locus sont inconnues, il est impossible de calculer les

probabilités de contamination par un génotype 121/133 par les populations naturelles. Cependant, ces deux individus ne présentent aucune aberration en ce qui concerne les autres locus. Il semble donc improbable que ces individus proviennent d'un mélange de lots. Par ailleurs, ces individus ont été analysés plusieurs fois pour écarter la possibilité d'une erreur de typage. Il semble ainsi que le parent 1, typé 131/137, ait transmis l'allèle 133. Un phénomène proche a pu être analysé par Bierne (1996) qui a étudié les ségrégations mendéliennes au locus *OeduO9*, et qui a observé qu'un parent typé 150/160 avait transmis à sa descendance un allèle 158. Cependant, dans ce cas, le nouvel allèle apparaissait systématiquement à la place de l'allèle 160 qui, lui, n'était jamais transmis. Sans écarter les possibilités d'artefacts techniques, Bierne propose l'hypothèse d'un animal mosaïque à ce locus, les cellules germinales portant l'allèle 158 alors que les cellules des branchies portaient l'allèle 160. Cette hypothèse semble difficilement applicable dans notre cas car le parent 1 a également transmis à sa descendance les 2 allèles attendus. En l'occurrence, l'hypothèse la plus probable pour expliquer cet allèle est celui d'une mutation. Cependant, l'allèle "nouveau" (133) apparaît de façon concomitante chez deux individus, ce qui peut faire penser à une mutation ponctuelle dans les cellules de la lignée germinale conduisant à une gonade chimère chez un des parents. Cela suppose un taux de mutation élevée pour le locus *OeduB113*, que l'on peut très grossièrement estimer par $2/244 = 8.10^{-3}$.

Au locus *OeduB11*, une proportion importante (33%) des individus présentent un génotype non attendu. Ils ont tous été génotypés comme 01/01 alors que les parents sont 03/03 et 01/03 respectivement (Figure IV-1). Ces individus ne présentent également aucune aberration aux autres locus étudiés.

Au vu du génotype des grands-parents "F0", on peut noter que la ségrégation des allèles à ce locus semble poser problème dès la génération "F1". En effet, les grands-parents ont été génotypés 01/01 et 01/03. Or, les génotypes 03/03 observés chez les parents "F1" ne peuvent pas s'expliquer si on admet que les grands-parents sont bien l'un homozygote pour l'allèle 01 et l'autre hétérozygote 01/03. L'explication la plus probable semble être celle de l'existence d'un allèle nul (voir Koorey *et al.*, 1993; Callen *et al.*, 1993). Si on admet que le grand-parent typé comme homozygote est en fait hétérozygote 01/00 (00 étant un allèle nul), alors les génotypes observés dans la descendance peuvent être interprétés ainsi : les individus typés homozygotes dans la "F1" (et notamment le parent 1 utilisé pour produire la F2) sont en fait hétérozygotes avec un allèle nul. Dans la population "F2", le génotype 01/01 qui apparaît serait donc alors en fait 01/00. Par contre, les individus typés 03/03 seraient en réalité soit effectivement

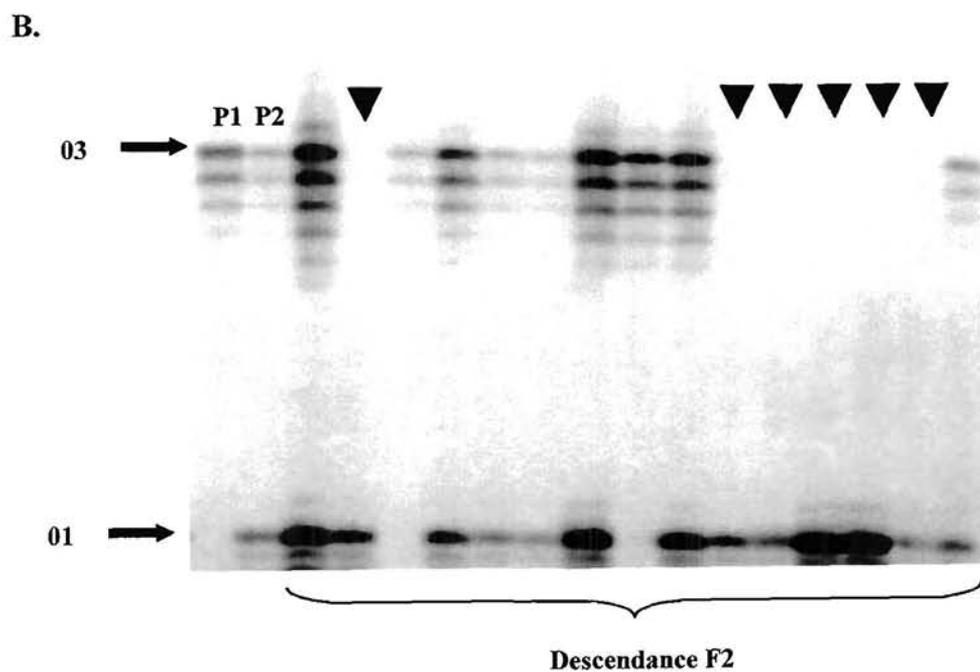
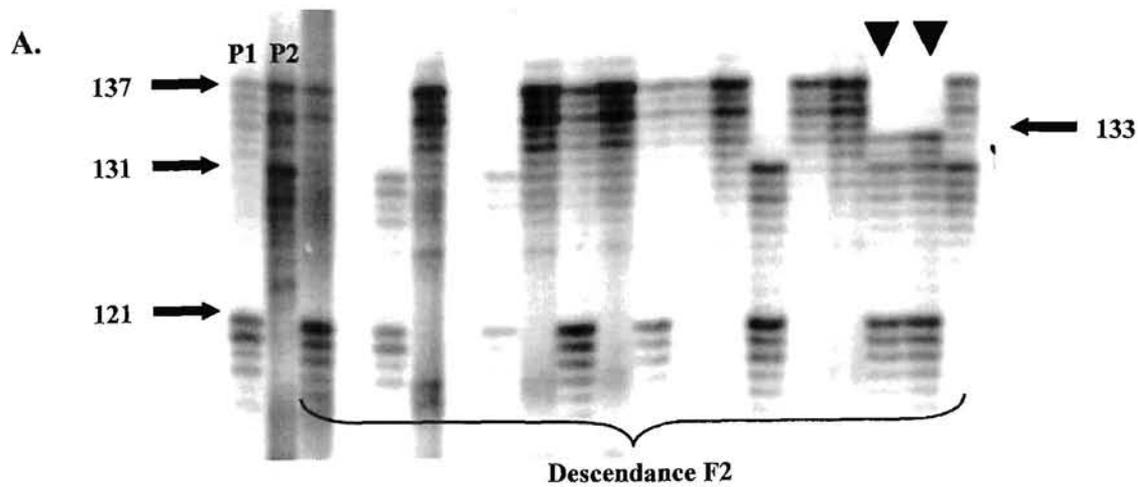


Figure IV-I: Génotypes non attendus aux locus *OeduB113* (A) et *OeduB11* (B)

P1 et P2 sont les parents de la descendance F2.

Les flèches → indiquent les allèles

Les triangles ▼ indiquent les génotypes non attendus

homozygotes, soit hétérozygotes 03/00, sans qu'il soit possible de distinguer les deux génotypes.

Si on suppose la présence d'un allèle nul en ségrégation, les génotypes observés dans la "F2" correspondent aux génotypes attendus dans la descendance de deux parents hétérozygotes ayant un allèle en commun (03/00 et 01/03). Cependant les fréquences des génotypes observés indiquent une légère distorsion de ségrégation ($p=0.042$).

b) *Ségrégations des locus microsatellites*

La conformation des fréquences génotypiques ne peut être déterminée pour le locus *OeduB11* en raison de l'importante proportion des individus présentant un génotype aberrant. En ce qui concerne le locus *OeduB113*, les deux individus présentant un allèle non présent chez les parents ont été écartés de l'analyse. Les résultats des tests de ségrégation sont présentés dans le Tableau IV-1.

Des distorsions de ségrégations génotypiques significatives apparaissent pour 4 locus microsatellites (*OeduH15*, *OeduG9*, *OeduT18* et *OeduB113*). Pour ces locus, il est possible de suivre les ségrégations alléliques chez chacun des deux parents. Dans tous les cas, les distorsions gamétiques sont beaucoup plus fortes chez le parent 1; chez le parent 2, seuls les locus *OeduH15* et *OeduB11* présentent des écarts significatifs à l'attendu mendélien. De plus, on observe pour le parent 1 un écart significatif aux fréquences alléliques attendues pour le locus *OeduC1* alors que les fréquences génotypiques chez la descendance à ce locus ne sont pas significativement différentes des fréquences attendues.

Tableau IV-1 : Distorsion de ségrégations gamétique et zygotique.

P = probabilité associée au test par χ^2 des fréquences génotypiques ou alléliques observées vs attendues. (en gras : probabilités significatives à 5%)

	Génotype des parents	Ségrégation zygotique			Ségrégation gamétique					
		Génotype	Nb	P	Parent 1			Parent 2		
					Allèles	Nb	P	Allèles	Nb	P
<i>OeduJ12</i>	230256	230230	32	0,765	230	66	0.365	230	62	0.856
	230254	230254	34		256	56		254	60	
		230256	30							
		254256	26							
<i>OeduU2</i>	160176	160182	24	0,468	160	56	0.413	176	53	0.173
	182190	160190	32		146	65		182	68	
		146182	29							
		176190	36							
<i>OeduH15</i>	173221	173173	7	9 10⁻⁰⁶	173	40	0.000	173	51	0.046
	173209	173209	33		221	82		209	71	
		173221	44							
		209221	38							
<i>OeduG9</i>	231239	239241	31	10⁻¹⁰	231	36	0.000	241	66	0.365
	241243	239243	55		239	86		243	56	
		231241	35							
		231243	1							
<i>OeduB0</i>	9398	9394	29	0,948	93	60	0.856	94	58	0.587
	9499	9399	31		98	62		99	64	
		9498	29							
		9899	33							
<i>OeduB11</i>	0303	0101	38	nd				01	72	0.005
	0103	0103	34					03	42	
		0303	42							
<i>OeduO9</i>	156168	156158	29	0,961	156	58	0.649	158	60	0.856
	158168	156168	29		168	63		168	62	
		158168	32							
		168168	32							
<i>OeduT5</i>	118128	106118	33	0,845	118	61	1	106	66	0.365
	106118	118118	28		128	61		118	56	
		106128	33							
		118128	28							
<i>OeduT18</i>	131143	121131	35	10⁻⁰⁵	131	42	0.000	121	70	0.084
	121129	121143	35		143	79		129	51	
		129131	7							
		129143	44							

Tableau IV-I (suite)

	Génotype des parents	Ségrégation zygotique			Ségrégation gamétique					
		Génotype	Nb	P	Parent 1			Parent 2		
					Allèles	Nb	P	Allèles	Nb	P
<i>OeduB113</i>	131137	121131	18	0,027	131	43	0,009	121	49	0.134
	121137	121137	31		137	71		137	65	
		131137	25							
		137137	40							
		121133	2							
<i>OeduC6</i>	0203	0102	33	0,905	02	61	0.783	01	63	0.649
	0102	0103	28		03	58		02	58	
		0202	28							
		0203	30							
<i>OeduC1</i>	0204	0202	37	0,098	02	67	0.029	02	62	0.217
	0208	0208	30		04	44		08	49	
		0204	25							
		0408	19							
<i>Idh-2</i>	100/100	90/100	60	1			90	60	1	
	90/100	100/100	60				100	60		
<i>EstD-3</i>	100/100	95/100	55	0.361			95	55	0.361	
	95/100	100/100	65				100	65		

2. Liaisons génétiques

Du fait des génotypes parentaux, les liaisons gamétiques ont pu être étudiées chez le parent 1 pour tous les locus microsatellites à l'exception du locus *OeduB11*, et chez le parent 2 pour tous les locus microsatellites et les deux locus allozymes, *Idh-2* et *EstD-3*.

a) Mise en évidence de liaison par le test du χ^2

Les résultats des tests de χ^2 sont présentés dans le Tableau IV-2.

Tableau IV-2 : Mise en évidence de liaison par le test du χ^2

	J12	U2	H15	G9	B0	B11	O9	T5	T18	B113	C6	C1	Idh-2	EstD-3
J12		0,198 ^{***}				x	0,132 ^{***}				0,134 ^{***}		x	x
U2	0,281 ^{**}					x	0,333 ^{***}				0,051 ^{***}		x	x
H15						x	0,388 [*]		0,223 ^{***}				x	x
G9						x							x	x
B0						x							x	x
B11		x	x	x	x								x	x
O9	0,147 ^{***}	0,364 ^{**}									0,306 ^{***}		x	x
T5													x	x
T18			0,215 ^{***}	0,380 ^{**}									x	x
B113												0,093 ^{***}	x	x
C6	0,207 ^{***}	0,125 ^{***}					0,271 ^{***}						x	x
C1										0,138 ^{***}			x	x
Idh-2						0,117 ^{***}								x
EstD-3						0,208 ^{***}							0,257 ^{***}	

"x" non testé
 * p<0,025
 ** p<0,005
 *** p<0,0005

Les résultats sont identiques pour les deux parents, à savoir qu'on trouve des déviations par rapport aux associations di-locus attendues pour les combinaisons suivantes:

- i) Toutes les paires de locus incluant *OeduJ12*, *OeduU2*, *OeduO9* et *OeduC6*; cependant la significativité du test est plus faible pour la combinaison *OeduU2/OeduO9*
- ii) *OeduH15/OeduT18*. Comme ces deux locus sont en distorsion de ségrégation gamétique pour le parent 1, nous avons calculé le χ^2 d'ajustement comme décrit au paragraphe B.3.b. Le test de liaison reste significatif ($p < 0.001$)
- iii) Toutes les combinaisons entre les locus *OeduB0*, *Idh-2* et *EstD-3* (qui n'ont pu être étudiées que chez le parent 2)
- iv) *Oedu.B113/Oedu.C1*

b) *Test des liaisons génétiques par le LOD score*

Après codage, les données ont été analysées à l'aide du logiciel MAPMAKER qui a identifié les groupes de liaison présentés sur la Figure IV-2 et la Figure IV-3.

Quatre groupes de liaison ont pu être mis en évidence. Les mêmes groupes de liaison ont été identifiés chez les deux parents et correspondent aux résultats mis en évidence par le test du χ^2 . L'ordre des locus est conservé chez les deux parents pour le groupe de liaison I qui compte plus de 2 locus. Par contre, les taux de recombinaison sont toujours plus élevés pour le parent 2, sauf pour le groupe III (*OeduH15/OeduT18*). Nous avons testé la différence des taux de recombinaison entre parents par un test χ^2 sur le nombre de gamètes recombinés/non recombinés. Aucun test n'est significatif sauf pour la distance entre *OeduU2* et *OeduC6* qui est significativement plus grande pour le parent 2.

Figure IV-2 : Groupes de liaisons mis en évidence pour le parent 1

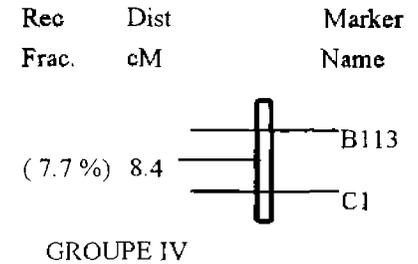
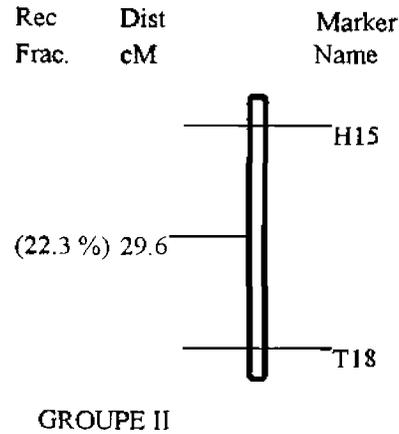
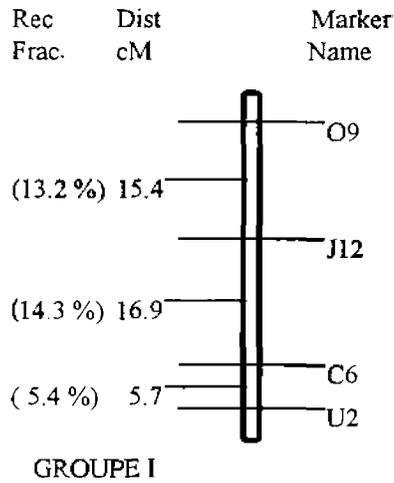
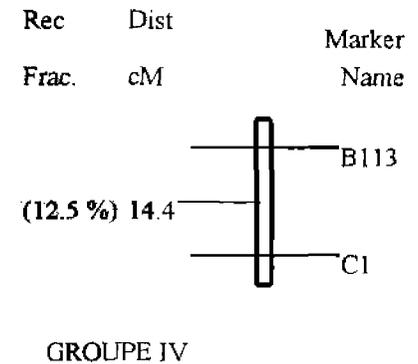
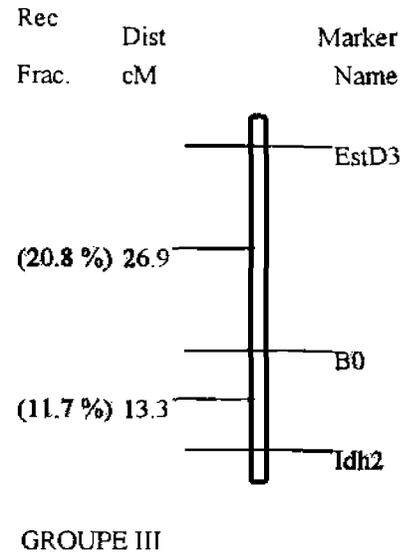
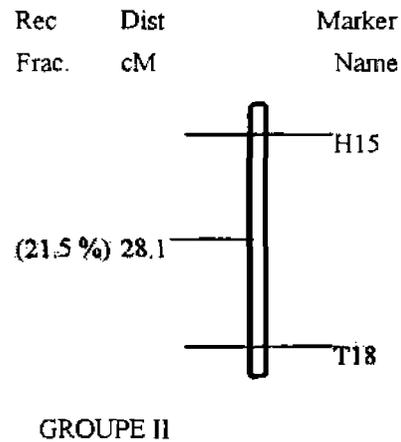
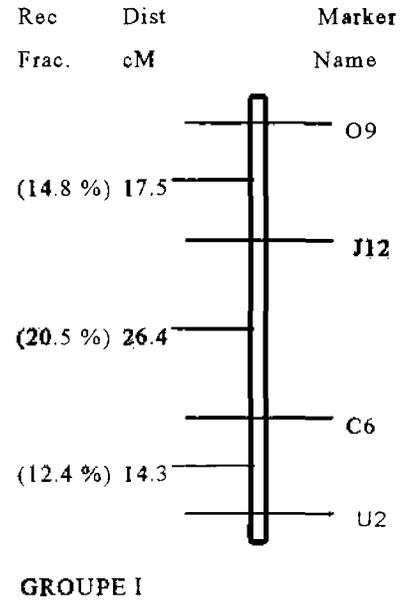


Figure IV-3 : Groupes de liaison mis en évidence pour le parent 2



D. DISCUSSION

Les résultats sont résumés dans le Tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Rappel des groupes de liaisons mis en évidence

Groupe de liaison	Locus		Distorsion de ségrégation		
			génomique	gamétique	
				Parent 1	Parent 2
Groupe I	<i>OeduO9</i>	P1 & P2	-	-	-
	<i>OeduJ12</i>		-	-	-
	<i>OeduC6</i>		-	-	-
	<i>OeduU2</i>		-	-	-
Groupe II	<i>OeduH15</i>	P1 & P2	***	***	* (0.046)
	<i>OeduT18</i>		***	***	-
Groupe III	EstD-3	P2	-	nd	-
	<i>OeduB0</i>		-	-	-
	Idh-2		-	nd	-
Groupe IV	<i>OeduB113</i>	P1 & P2	*	***	-
	<i>OeduC1</i>		-	*	-
Groupe V	<i>OeduG9</i>		***	***	-
Groupe VI	<i>OeduT5</i>		-	-	-
Groupe VII	<i>OeduB11</i>		nd	nd	**

1^{ère} colonne : nom du groupe de liaison

2^{ème} colonne : nom des locus dans l'ordre d'apparition sur la carte

3^{ème} colonne : Groupe de liaison mis en évidence chez le parent 1 (P1) et/ou le parent 2 (P2)

Colonnes 4 à 6 : probabilité du test du χ^2 de conformation aux fréquences zygotiques et gamétiques attendues (- : pas de distorsions, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, nd : non déterminé)

Quatre groupes de liaison contenant au moins 2 locus ont été mis en évidence, et trois autres locus n'ont été reliés à aucun groupe de liaison.

Des distorsions de ségrégations zygotiques sont observées pour 4 locus sur les 14 étudiés. Dans certains cas, ces distorsions sont liées à l'effet d'un seul parent: par exemple au locus *OeduB113*, les génotypes 121131 et 131137 sont sous-représentés dans la descendance, ce qui peut être expliqué par la faible fréquence de l'allèle 131 transmis par le parent 1. Par contre, des effets d'interaction sont évidents dans d'autre cas, par exemple au locus *OeduT18*, ou au locus *OeduG9*.

Des distorsions de ségrégations gamétiques sont observées pour le parent 1 essentiellement à 5 locus. Pour ce parent, nous avons identifié deux groupes de liaison (Groupe II et Groupe IV) où l'on observe des distorsions de ségrégation pour tous les locus du groupe. On a vu en

introduction que si deux locus subissaient des distorsions, on pouvait observer des pseudo-liaisons. Cependant, ces groupes identifiés semblent relativement solides puisque dans les 2 cas on retrouve le même groupe de liaison chez le parent 2 en l'absence de distorsions.

L'observation de distorsions de ségrégation dans la descendance de croisements biparentaux chez les bivalves a été fréquemment décrite (Wada, 1975; Beaumont *et al.*, 1983; Hvilsom & Theisen, 1984; Gaffney & Scott, 1984). Foltz (1986a), en étudiant la ségrégation de 11 locus allozymes dans 10 croisements biparentaux de l'huître creuse *Crassostrea virginica*, a trouvé de fortes distorsions de ségrégation pour 8 de ces 11 locus. Cependant, les résultats ne sont pas toujours cohérents pour différents croisements chez la même espèce. Ainsi, Beaumont *et al.* (1983) ont trouvé une déviation significative par rapport à l'attendu mendélien au locus *Pgm* chez *Mytilus edulis* dans un croisement, mais pas dans un autre qui partageait pourtant le même parent femelle. Gaffney & Scott (1984), dans 2 croisements biparentaux chez *Mulinia lateralis*, ont trouvé des déviations significatives pour 6 des 7 locus allozymes étudiés; cependant, dans les 6 cas, les deux croisements donnaient des résultats contradictoires d'un croisement à l'autre (si un croisement montrait une déviation significative par rapport aux proportions mendéliennes pour un locus, l'autre croisement donnait un résultat non significatif). Foltz (1986a) a étudié deux hypothèses possibles pour expliquer ces distorsions importantes. D'une part, les locus allozymes peuvent avoir directement un effet sur la ségrégation ou la survie larvaire; cependant, il rejette cette hypothèse dans le cadre de son étude car il n'observe pas de tendance vers un excès de génotypes hétérozygotes, alors qu'il observe des distorsions de ségrégation même quand tous les descendants ont un génotype hétérozygote. D'autre part, les locus allozymes peuvent être marqueurs de gènes ayant eux mêmes un effet sur la ségrégation ou la survie; cette hypothèse peut être compatible avec l'observation de l'auteur de l'absence de patrons de ségrégation consistants entre des mâles ayant le même niveau d'hétérozygotie.

Les résultats observés ici sont à rapprocher de l'étude de Bierne *et al.* (1997) qui est présentée en annexe A. Les ségrégations ont été analysées à l'aide de 4 marqueurs microsatellites, à savoir *OeduJ12*, *OeduO9*, *OeduT5* et *OeduB0*, sur les descendances de 2 croisements consanguins du même type que ceux présentés ici sauf que les grands-parents sont différents. Les résultats obtenus montrent l'existence d'importantes forces sélectives pouvant altérer les fréquences alléliques dès les stades précoces dans des croisements consanguins. Une hypothèse émise est l'existence dans le génome de l'huître plate de FAGs (Fitness-Associated Genes) en nombre suffisamment important pour qu'un marqueur microsatellite pris au hasard soit à

proximité d'un de ces gènes. Si les taux de recombinaison sont faibles chez *Ostrea edulis*, de grandes portions du génome deviendront homozygotes lors de croisements consanguins, révélant ainsi la présence de gènes délétères récessifs. Ces résultats sont compatibles avec les résultats de Foltz (1986) sur des croisements entre individus non apparentés, présentés plus haut, mais également avec les résultats de McGoldrick & Hedgecock (1996b) qui ont étudié les ségrégations et les liaisons entre 14 locus allozymes dans plusieurs croisements consanguins, et observent d'importantes distorsions de ségrégation, qui ne sont pas constantes d'une famille à l'autre. L'une des hypothèses qu'ils avancent est celle de superdominance associative où les locus étudiés seraient liés à des gènes délétères récessifs. L'autre hypothèse possible est celle d'une interaction épistatique entre les gènes eux-mêmes, hypothèse difficilement envisageable dans le cas des microsatellites.

Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que le groupe de liaison II (locus *OeduH15* et *OeduT5*) soit lié avec des allèles délétères rendus homozygotes sous l'effet de la consanguinité.

L'étude de Bierne *et al.* (1997) révèle également un déséquilibre de liaison entre les locus *OeduJ12* et *OeduO9* qui font partie ici du même groupe de liaison. Notons que ce groupe de liaison contient trois locus utilisables en routine, et utilisés comme tels au cours des autres chapitres de cette étude, *OeduO9*, *OeduJ12* et *OeduU2*.

CONCLUSION

Nous avons mis en évidence 28 nouveaux locus microsatellites et nous avons pu dessiner des amorces pour 24 d'entre eux. Le polymorphisme observé pour les 6 marqueurs d'ores et déjà utilisables en routine est suffisamment élevé pour en faire des outils de choix dans les programmes d'amélioration génétique d'une part et dans l'étude des populations sélectionnées d'autre part.

L'analyse de croisements consanguins a permis de montrer que la plupart des locus sont transmis de façon mendélienne; cependant, certains locus présentent des distorsions de ségrégation importantes. Une hypothèse possible est que ces locus co-ségrègent avec des allèles délétères récessifs qui se retrouvent à l'état homozygote dans des individus consanguins. Ces résultats confirment les résultats de Bierne *et al.* (1997).

Quatre groupes de liaison impliquant au moins 2 locus ont été identifiés chez l'huître plate. On a donc identifié 7 groupes de liaison contenant chacun au moins 1 marqueur, chez *Ostrea edulis* dont le génome est composé de $2N = 20$ chromosomes. Ce résultat est un résultat encourageant pour la poursuite de la cartographie génétique chez cette espèce. Ces résultats préliminaires sont cependant à compléter par des études sur d'autres familles.

Par contre, un marqueur moléculaire pour la résistance semble pour l'instant hors de portée. D'une part, le nombre de marqueurs disponibles reste limité. Mais surtout, il est difficile de caractériser avec précision le phénotype d'un individu pour le caractère "résistance" : en effet, il semble (voir Chapitre I) que l'on ait sélectionné plutôt pour une tolérance que pour une résistance; cela pose problème pour déclarer un individu "résistant". Inversement, et du fait notamment des problèmes pathologiques liés à l'*Herpes virus*, il n'est pas évident non plus de déclarer un individu "sensible".

Des pistes immédiates pour un marqueur de résistance sont plutôt à chercher dans la caractérisation des hémocytes comme nous l'avons vu au Chapitre I.

TROISIEME PARTIE

VARIABILITE GENETIQUE

DANS DES POPULATIONS

SELECTIONNEES ET SAUVAGES

D'OSTREA EDULIS

INTRODUCTION

L'amélioration génétique peut se définir comme la création par l'homme de variétés végétales ou animales adaptées à ses besoins ou à ses désirs. Il s'agit d'utiliser la variation génétique naturelle ou induite pour aboutir à des organismes plus efficaces ou mieux adaptés à leurs conditions d'utilisation.

Du point de vue de leur déterminisme génétique, deux types de caractères peuvent être distingués :

- caractères qualitatifs, déterminés par un nombre très restreint de gènes, dit "majeurs", pour lesquels il est possible de classer les phénotypes dans des catégories bien définies. Chaque gène ou combinaison de gènes a un effet important, d'où une variation discontinue (exemple : gène de sensibilité à l'halothane chez le porc, la plupart des résistances aux maladies chez les plantes)
- caractères quantitatifs, déterminés par un grand nombre de gènes à effet individuel indiscernable. Leur distribution est continue, compte tenu de l'intervention d'un grand nombre de gènes et de l'effet du milieu. La plupart des caractères économiques importants sont de ce type (exemple : le rendement chez les plantes, la production de lait chez les ruminants, ...)

La variabilité génétique d'un stock (végétal ou animal) peut être représentée par le nombre de combinaisons génotypiques présentes dans ce stock. L'amélioration par sélection va modifier les fréquences alléliques en retenant les allèles qui déterminent un phénotype désirable, et en excluant les allèles qui déterminent les phénotypes les moins intéressants. Dans le système de reproduction sélective, les "meilleurs" individus d'une population sont utilisés comme géniteurs et ceci mène à une amélioration du niveau moyen des individus de la génération suivante, à condition que la variation phénotypique des parents soit due essentiellement à des facteurs génétiques et non pas uniquement à des facteurs environnementaux. Choisir les meilleurs géniteurs implique une évaluation de leurs performances, ce qui va mettre en jeu tout une batterie de tests, portant soit sur l'individu lui-même, soit sur sa descendance ou ses collatéraux.

Le sélectionneur peut également utiliser le phénomène biologique de l'hétérosis. L'hétérosis peut se définir comme l'apparition chez les hybrides entre lignées isolées (en général, lignées

consanguines) de phénotypes plus performants que les lignées parentales (Shull, 1948). Synonyme alors de "vigueur hybride", l'hétérosis peut être considérée comme l'antithèse de la dépression de consanguinité. Deux théories tentent d'expliquer le phénomène d'hétérosis, qui partent toutes deux du principe que l'hétérosis est liée à l'hétérozygotie comme la dépression de consanguinité est liée à l'homozygotie (voir revue dans Charlesworth & Charlesworth, 1987). L'une des théories, dite de la superdominance, pose l'hypothèse que l'hétérozygotie en elle-même est bénéfique, et que la combinaison hétérozygote à un gène est toujours supérieure à n'importe quelle combinaison homozygote. L'autre théorie, dite de la dominance, pose l'hypothèse que les lignées hybrides possèdent un plus grand nombre d'allèles dominants bénéfiques que n'importe quelle lignée consanguine et que l'hétérosis est le résultat de l'addition d'un grand nombre d'effets favorables. L'hétérosis est lié au mode de reproduction. L'allogamie (fécondation croisée) permet le développement du fardeau génétique. Par fardeau génétique, on entend l'ensemble des allèles délétères masqués chez les hétérozygotes. Ce fardeau ne peut qu'augmenter au cours du temps, et donc chez les plantes allogames, il peut exister une fraction importante d'hétérosis fixable par la théorie de la dominance. En évitant le croisement entre apparentés, on diminue la probabilité de faire apparaître ces allèles défavorables à l'état homozygote et donc de créer une dépression de consanguinité. Notons que chez les organismes autogames, le fardeau génétique a disparu en grande partie. Ces organismes sont moins sensibles à la consanguinité, mais cela n'exclue pas l'existence d'hétérosis due à la superdominance.

Souvent, la domestication d'une espèce, en ne tenant pas compte de la diversité intraspécifique, n'exploite qu'une partie des potentialités génétiques de l'espèce. La description de la variabilité génétique d'une espèce donnée, en vue de sa domestication, est donc un élément important préalable à tout programme de sélection. Il est essentiel de connaître l'éventail des ressources génétiques disponibles dans le milieu naturel pour pouvoir sélectionner les meilleurs d'entre elles. De plus, toute sélection, même organisée de façon à gérer au mieux la variabilité génétique, est nécessairement orientée et par simple effet de dérive, conduit nécessairement à un appauvrissement du patrimoine génétique. Il est donc important que les ressources soient conservées et évaluées, afin de pouvoir faire face à un éventuel changement d'objectif.

Dans le cas particulier du programme de sélection d'*Ostrea edulis* pour la résistance à la bonamiose, le problème se pose de façon un peu différente, car le programme a été engagé sans connaissance a priori de la diversité génétique existante et sans contrôle du maintien de cette variabilité au cours des premières générations de sélection. La généalogie des individus est inconnue pour la première génération de la P89, et pour les deux premières générations de la P85. Ce travail intervient donc d'abord comme constat : peut-on, en analysant le polymorphisme aux locus microsatellites du matériel biologique présent, retracer l'histoire de ces populations, et notamment :

- estimer le nombre de géniteurs fondateurs à l'origine des lignées sélectionnées, et donc identifier d'éventuels goulots d'étranglement en estimant l'évolution des paramètres de la diversité génétique (richesse allélique, hétérozygotie) au cours des épisodes de sélection.
- caractériser les relations de parenté entre les individus à l'intérieur de chacune des lignées

Une faible variabilité génétique causée par un petit nombre de fondateurs entraînera une dérive génétique et donc la perte de certains allèles aux dépens de la fixation de certains autres. De plus, cela peut conduire à plus ou moins long terme à l'accumulation d'individus apparentés. Si il existe dans la population un certain fardeau génétique, le croisement entre apparentés, en créant des individus homozygotes pour les allèles défavorables, va entraîner la contre-sélection de ces individus, faisant disparaître les allèles délétères, mais également par effet d'auto-stop des allèles qui leur sont liés mais qui ne sont pas forcément défavorables.

Les théories développées sur les goulots d'étranglements montrent que les effets fondateurs doivent conduire à une réduction de l'hétérozygotie et une perte des allèles rares (Wright, 1931; Lewontin, 1965; Crow & Kimura, 1970; Lande, 1980). Nei *et al.* (1975) prédisent même que les goulots d'étranglements ont un effet beaucoup plus important sur la diversité allélique que sur l'hétérozygotie. Les conséquences attendues d'un effet fondateur seront donc particulièrement visibles sur des marqueurs neutres fortement polymorphes, tels des microsatellites. Les études faites jusqu'alors portaient surtout sur des marqueurs allozymes, peu polymorphes, et sensibles au phénomène d'evenness (nivellement des fréquences alléliques du fait de la dérive), et éventuellement sensibles à la sélection, dans le cas où les hétérozygotes sont avanta-gés.

Ensuite, le deuxième niveau d'intervention de ce travail sera d'offrir des pistes pour la poursuite du programme, et notamment de s'interroger sur la nécessité d'introduire du "sang neuf" dans les populations sélectionnées. De plus, au delà du programme de sélection pour une résistance à la bonamiose, il existe une importante prise de conscience européenne visant à tester des souches d'huîtres plates d'origines différentes pour leurs performances de croissance et leur sensibilité à la bonamiose, et un projet européen impliquant notamment l'Irlande, l'Espagne et la France est en cours d'élaboration pour évaluer l'existence d'adaptation locale des populations d'huître plate vis-à-vis de paramètres environnementaux et vis-à-vis de *Bonamia ostreae*. Afin de tirer au mieux partie des ressources génétiques disponibles pour la culture directe et les programmes de sélection, il est nécessaire de définir une stratégie d'échantillonnage basée sur les critères suivants:

- - structuration géographique de la diversité génétique déterminée par des marqueurs neutres,
- - adaptation physiologique aux conditions de milieu de la zone d'origine,
- - niveau de sensibilité à la bonamiose, en relation avec le niveau de prévalence de *Bonamia ostreae* dans la zone d'origine.

Le premier de ces trois points a été étudié dans le cadre de cette thèse.

V. VARIABILITE GENETIQUE DANS DES POPULATIONS D'HUITRE PLATE

A. INTRODUCTION : PROGRAMME DE SELECTION POUR LA RESISTANCE A *BONAMIA OSTREAE*

Afin de préciser le matériel biologique utilisé dans ce chapitre, nous allons d'abord donner l'historique et les premiers résultats du programme (voir Naciri-Graven *et al.*, 1997). On peut se reporter à la Figure I-7 (Chapitre I) qui résume l'historique du programme jusqu'en 1994.

Deux populations sélectionnées ont été produites à partir d'animaux âgés originaires de la Baie de Quiberon, et supposés avoir survécu à la maladie. L'une a été sélectionnée depuis 1985 (P85) et l'autre depuis 1989 (P89). Jusqu'en 1990, les lots témoin utilisés pour tester l'avancée de la sélection étaient constitués d'animaux de même âge collectés en Baie de Quiberon et appelés "Quiberon sauvage". Après 1990, les lots témoins ont été produits en éclosérie en même temps que les nouvelles générations de sélection et appelés "témoin Quiberon".

1. Première population sélectionnée (P85)

Comme nous l'avons vu, les mortalités importantes dues à *Bonamia ostreae* apparaissent en général au cours du 2^{ème} été. En conséquence, la première génération de la population 85 (P85-G1) a été produite à partir d'animaux âgés d'au moins 4 à 5 ans, et censés avoir résisté à la maladie. Cette P85-G1 a été produite par ponte en masse, impliquant une centaine de géniteurs, à l'éclosérie de la SATMAR (Normandie). Le nombre de pontes recueillies n'est pas connu, cependant il est vraisemblable qu'il ait été faible, voir même réduit à une seule ponte. Le naissain a été subdivisé en 4 lots envoyés en 4 sites différents où la présence de *Bonamia* était connue (Paimpol, Baie de Quiberon, Rivière de Penzé, Golfe du Morbihan). Le niveau de résistance a été testé à Penzé entre février 1988 et mars 1989. La survie de P85-G1 était significativement meilleure que celle du témoin Quiberon sauvage (59% contre 33% respectivement, $p < 0.001$) mais aucune différence significative dans la prévalence du parasite n'a pu être détectée (22% et 20% pour P85-G1 et Quiberon respectivement, $p > 0.05$). Par prévalence, on entend la détection de parasites dans des animaux vivants. La technique de purification du parasite ayant été mise au point à cette époque (Miahle *et al.*, 1988; Hervio *et*

al., 1995), une inoculation du parasite purifié a pu être effectuée, pour la première fois, sur une partie des animaux de cette génération (lot de la baie de Quiberon).

En 1990, des animaux de chaque origine géographique ont été croisés entre eux en éclosérie (La Tremblade) et trois pontes ont été recueillies pour chaque lot. Pour certains d'entre eux, ces pontes ont été recueillies à des intervalles de temps très faibles, voire le même jour, ce qui peut faire suspecter qu'il s'agit en fait d'une seule ponte. Le naissain P85-G2 a été élevé en deux lieux différents (La Trinité et Quiberon) et le niveau de résistance testé à Quiberon entre février 1992 et novembre 1993. En moyenne, la survie était meilleure pour la P85-G2 que pour le témoin Quiberon (44% contre 29%, $p < 0.05$) mais les cohortes produites par les animaux non inoculés (en Baie de Quiberon: 55%, $p < 0.001$; Paimpol : 45%, $p < 0.01$) étaient meilleures que les cohortes produites par des animaux inoculés (33%, $p > 0.05$). Les données de prévalence ne sont pas disponibles pour cette génération.

Une troisième génération a été produite en 1993 et testée en milieu naturel de juillet 1993 à mars 1995. Les animaux survivants ont été ensuite suivis en salle de quarantaine à La Tremblade entre mars et septembre 1995. La survie de la P85-G3 s'est révélée être 4 fois supérieure à celle du témoin après 20 mois en milieu naturel (59% contre 13.5%), et des différences significatives en prévalence de parasite ont également été observées (22.7% pour P85-G3 contre 48.9% pour le témoin). L'expérience a été arrêtée alors que les animaux âgés de 24 mois avaient subi 2 cycles d'infestation par *Bonamia ostreae*, et le faible taux de survie du témoin suggère que l'infestation a été effectivement forte.

2. Deuxième population sélectionnée (P89)

En 1987, des animaux sauvages de la Baie de Quiberon ont été récoltés et une partie d'entre eux ont été inoculés. A partir de ces animaux, la première génération (P89-G1) s'est faite en 1989 par ponte en masse en éclosérie (La Tremblade) et le grossissement s'est effectué en Baie de Quiberon dans deux conditions différentes: semis et poches. Notons que la P89-G1 est en fait constituée de deux sous-populations, l'une issue de géniteurs inoculés (P89i) et l'autre issue de géniteurs non inoculés (P89ni).

La résistance a été testée deux fois : dans le milieu naturel et en conditions contrôlées en salle de quarantaine après inoculation du parasite purifié (Martin *et al.*, 1993). La survie de la P89-G1 était meilleure que celle du témoin éclosérie dans les 2 cas (94 et 72%, $p < 0.001$

respectivement pour P89-G1 et 66 et 48% pour le témoin Quiberon). Dans le milieu naturel, une différence significative de prévalence du parasite a été observée entre P89-G1 et le témoin (respectivement 2 et 20%, $p < 0.01$), différence qui n'a pas été retrouvée lors du test par inoculation (32% contre 33%, $p > 0.05$).

En 1992, une deuxième génération (P89-G2) a été produite, toujours par ponte en masse, à partir d'individus G1 inoculés (P89i-G2I) et non inoculés (P89-G2W). La résistance a été testée en Baie de Quiberon entre février 1993 et septembre 1994. La P89-G2 n'a pas montré de différences significatives avec son témoin, ni en terme de survie (49.7% contre 48.3%) ni en terme de prévalence du parasite. Ceci peut être expliqué par différents facteurs :

- l'expérience a été arrêtée avant la fin du deuxième cycle d'infestation, et les taux de survie enregistrés sont probablement sous-estimés. Cette hypothèse est notamment confortée par le fort taux de survie du témoin.
- Une baisse de performance en deuxième génération a également été trouvée dans la P85 et ceci suggère l'existence d'une dépression de consanguinité ou d'effets d'auto-stop associés aux fortes pressions de sélection (Naciri-Graven *et al.*, 1997). En effet, du fait des techniques de production des premières générations, il est possible que celles-ci descendent d'un nombre limité de parents. Cette dernière explication suggère l'existence d'un fardeau génétique important chez cette espèce, ce qui a été confirmé par une récente étude menée au laboratoire sur des croisements consanguins (Bierne *et al.*, 1997, voir annexe A).

3. Croisements entre populations sélectionnées

Naciri-Graven *et al.* (1997) rapportent les performances, aussi bien en survie qu'en croissance, d'un croisement entre les générations P85-G2 et P89-G1. Ce croisement a été l'occasion de la mise au point au laboratoire de la technique de croisement biparental. Les résultats obtenus pour ce croisement étaient très semblables à ceux de la P85-G3, avec une survie plus de deux fois supérieure à celle du témoin correspondant (39.4% contre 16.1%, $p < 0.001$).

Les croisements biparentaux semblant alors au point, il a été décidé en 1995 de refaire les générations de sélection P85-G3 et P89-G2 avec, cette fois-ci, contrôle des croisements, ceci dans le but de maximiser la base génétique des populations sélectionnées.

Lignée 85

Lignée 89

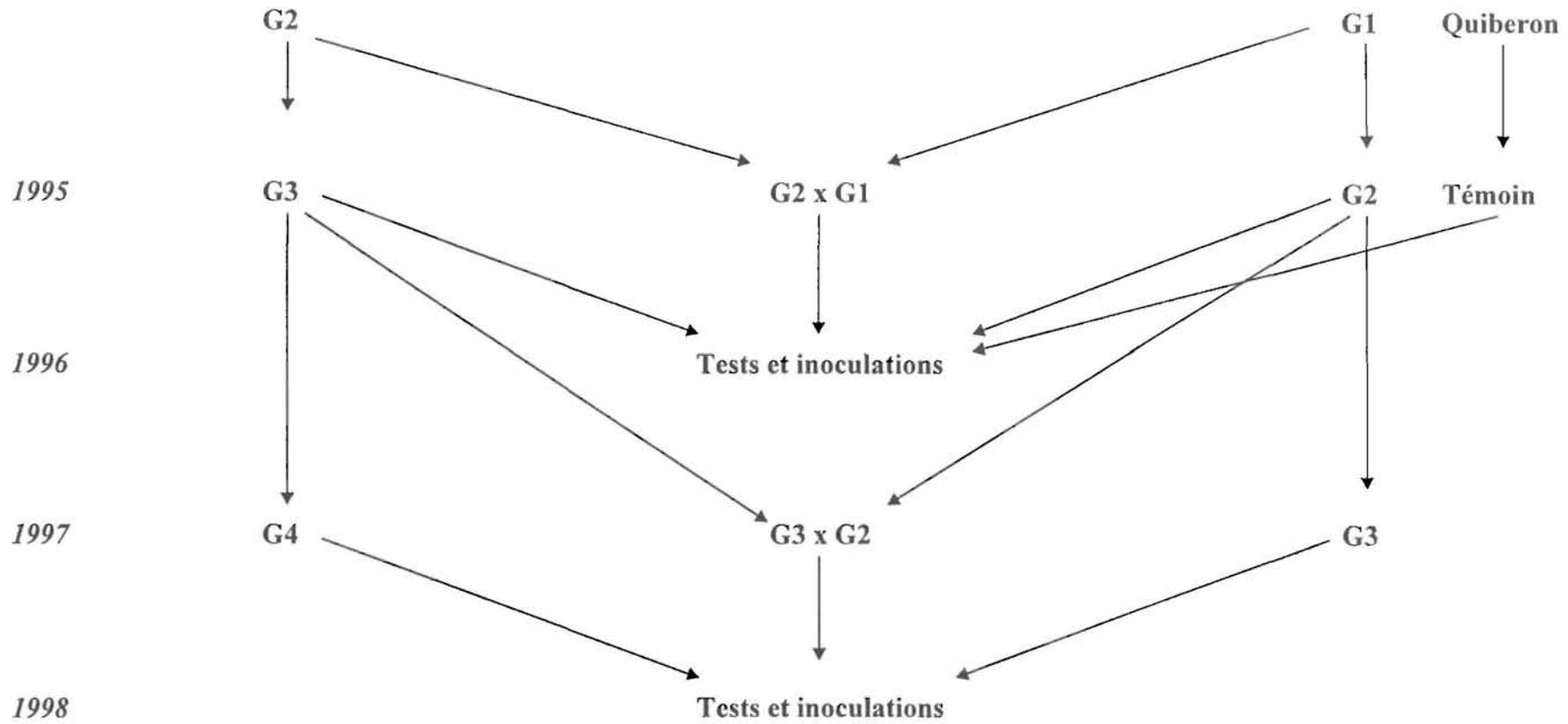


Figure V-1 : Schéma prévisionnel à partir de 1995 pour le programme de sélection d'*Ostrea edulis* pour la résistance à *Bonamia ostreae*

B. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

a) Production 1995

Le schéma de sélection adopté en 1995 est résumé sur la Figure V-1 : production des nouvelles générations interpopulations et intrapopulations par croisements de type plein-frères, test de croissance et de résistance au cours de la deuxième année ce qui devait finalement permettre un cycle de sélection sur 2 ans.

Les animaux, placés deux par deux dans des aquariums, ont été soumis à une maturation forcée, à une température de 18 à 20 degrés. Un essai de photopériode progressive a été tenté en diminuant la durée de la nuit de 14 à 9 heures (avec diminution d'un quart d'heure tous les deux jours). La maturation a été avancée dans la saison pour tenter de s'affranchir des problèmes d'infestation virale (*Herpès virus*) dont l'écloserie a été victime en 1994.

En 1995, plusieurs populations ont été produites:

① Les nouvelles générations de chacune des populations 85 et 89 (à raison de trente familles de plein-frères pour chaque) :

* 3ème génération (G3) pour la population 85,

* 2ème génération (G2) pour la population 89.

② Les animaux ayant pondu ont ensuite été recroisés pour produire une génération interpopulation (G1 x G2). Vingt familles de ce type ont été produites. Ces populations permettront d'estimer un éventuel effet d'"hétérosis" par comparaison avec les familles intrapopulations de même âge (G3 pour la population 85 et G2 pour la population 89). Notons qu'il ne s'agit pas ici d'un vrai effet d'hétérosis au sens habituel du terme puisque l'hétérosis suppose une comparaison des performances des descendants par rapport à celles des lignées parentales.

③ Vingt familles témoins de plein-frères ont également été produites, à partir d'individus issus de captage dans le milieu naturel (Station IFREMER de La Trinité sur Mer). Le lot témoin était constitué pour 27% d'individus captés en 1990 et 1991 (54 et 42 mois),

26% d'individus captés en 1992 (30 mois) et 47% d'individus captés en 1993 (18 mois), et représentait la population naturelle de la Baie de Quiberon au moment de l'échantillonnage.

b) Animaux utilisés dans les études de variabilité génétique dans les populations sélectionnées

Les études de variabilité dans les populations sélectionnées ont porté sur les animaux des populations dont sont issus les géniteurs utilisés en 1995, et les effectifs sont présentés dans le Tableau V-1. Il s'agit des individus ayant effectivement pondu, mais aussi d'individus n'ayant pas contribué aux nouvelles générations. Quarante-deux individus issus de la P85-G2 et 90 issus de la P89-G1 ont été analysés. Nous avons distingué pour la P85 les origines géographiques Paimpol, Quiberon, Trinité, mais rappelons que c'est la même population de départ qui a été scindée et élevée en différents lieux. La mention "Quiberon inoc" caractérise les individus descendant de parents ayant subi une sélection par inoculation du parasite. Par contre, pour la P89, les deux sous-populations "inoc" (issue de parents inoculés") et "non-inoc" (issue de parents non-inoculés) ne sont pas issues de la même ponte.

Tableau V-1. Effectifs utilisés pour le génotypage des populations sélectionnées.

Origine	Effectif étudié	Dont effectif ayant participé à la production des familles de plein-frères en 1995
P85-G2		
Paimpol	15	14
Quiberon non-inoc	21	16
Trinité	4	4
Quiberon Inoc	2	2
P89-G1		
inoc	38	28
non inoc	52	35
Population X	12	8
Population Y	13	7
Total	157	114

Au cours des générations de sélection massale, les huîtres ont été placées en poches sur de nombreux sites pendant 5 ans. Certaines étiquettes ont été perdues, et deux lots différents,

dont l'identification avait été égarée, ont été renommés X et Y. Ces animaux, soupçonnés d'appartenir à la P85, ont contribué aux pontes de 1995, et l'un des buts de ce travail était aussi de tenter de retrouver l'origine de ces lots.

Les animaux ayant effectivement pondu ont été biopsés dès que possible après la ponte par anesthésie et prélèvement d'un fragment de branchies. Les autres ont été biopsés à l'arrêt de l'expérience. Certains individus ayant contribué à la production des nouvelles générations sont morts avant la biopsie.

La population témoin utilisée dans cette étude est constituée de 49 individus captés en Baie de Quiberon en 1993.

2. Génotypage

Quel que soit le mode de conservation des tissus (dans l'alcool ou congelé), la méthode du Chelex® a été utilisée pour l'extraction d'ADN (voir Chapitre III et Annexe D).

Le typage a été effectué à l'aide de 5 locus microsatellites (*OeduJ12*, *OeduT5*, *OeduH15*, *OeduU2* et *OeduO9*) dont les caractéristiques sont présentées au chapitre III. Les protocoles d'amplification par PCR, de migration des produits d'amplification par électrophorèse et de visualisation des résultats sont analogues à ceux présentés dans le chapitre III (voir aussi Annexe D).

3. Analyses génétiques

a) Estimation du nombre de géniteurs à l'origine des lignées sélectionnées.

Les populations sélectionnées ont initialement été obtenues en recueillant un petit nombre de pontes spontanées d'un bac unique contenant d'une cinquantaine à une centaine d'individus sauvages, donc supposés non apparentés. On sait que les huîtres creuses ont un comportement de pontes groupées, l'expulsion des gamètes d'un individu déclenchant celle des gamètes de tous les individus matures du bac. La ponte obtenue constitue alors une bonne représentation de la diversité génétique du groupe de géniteurs. Ce n'est cependant pas le cas de l'huître plate (voir par exemple Saavedra & Guerra, 1996). En ne recueillant que quelques pontes, on n'a pas la certitude que tous les géniteurs ont contribué génétiquement à la génération suivante. Il

s'ensuit que nos populations en sélection peuvent potentiellement être issues d'un nombre réduit de géniteurs, et ne pas constituer une base génétique compatible avec la poursuite d'un programme de sélection.

L'effectif efficace (N_e) d'une population d'aquaculture est un paramètre très important à connaître pour une bonne gestion des géniteurs, mais cela peut être un paramètre délicat à mesurer. Les progrès zootechniques permettent maintenant de maintenir des populations vraiment fermées, c'est à dire sans intervention de géniteurs issus du milieu naturel ou d'un autre stock captif. C'est particulièrement le cas du programme de sélection présenté plus haut, où l'étude de la dérive génétique et de l'évolution de la consanguinité est cruciale. Bien que présentant souvent des fécondités élevées, les animaux aquatiques peuvent présenter des différences importantes de fertilité et il a été souvent observé que lors de reproduction en éclosion, seuls un nombre réduit d'animaux contribuent effectivement à la génération suivante (Lannan, 1980; Alvarez *et al.*, 1989; Gile & Ferguson, 1990, Gaffney *et al.*, 1992). Des estimations de l'effectif efficace N_e pour des populations d'aquaculture semblent effectivement montrer que les populations aquacoles fermées sont de petites populations où la dérive génétique peut donc jouer un rôle très important (Sbordoni *et al.*, 1986; Hedgecock & Sly, 1990; Hedgecock *et al.*, 1992; Saavedra & Guerra, 1996). Une dérive génétique importante dans des populations de faible taille efficace peut conduire à une quantité de diversité génétique incompatible avec la poursuite efficace de la sélection.

De nombreuses études de la variabilité génétique et de son évolution dans des populations en sélection reposent sur l'analyse d'informations issues de la connaissance du pedigree. Ainsi, l'évolution de la consanguinité au cours de générations successives est-elle un outil très utilisé pour quantifier l'importance de la dérive génétique. Cette méthode repose sur la relation qui existe entre l'augmentation de la consanguinité et la réduction de hétérozygotie à un locus donné dans une population non-sélectionnée et panmictique (Wright, 1931). Une autre méthode est d'analyser la probabilité d'origine des gènes (James, 1972; Vu Tien Khang, 1983), c'est à dire la contribution génétique de chaque fondateur à la population actuelle. Boichard *et al.* (1997) ont défini une approche complémentaire prenant en compte d'éventuels goulets d'étranglement dans la population. Ces approches demandent cependant un minimum d'information sur la généalogie, sachant qu'un "fondateur" est défini par les auteurs

précédemment cités comme "un ancêtre de parents inconnus", information qui n'est pas disponible pour les populations du programme de sélection.

En l'absence d'informations généalogiques, nous avons utilisé différentes méthodes pour estimer le nombre de géniteurs fondateurs à l'origine des lignées sélectionnées :

(1) Détermination directe des génotypes fondateurs

La méthode la plus simple pour déterminer le nombre de géniteurs fondateurs repose sur l'observation directe des génotypes et la détermination empirique du génotype des fondateurs. Pour la P89, ce sont les individus directement issus du croisement des fondateurs sauvages qui ont été analysés. Chaque fondateur apportant une combinaison d'allèles qui lui est spécifique aux différents locus, il est possible de retrouver cette combinaison au sein de ses descendants. En pratique, plus il y a de fondateurs et plus ils portent d'allèles communs, plus il faut disposer de locus pour reconnaître leurs contributions dans le génome de leurs descendants. Cependant, le polymorphisme révélé par les microsatellites semblent suffisamment important (voir le chapitre III) pour espérer repérer les génotypes des fondateurs même avec un nombre réduit de locus. Pour la P85 en revanche, tous les gènes apportés en première génération par les fondateurs ont été rebrassés à la deuxième génération, et cette méthode devrait s'avérer plus complexe à utiliser. De plus, cette méthode n'est efficace que si l'on a génotypé suffisamment d'individus d'un croisement donné.

(2) Changement temporel des fréquences alléliques

La méthode dite "temporelle" utilisant les changements temporels des fréquences alléliques dans des générations successives pour estimer les tailles de populations a connu un succès récent (Krimbas & Tsakas, 1971; Begon *et al.*, 1980; Nei & Tajima, 1981; Pollack, 1983, Tajima & Nei, 1984; Waples, 1989). Cette méthode utilise le concept suivant : le changement des fréquences alléliques au cours du temps sous l'effet de la dérive permet d'estimer la taille efficace d'une population, à partir de l'observation des variances temporelles des fréquences alléliques pour des locus sélectivement neutres.

Hedgecock & Sly (1990) puis Hedgecock *et al.* (1992) ont utilisé cette méthode pour estimer la taille efficace de plusieurs populations d'aquaculture (bivalves et crustacés) et ont développé un programme ("EPS") qui a été utilisé ici.

En pratique, on estime les fréquences alléliques et un estimateur de F , variance temporelle des fréquences alléliques, standardisé pour compenser les différences entre locus pour les fréquences alléliques. Plusieurs estimateurs de F ont été proposés et ont été testés lors de simulations (Waples, 1989). L'estimateur utilisé ici, \hat{F}_k , est celui de Pollack (1983) pour les locus ayant plus de trois allèles, :

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

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

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

En théorie, pour les espèces aquatiques, l'estimation des fréquences alléliques se fait avant la reproduction et indépendamment de la sélection ultérieure des individus reproducteurs. En conséquence, la valeur attendue de la variance, $E(\bar{F})$, est approximativement égale à :

$$E(\bar{F}) \approx t/(2Ne) + 1/(2S_0) + 1/(2S_t) \quad (2)$$

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

D'après (2), on obtient un estimateur de la moyenne harmonique de la taille efficace de la population sur l'intervalle de temps considéré :

$$\hat{N}_k = \frac{t}{\bar{F} - 1/(2S_0) - 1/(2S_t)} \quad (3)$$

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

On ne dispose pas ici directement des populations d'origine des lignées sélectionnées. Dans un premier temps, on a considéré que la population actuelle de la Baie de Quiberon est représentative de cette population d'origine.

Le programme utilisé pour ces calculs n'accepte pas plus de 15 allèles par locus. Or (voir plus loin), nous n'avons pas observé plus de 15 allèles dans les populations sélectionnées. En

conséquence, nous avons décidé, pour la population naturelle, plutôt que de regrouper des allèles (par exemple certains allèles qui étaient présents dans la population d'origine et pas dans la population sélectionnée), de supprimer certains allèles des calculs (ceux présents dans la population d'origine en faibles fréquences).

(3) Bootstrap

Nous avons par ailleurs développé une méthode d'estimation du nombre de géniteurs efficaces dans une population ayant subi un goulot d'étranglement, se traduisant notamment par la baisse du nombre d'allèles. Cette méthode est basée sur l'estimation par bootstrap du nombre d'individus associés à une richesse allélique donnée.

Cette méthode consiste à évaluer la diversité allélique en fonction du nombre d'individus inclus dans un échantillon en utilisant la technique du bootstrap. Dans une population d'effectif N , on effectue successivement k tirages avec remise d'un échantillon de taille p individus, p variant de 0 à N . A chaque étape, la moyenne et la variance du nombre d'allèles pour un effectif p donné sont calculées. On obtient ainsi une courbe représentant le nombre d'allèles attendu (N_a) en fonction de l'effectif d'un sous-échantillonnage de la population (N_i).

Il est possible de modéliser cette courbe par une équation du type $N_a = C.(1-e^{-kN_i})$. Les paramètres C et k ont été évalués à l'aide de la procédure "proc nlin" du programme SAS.

Inversement, on peut inférer un effectif théorique à partir d'un nombre d'allèles observés. Ainsi, en fonction du nombre d'allèles observés dans les populations sélectionnées, on peut évaluer la taille d'un sous-échantillonnage de la population d'origine qui aurait la même diversité allélique. On a ainsi une estimation du nombre de fondateurs efficace N_i . (Voir Figure V-2). Un intervalle de confiance à 95% pour N_i peut être déterminé d'après la distribution du nombre d'individus correspondant à une fréquence allélique donnée, distribution générée par le bootstrap.

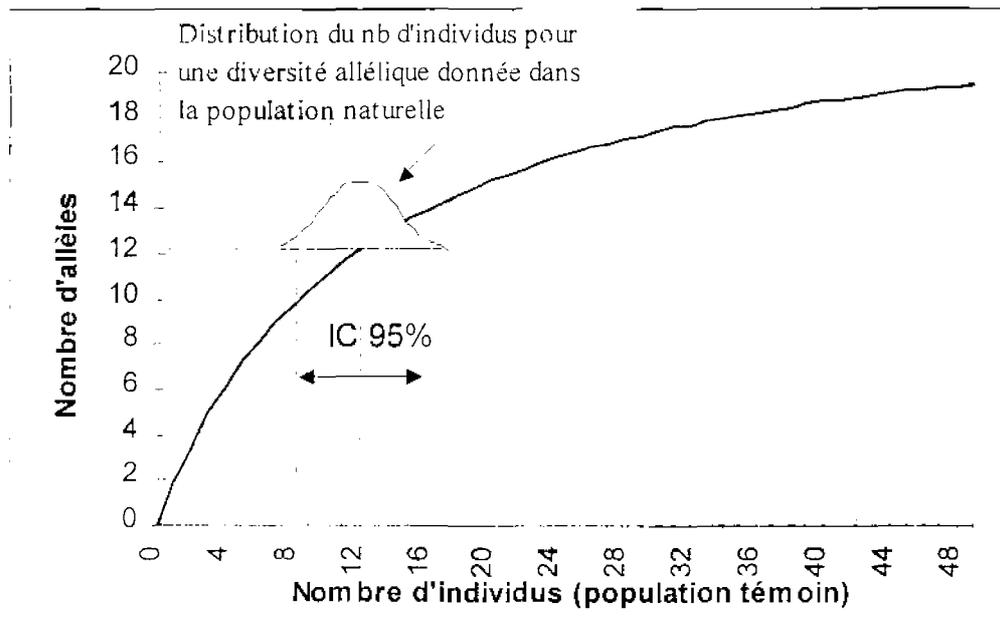


Figure V-2. Exemple d'évaluation du nombre de géniteurs fondateurs dans une lignée sélectionnée par bootstrap en comparaison avec une population naturelle. Pour un nombre d'allèles donné, on peut déterminer le nombre moyen d'individus qui expliquerait cette diversité allélique, ainsi qu'un intervalle de confiance à 95%.

b) Identité génétique

La question de l'apparentement en génétique des populations a connu un essor récent, grâce aux progrès de la biologie moléculaire. L'utilisation de marqueurs hautement polymorphes tels que mini ou microsatellites a permis de développer des techniques pour estimer l'apparentement de deux individus pris au hasard dans une population. Différents modèles ont représenté en fait la fraction du génome des deux individus qui est identique par descendance.

Le modèle de base d'estimation de l'identité se définit par rapport à des génotypes du type RFLP où chaque individu est caractérisé par un certain nombre de bandes après digestion de l'ADN par une ou plusieurs enzymes de restriction et hybridation avec une sonde marquée. L'identité entre deux individus peut s'estimer par le nombre de bandes en commun (Lynch, 1988) et on peut utiliser l'expression proposée par Nei & Li (1979) :

$$I_{ab} = \frac{2n_{ab}}{n_a + n_b} \quad (4)$$

où n_{ab} est le nombre de bandes communes entre les individus a et b , et n_a et n_b le nombre de bandes de a et b respectivement. I_{ab} défini ainsi varie entre 0 (pas de bandes en commun) et 1 (toutes les bandes en commun).

Nous avons choisi de travailler avec un indice d'identité génétique entre individus défini par Mathieu *et al.* (1990) de la façon suivante :

$$I(X,Y) = \frac{[\sum_j [\sum_i P_{ijx} \cdot P_{ijy} / \sum_i F_{aij}^2]]}{\sum_j \frac{1}{\sum_i F_{aij}^2}} \quad (5)$$

où : - X et Y sont deux individus d'un échantillon,

- P_{ijk} est la probabilité de tirer l'allèle i au locus j chez l'individu k,

- F_{aij} est la fréquence du i^{ème} allèle au j^{ème} locus dans l'échantillon étudié,

$I(X,Y)$ représente ainsi la probabilité de tirer deux allèles identiques chez X et Y pondérée par l'homozygotie à chaque locus. Cet indice tient compte non seulement des allèles communs entre deux individus, mais également de l'environnement génétique. La proximité génétique entre deux individus est d'autant plus forte qu'ils ont des allèles en commun et qu'ils ont des allèles différents des autres individus de la population. Cet indice semble adapté à l'identification de groupes d'individus proches au sein d'une population composée de plusieurs sous-populations ou familles.

c) Variabilité génétique

Pour chaque population (P85, P89i, P89ni et témoin), le nombre d'allèles pour chaque locus (N_a) et le nombre moyen d'allèles par locus (N_{am}) ont été calculés.

Pour chaque population, nous avons estimé :

- l'hétérozygotie observée H_o (proportion des individus hétérozygotes à un locus)
- la diversité génique non biaisée H_{nb} de Nei (1978). Cette estimation de l'hétérozygotie théorique moyenne attendue sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg est corrigée pour les biais liés à la taille de l'échantillon. Elle se définit comme suit :

$$H_{nb} = 2N \sum (1-p_i^2)/(2N-1) \quad (6)$$

où N est la taille de l'échantillon et p_i la fréquence au i^{ème} allèle.

- Les hétérozygoties moyennes (aussi bien observées qu'attendues) ont été calculées par la moyenne sur les locus de hétérozygotie monolocus. Un intervalle de confiance à 95 % autour de chaque valeur de H_{nb} a été estimé par l'option "H sur simulons" du logiciel Genetix. Cette option effectue des tirages avec remise dans une urne gamétique de taille

identique à celle de l'échantillon, et calcule H_{nb} pour chaque tirage. L'ensemble des tirages (ici, 1000) permet d'estimer la variance d'échantillonnage de H_{nb} et donc un intervalle de confiance. Nous avons utilisé cette option pour comparer l'hétérozygotie moyenne entre les populations sélectionnées et la population témoin.

- L'hétérozygotie maximum, H_{max} , est attendue quand tous les allèles sont en même fréquence. H_{max} peut être définie par $H_{max} = 1 - 1/A$ où A est le nombre d'allèles. Cette valeur peut être utilisée pour estimer le coefficient d'homogénéité ou "evenness"

$$Ev = H_{nb} / H_{max} \quad (7)$$

- Après un bottleneck, l'hétérozygotie attendue après t générations peut être prédite par

$$H_t = H_0 (1 - 1/2 \hat{N}_e)^t \quad (8)$$

où H_0 est l'hétérozygotie dans la population avant le bottleneck, que l'on estimera ici par la diversité génétique H_{nb} dans la population témoin, et \hat{N}_e est le nombre de géniteurs estimés.

Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel Genetix (Belkhir *et al.*, 1996).

d) Relations entre les individus au sein des populations sélectionnées

Pour chaque population, les données microsatellites ont été analysées par analyse multivariée pour obtenir une représentation graphique des associations entre les différents individus (d'après Guinand, 1996). Plus spécifiquement, nous avons utilisé la méthode de "Fuzzy Correspondance Analysis" (FCA) ou "Analyse des Correspondances Floues" (van Rijkevorsel, 1987; Chevenet *et al.*, 1994). Cette méthode permet, en plus de l'information "allèle", d'utiliser l'information "locus". En effet, plutôt que d'expliquer la variabilité dans une population par a variables, (où a est le nombre total d'allèles), on va l'expliquer par L variables (L étant le nombre de locus) ayant chacune a_j modalités (a_j étant le nombre d'allèles pour le locus L_j). Pour chaque population, une matrice M de n lignes x a colonnes a été construite, où n est le nombre d'individus dans la population et a le nombre total d'allèles observé dans la population.

Les A allèles représentent L locus, chaque locus L_j ayant a_j allèles. On a donc $a = \sum_{j=1}^L a_j$.

A l'intersection du $i^{\text{ème}}$ individu et du $k^{\text{ème}}$ allèle du $l^{\text{ème}}$ locus, nous attribuons la valeur a_{ij}^k , avec $1 \leq i \leq n$, $1 \leq j \leq L$, $1 \leq k \leq a_j$. Nous avons attribué à a_{ij}^k la valeur 0 si l'allèle k au locus j n'est pas présent chez l'individu i , 0.5 si il est présent à l'état hétérozygote, et 1 s'il est présent à l'état homozygote.

Soit $a_i^* = \sum_{k=1}^{a_j} a_{ij}^k$ la somme des valeurs attribuées à l'individu i pour le $j^{\text{ème}}$ locus, et $p_{ij}^k = \frac{a_{ij}^k}{a_i^*}$.

On construit un tableau $P = [p_{ij}^k]$ à n rangs et a colonnes. On définit p_{ij}^* , $p_{i\cdot}^*$ et $p_{\cdot\cdot}^*$ par :

$$p_{ij}^* = \sum_{k=1}^{a_j} p_{ij}^k = 1, \quad p_{i\cdot}^* = \sum_{j=1}^L p_{ij}^* = L, \quad \text{et} \quad p_{\cdot\cdot}^* = \sum_{i=1}^n p_{i\cdot}^* = nL$$

Chaque rang du tableau P a le même poids $r_i = L/nL = 1/n$ et chaque colonne du tableau P a le

$$\text{poids suivant : } c_j^k = \frac{\sum_{i=1}^n p_{ij}^k}{Ln} = \frac{1}{n} \left(\frac{1}{L} \sum_{i=1}^n p_{ij}^k \right) = \frac{1}{n} \bar{p}_j^k$$

L'analyse du tableau P (ou FCA) est en fait l'analyse factorielles des correspondances (AFC)

$$\text{du triplet suivant : } \left[\begin{array}{c} \left(\frac{p_{ij}^k}{\bar{p}_j^k} - 1 \right) \\ \text{Diag}(c_j^k); \text{Diag}(r_i) \end{array} \right]$$

$$\text{où } \text{Diag}(w_j) \text{ est la matrice diagonale } \text{Diag}(w_j) = \begin{bmatrix} w_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & w_2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & w_T \end{bmatrix}$$

Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel ADE4 (Laboratoire BGMP, Université Lyon I).

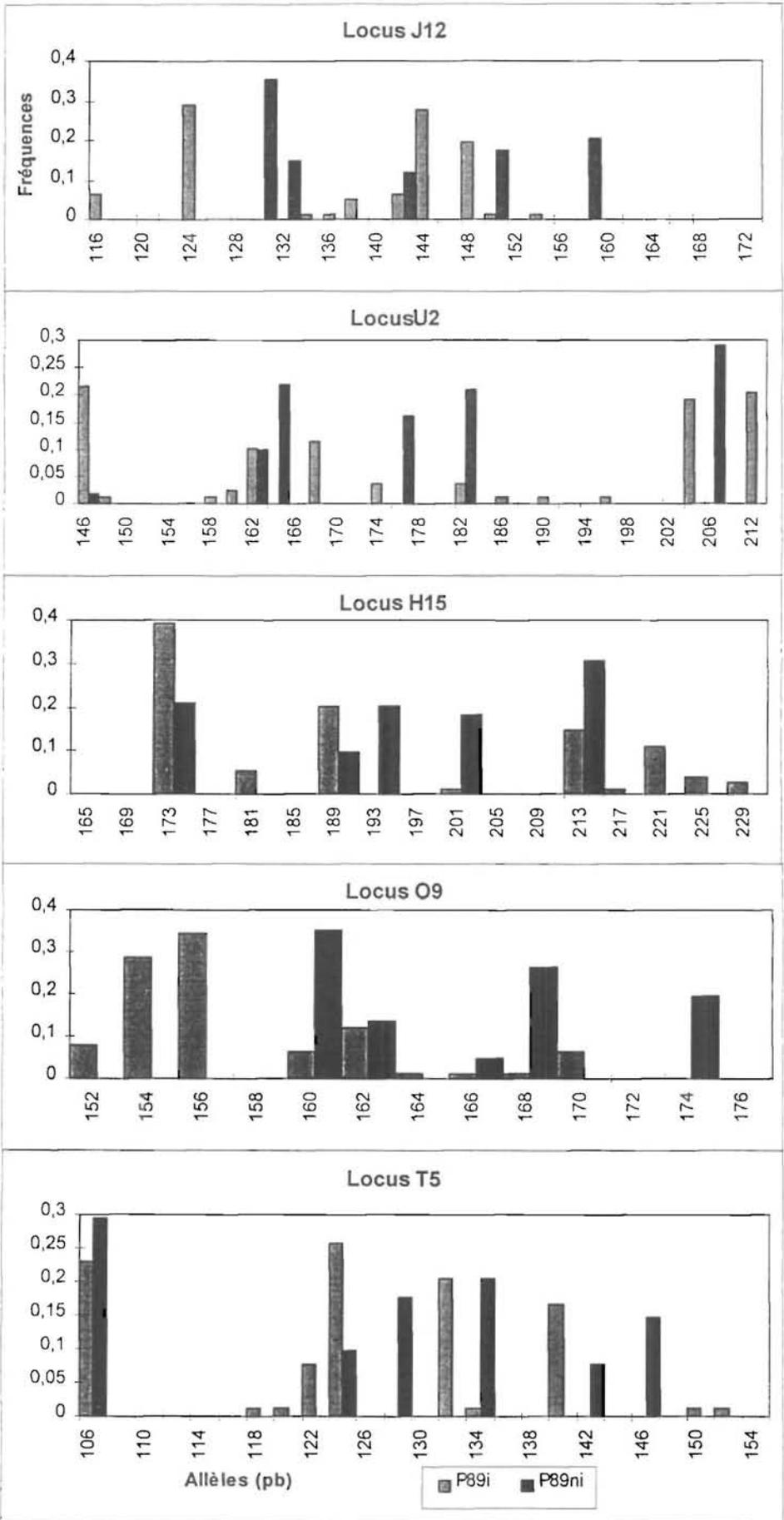


Figure V-3 : Fréquences alléliques dans les populations P89i et P89ni

C. RESULTATS

1. Appui à la gestion des populations en sélection.

L'ensemble des analyses présentées dans ce chapitre font référence aux fréquences alléliques présentées en Annexe E.

Les analyses microsatellites des géniteurs des familles produites en 1995 ont apporté des informations importantes pour la gestion de la diversité: assertion de l'homogénéité des populations sélectionnées, identification de lots d'origine incertaine, estimation du nombre de géniteurs fondateurs.

a) Les deux lots issus de géniteurs sauvages en 1989 constituent-ils deux populations ou seulement deux sous-populations.

La P89 est en fait constituée de deux sous-populations, P89i et P89ni. Ces deux populations dérivent de deux groupes différents de géniteurs (qui ont été respectivement inoculés et non inoculés) provenant d'un même lot de captage naturel de la Baie de Quiberon, donc de la même population. Elles pourraient donc être considérées comme deux sous-populations de la même population de captage naturel. Si chaque sous-population avait été créée à partir d'un nombre suffisant de géniteurs, la diversité génétique de la population y serait représentée de façon comparable.

En fait, la simple observation des richesses et des fréquences alléliques indique que cela est loin d'être le cas. Les fréquences alléliques pour chaque locus sont présentées sur la Figure V-3. Le nombre d'allèles est beaucoup plus faible d'une part dans la P89ni que dans la P89i (5.4 allèles par locus en moyenne contre 10.2, $p < 0.001$). Chacune des populations contient, d'autre part, des allèles spécifiques en fréquence importante (voir Tableau V-2). Sur 52 allèles trouvés au total, 29 sont spécifiques à la P89i et 12 sont spécifiques à la P89ni.

Tableau V-2 : Nombre d'allèles communs et spécifiques aux sous-populations P89i et P89ni

Locus	Nombre d'allèles spécifiques		Nombre d'allèles communs
	P89i	P89ni	
<i>OeduJ12</i>	8	4	1
<i>OeduU2</i>	6	3	3
<i>OeduH15</i>	5	1	4
<i>OeduO9</i>	5	1	5
<i>OeduT5</i>	5	3	2

Il faut donc les considérer comme deux populations à part entière, ce qui est d'une importance certaine pour la gestion du programme de sélection.

De ce fait, certaines familles considérées initialement comme issues de croisements intrapopulation (P89 x P89) doivent en réalité être considérées comme issues de croisement interpopulation (P89i x P89ni). Le bilan des familles produites en 1995 est donc le suivant :

	P85-G2	P89i-G1	P89ni-G1	Témoin
P85-G2	30	11	9	
P89i-G1		12	4	
P89ni-G1			16	
Témoin				21

b) Détermination de lots à l'origine incertaine.

Au cours des générations de sélection massale, les huîtres ont été placées en poches sur de nombreux sites pendant 5 ans. Certaines étiquettes ont été perdues, et deux lots différents ont été renommés X et Y. Comme ces deux lots ont fourni plusieurs géniteurs pour la création des familles de pleins-frères de 1995, il était important de retrouver leur origine exacte. L'étude des archives a permis d'éliminer les origines P89i et Témoin, ainsi que les sous-populations Trinité et Quiberon non-inoc. Ces lots n'avaient plus que deux origines possibles : la P89ni ou la P85, plus spécifiquement les sous-populations Paimpol et Quiberon de la P85.

Nous avons calculé les identités génétiques interindividuelles moyennes entre chacun des lots inconnus et la P85, puis la P89ni, qui ont été comparés à l'identité génétique moyenne au sein de la P85, au sein de la P89ni et entre P85 et P89ni. Les résultats sont présentés dans le Tableau V-3. On peut les interpréter ainsi : en moyenne, l'identité entre un individu issu du lot X et un individu de la P85 n'est pas significativement différente de l'identité entre deux individus de la population P85. Par contre, l'identité entre un individu issu du lot X et un individu issu de la P89ni est significativement différente de l'identité entre deux individus de la P89ni. La même chose est vraie pour le lot Y. En conséquence, on peut rattacher les lots X et Y à la P85. Il reste encore à déterminer si ces lots font partie de la sous-population Paimpol ou Quiberon.

Tableau V-3 : Identité génétique moyenne (et écart-type) entre les lots X-Y et les populations sélectionnées P85 et P89ni (deuxième colonne), et au sein et entre les populations sélectionnées (deuxième ligne). Les probabilités du tableau sont associées au test t d'égalité des moyennes (*) : $p < 0.001$)**

		85	89ni
		0,152	0,219
X - 85	0,144	p=0,173	
Y - 85	0,1945	p=0,311	
X - 89ni	0,076		***
Y - 89ni	0,050		***

c) *Estimation du nombre de fondateurs des populations issues de pontes en masse d'un groupe de géniteurs.*

Le bilan des différentes méthodes est donné sur le Tableau V-4.

Tableau V-4 : Estimation du nombre de géniteurs à l'origine des populations sélectionnés

Population	Locus	①	②		③
			\bar{F}	\hat{N}_k [IC à 95%]	
P89ni	Multilocus	3			
P89i	<i>OeduJ12</i>		0.096	6.85	8.2 [4.5-12.6]
	<i>OeduU2</i>		0.090	7.45	10.0 [5.8-15]
	<i>OeduH15</i>		0.071	10.94	11.0 [6-22.8]
	<i>OeduO9</i>		0.115	5.49	8.6 [4.5-14.5]
	<i>OeduT5</i>		0.099	6.58	10.0 [5.1-19.6]
	Multilocus	≥ 9	0.094	7.05 [4.44-10.90]	
P85	<i>OeduJ12</i>		0.058	24.62	16.3 [10-30.7]
	<i>OeduU2</i>		0.066	20.65	14.5 [8.8-24.3]
	<i>OeduH15</i>		0.073	18.34	13.5 [7.6-31.5]
	<i>OeduO9</i>		0.065	20.9	11.9 [6.8-23.2]
	<i>OeduT5</i>		0.072	18.42	27.7 [17.4-64.8]
	Multilocus		0.067	20.38 [12.75-31.87]	

① Par observation directe des génotypes fondateurs

② Par l'analyse des variations temporelles des fréquences alléliques

\bar{F} : variance temporelle des fréquences alléliques, \hat{N}_k : nombre de géniteurs effectifs [entre crochets : intervalle de confiance]

③ Par bootstrap. Valeurs de N_i [et intervalle de confiance à 95%]

(1) Par détermination directe des génotypes fondateurs.

Avec nos 5 locus, et vu le nombre d'individus analysés (voir Tableau V-5), nous avons pu déterminer que la population 89 non-inoc provient d'une ponte unique à laquelle ont contribué seulement 3 géniteurs fondateurs : un d'un sexe (A) et deux de l'autre sexe (B et C). On peut classer 100 % des individus dans ces deux familles qui ont un parent en commun. Les familles de P89-G2 non-inoc produites en 1995 proviennent donc de parents pleins-frères ou demi-frères.

Tableau V-5 : Identification des pontes à l'origine de la P89ni-G1

	N°	P1	P2	J12	U2	H15	O9	T5
L89 géniteur	224	A	B	230 258	206 164	213 189	168 174	134 142
L89 géniteur	300	A	B	230 258	206 164	213 173	168 174	106 142
L89 géniteur	301	A	B	230 258	182 164	213 189	168 174	106 146
L89 géniteur	306	A	B	230 258	182 164	193 173	168 174	106 142
L89 géniteur	307	A	B	230 230	206 164	213 189	168 166	134 146
L89 géniteur	315	A	B	250 258	182 164	213 189	160 174	106 142
L89 géniteur	316	A	B	230 258	206 164	213 189	160 174	134 146
L89 géniteur	320	A	B	230 258	182 164	213 173	168 174	134 146
L89 géniteur	321	A	B	250 258	206 164	193 189	160 174	106 146
L89 géniteur	323	A	B	250 258	182 164	193 173	160 174	
L89 géniteur	328	A	B	250 258	182 164	213 173	160 174	106 146
L89 géniteur	330	A	B	250 258	182 164	213 173	160 174	134 146
L89 géniteur	333	A	B	250 258	182 164	193 173	168 174	134 146
L89 géniteur	337	A	B	230 258	206 164	193 173	168 174	106 142
L89 géniteur	339	A	B	230 230	206 164	213 193	168 166	
L89 géniteur	344	A	B	250 258	182 164	213 189	160 174	106 146
L89 géniteur	346	A	B	250 258	182 164	193 189	160 174	106 146
L89 géniteur	347	A	B	230 258	206 164	213 189	160 174	134 142
L89 géniteur	350	A	B	230 258	182 176	213 189	168 174	134 146
L89 géniteur	352	A	B	230 258	206 164	193 173	168 166	134 142
L89 géniteur	362	A	B	230 258	182 164	213 173	160 174	106 146
L89 Nongénéiteur	318	A	B	230 258	206 164	213 173	168 174	134 142
L89 Nongénéiteur	326	A	B	230 230	206 164	213 173	168 166	106 146
L89 Nongénéiteur	360	A	B	250 230	206 176	193 173	160 166	134 146
L89 Nongénéiteur	367	A	B	230 258	182 164	213 173	160 174	134 146
L89 géniteur	204	A	C	230 232	206 176	213 201	168 160	106 128
L89 géniteur	353	A	C	230 232	206 176	193 173	160 162	134 128
L89 géniteur	310	A	C	250 242	182 162	193 201	160 162	134 128
L89 géniteur	312	A	C	230 242	206 176	213 201	168 162	106 128
L89 géniteur	314	A	C	230 242	206 176	213 201	168 162	106 128
L89 géniteur	317	A	C	230 242	206 162	193 201	168 162	134 128
L89 géniteur	334	A	C	230 232	206 162	213 173	168 160	106 128
L89 géniteur	340	A	C	230 242	206 162	213 173	168 162	106 128
L89 géniteur	343	A	C	230 242	206 162	193 201	168 160	134 128
L89 géniteur	351	A	C	250 232	182 176	213 201	160 162	106 124
L89 géniteur	355	A	C	250 232	182 176	193 201	160 160	106 124
L89 géniteur	356	A	C	250 232	182 162	193 173	160 160	106 128
L89 géniteur	357	A	C	230 232	182 176	213 173	168 160	106 128
L89 géniteur	363	A	C	230 232	182 176	213 173	168 160	106 128
L89 Nongénéiteur	303	A	C	230 242	182 162	193 201	168 162	106 124
L89 Nongénéiteur	305	A	C	250 232	182 176	213 201	160 160	106 128
L89 Nongénéiteur	311	A	C	250 232	182 176	193 173	160 160	134 128
L89 Nongénéiteur	319	A	C	230 242	206 162	193 201	160 162	106 124
L89 Nongénéiteur	325	A	C	230 242	206 176	213 201	168 162	106 124
L89 Nongénéiteur	338	A	C	250 232	206 176	193 201		134 124
L89 Nongénéiteur	341	A	C	230 242	206 162	193 201	168 160	134 128
L89 Nongénéiteur	342	A	C	230 242	206 162	213 173	168 162	106 124
L89 Nongénéiteur	345	A	C	250 232	182 176	213 201	160 160	106 128
L89 Nongénéiteur	358	A	C	230 232	206 176	213 201	160 162	106 124
L89 Nongénéiteur	366	A	C	250 232	206 176	213 201	160 160	134 128
L89 Nongénéiteur	368	A	C	230 232	206 176	213 201	160 162	134 128
L89 Nongénéiteur	370	A	C	230 242	206 162	193 201	168 162	106 124

La première colonne indique si l'individu (identifié par son N°) a été utilisé comme géniteur en 1995. P1 et P2 sont les noms des deux parents identifié pour chaque individu

Les allèles de la même couleur ont été apporté par le même parent

Tableau V-6 : Identification des pontes à l'origine de la P89-i

Les légendes sont identiques à celle du Tableau V-5.

		N°	P1	P2	J12	U2	H15	O9	T5
L89	géniteur	213	A	M	248 224	212 204	213 173	154 170	106 132
L89	géniteur	219	A	M	224 224	168 204	213 221	162 156	106 132
L89	géniteur	242	A	M	248 216	168 162	213 173	154 170	106 132
L89	géniteur	255	A	M	224 224	212 204	189 173	162 170	124 132
L89	géniteur	259	A	M	224 224	168 204	189 173	162 156	124 132
L89	géniteur	264	A	M	248 224	168 204	189 173	154 156	124 132
L89	géniteur	286	A	M	224 224	168 204	213 221	154 156	124 132
L89	Nongéniteur	238	A	M	248 224	212 204	189 173	154 156	124 132
L89	Nongéniteur	239	A	M	224 224	168 204	189 173	162 156	106 132
L89	Nongéniteur	261	A	M	224 224	212 204	189 221	162 156	106 132
L89	Nongéniteur	272	A	M	248 224	212 204	189 221	154 156	106 132
L89	Nongéniteur	278	A	M	224 224	168 204	213 221		106 132
L89	Nongéniteur	282	A	M	248 224	212 204	189 221	154 156	124 132
L89	Nongéniteur	293	A	M	224 216	212 204	213 173	162 170	124 132
L89	géniteur	267	A	M?	248 216	168 204	213 217	154 170	106 132
L89	géniteur	245	C	M	224 216	174 204	173 221	154 156	118 132
L89	géniteur	283	A		248 244	212 146	189 225	154 156	106 124
L89	géniteur	265	A		224 244	212 146	189 225	162 156	124 140
L89	géniteur	263	A		248 244	212 146	189 173	154 156	124 124
L89	géniteur	234	A		248 244	212 146	189 173	154 156	106 124
L89	Nongéniteur	276	A		248 242	212 162	213 173	154 160	106 122
L89	géniteur	290	A		248 238	212 160	213 173	154 154	106 140
L89	géniteur	227	A		248 244	212 146	213 213	154 156	124 140
L89	Nongéniteur	229	A		224 224	168 174	213 213	162 172	106 124
L89	Nongéniteur	295	A		248 244	212 146	189 229	154 156	106 140
L89	Nongéniteur	297	A		248 254	212 160	189 221	162 162	106 134
L89	géniteur	270	A		224 224	168 174	189 189	154 164	124 140
L89	Nongéniteur	217	A		224 224	168 182	189 189	162 164	124 124
L89	géniteur	230	B	N	244 242	148 162	173 173	156 160	140 122
L89	géniteur	210	B	N	238 242	146 162	173 173	154 160	140 106
L89	géniteur	214	B	N	244 244	146 162	173 181	156 152	140 106
L89	géniteur	258	B	N	244 244	146 182	173 181	156 152	124 106
L89	géniteur	271	B	N	244 244	146 182	173 181	154 160	140 122
L89	géniteur	287	B	N	244 244	146 162	173 173	156 152	140 122
L89	géniteur	299	B	N	244 244	146 182		156 152	140 122
L89	géniteur	269	B	N	244 242	146 162		154 160	
L89	géniteur	206	B	N?	238 238	146 162	173 173	154 152	140 122
L89	géniteur	257	B		244 236	146 190	173 173	156 166	124 150
L89	géniteur	279	B		244 234	146 186	201 225	156 156	124 106
L89	géniteur	289	B		244 216	146 174	173 173	156 168	124 124

Dans l'échantillon analysé de la population 89 inoc, deux familles multiparentales, Fam1 et Fam2, ont pu être distinguées (voir Tableau V-6). Dans les deux cas, il y a un géniteur d'un sexe, que l'on a appelé respectivement A et B, et plusieurs géniteurs de l'autre sexe. On peut supposer, vu le mode de reproduction de l'huître plate, qu'il s'agit à chaque fois d'une femelle croisée avec plusieurs mâles. Pour Fam1, à laquelle appartiennent 27 individus, un géniteur mâle a été identifié et appelé M; le ou les autres parents n'ont pas pu être identifiés, mais compte tenu du nombre d'allèles présents, entre 4 et 6 allèles selon les locus, on peut estimer qu'au moins 3 autres parents mâles ont contribué à cette famille. Pour Fam2, on peut identifier un autre géniteur mâle, appelé N, et au moins 2 autres mâles non identifiés.

Les génotypes proposés pour les géniteurs identifiés à l'origine de la P89ni et la P89i sont donnés dans le Tableau V-7. Ils peuvent être déduits sans ambiguïté du génotype des descendants. Notons, pour la P89i, l'individu 206 attribué à la Fam2 et typé homozygote pour l'allèle 138 au locus *OeduJ12*. Les autres locus pourraient faire attribuer à cet individu le parent mâle N.

Tableau V-7 : Génotypes proposés pour les géniteurs identifiés à l'origine des populations P89ni et P89i

Pop.	Famille	P1	P2	<i>OeduJ12</i>	<i>OeduU2</i>	<i>OeduH15</i>	<i>OeduO9</i>	<i>OeduT5</i>
P89ni		A		230/250	182/206	193/213	160/168	106/134
			B	230/258	164/176	173/189	166/174	142/146
			C	232/242	162/176	173/201	160/162	124/128
P89i	Fam1	A		224/248	168/212	189/213	154/162	106/124
			M	216/224	162/204	173/221	156/170	132/132(?)
	Fam2	B		238/244	146/148	173/201	154/156	124/140
			N	242/244	146/162	173/181	152/160	106/122

Pour la population P85, les choses sont plus complexes du fait du brassage des allèles ayant eu lieu en deuxième génération, et cette méthode n'est pas applicable.

Comme on a une estimation exacte du nombre de géniteurs à l'origine de la P89ni, nous allons dorénavant nous intéresser simplement à la P85 et la P89i.

(2) Par la méthode "temporelle"

Pour P89i, les valeurs déduites de l'observation directe des génotypes tombent dans l'intervalle de confiance pour \hat{N}_t . Pour la P85, le nombre de géniteurs fondateurs estimé est plus important, 20.4, avec un intervalle de confiance assez réduit semblant indiquer qu'il y a au moins 12 géniteurs à l'origine de cette population.

(3) Par Bootstrap.

Les estimations de N_e , effectif d'un sous-échantillon de la population de la Baie de Quiberon qui présenterait une diversité génétique N_d , sont présentés pour chaque population sélectionnée et pour chaque locus dans le Tableau V-4. Les estimations données par les différents locus sont homogènes, à l'exception du locus *OeduT5* qui conduit à des estimations plus élevées, notamment pour P85. Pour la P85, N_e est estimé à 16.77 ± 6.31 si l'on tient compte de *OeduT5*, ou à 14.01 ± 1.84 sinon. Pour la P89i, N_e est estimé à 9.54 ± 1.17 .

2. Variabilité génétique des populations sélectionnées.**a) Population P85**

(1) Diversité génique et niveau d'hétérozygotie

Le nombre moyen d'allèles par locus dans la population naturelle est de 19.8 ± 2.2 , et le nombre d'allèles est plus faible dans la P85 : 12.8 ± 2.2 ($p < 0.05$) (voir Tableau V-8). La diminution du nombre d'allèles est due notamment à la perte d'allèles rares (voir par exemple Figure V-4: les allèles 230, 258, 262, 264, 272 au locus *OeduJ12* sont en faibles fréquences dans la population témoin et absents des populations sélectionnées). La fréquence moyenne dans la population témoin des allèles présents dans cette population et absents dans la P85 est de 0.025 ± 0.019 , contre 0.068 ± 0.054 pour les allèles communs aux deux populations ($p < 0.001$).

Le niveau d'hétérozygotie observé et attendu est plus faible dans la P85 que dans la population témoin ($p < 0.001$) pour tous les locus (voir Tableau V-9).

Des déficits en hétérozygotes sont observés dans la population témoin pour les locus *OeduH15* et dans une moindre mesure *OeduT5*, et dans la P85 pour les locus *OeduH15* et *OeduJ12*. (voir Tableau V-10).

Tableau V-8 : Richesse allélique dans les populations du programme de sélection

		Témoin	P85	P89i	P89ni
	Effectif	49	74	38	52
<i>OeduJ12</i>	N_a	22	14	9	5
	Ho	0.918	0.600	0.649	0.961
	H_{nb}	0.926	0.880	0.790	0.875
	H_{max}	0.945	0.929	0.889	0.8
	Evenness	0.970	0.947	0.888	
<i>OeduU2</i>	N_a	25	14	11	6
	Ho	0.896	0.861	1	1
	H_{nb}	0.939	0.824	0.848	1
	H_{max}	0.96	0.929	0.909	0.833
	Evenness	0.978	0.878	0.933	
<i>OeduH15</i>	N_a	14	10	9	5
	Ho	0.698	0.7	0.778	1
	H_{nb}	0.884	0.817	0.776	1
	H_{max}	0.929	0.900	0.889	0.800
	Evenness	0.952	0.908	0.872	
<i>OeduO9</i>	N_a	18	11	9	5
	Ho	0.878	0.757	0.919	0.882
	H_{nb}	0.921	0.785	0.779	0.875
	H_{max}	0.944	0.909	0.889	0.800
	Evenness	0.976	0.864	0.876	
<i>OeduT5</i>	N_a	20	15	9	6
	Ho	0.809	0.771	0.947	1
	H_{nb}	0.900	0.810	0.809	1
	H_{max}	0.95	0.933	0.889	0.833
	Evenness	0.947	0.867	0.910	

N_a est le nombre d'allèles, Ho l'hétérozygotie observée, H_{nb} l'hétérozygotie attendue non biaisée sous l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy-Weinberg (Nei, 1978), H_{max} l'hétérozygotie maximale possible en cas d'égalité des fréquences alléliques, evenness = H_{nb}/H_{max}

NB : Pour la P89ni, l'hétérozygotie attendue a été calculée en fonction des génotypes attendus au vu des génotypes parentaux. En conséquence, l'evenness n'a pas été calculé pour cette population.

Tableau V-9 : Hétérozygotie dans les populations sélectionnées

	t	Ne	Ho	Hnb	Ht
Témoin			0.840 (0.089)	0.914 (0.022)	
P85	2	15	0.738 (0.096)	0.788 (0.035)	0.796
P89i	1	10	0.859 (0.143)	0.794 (0.030)	0.809
P89ni	1	3	0.969 (0.051)	0.742 (0.313)	0.710

t est le nombre de générations, Ne la taille efficace estimée au paragraphe précédent, Ho est l'hétérozygotie moyenne observée, Hnb l'hétérozygotie moyenne attendue sous Hardy-Weinberg, Ht l'hétérozygotie attendue après un bottleneck.

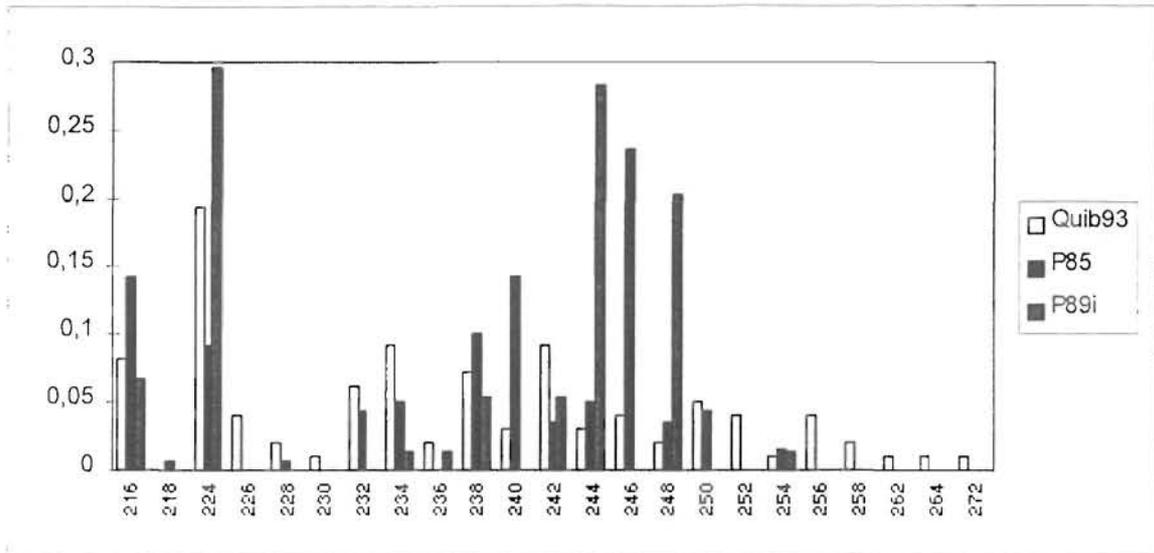


Figure V-4. Fréquence allélique au locus *OeduJ12* dans la population Témoin (Quib93) et dans 2 populations sélectionnées (P85 et P89i).

Tableau V-10. Conformité à Hardy-Weinberg dans les populations en sélection (estimée par les valeurs de Fis selon Weir & Cockerham)

Fis	Multilocus	<i>OeduJ12</i>	<i>OeduU2</i>	<i>OeduH15</i>	<i>OeduO9</i>	<i>OeduT5</i>
Quib. 93	0.082 ***	0.008 (ns)	0.047 (ns)	0.213 ***	0.048 (ns)	0.102 *
P85	0.104 ***	0.319 ***	-0.045 (ns)	0.144 **	0.036 (ns)	0.047 (ns)
P89i	-0.074 *	0.181 *	-0.182 ***	-0.003 ns	-0.183 **	-0.174 **

ns : $p > 0.05$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

La diversité génique dans la P85 correspond à celle attendue sous le modèle de bottleneck. Par contre, et malgré la baisse du nombre d'allèles, il n'y a pas d'augmentation de l'évenness, il y a même une baisse à tous les locus; en d'autres termes, il n'y a pas de tendance à l'homogénéisation des fréquences alléliques.

(2) Relation entre les individus

La population P85-G2 est subdivisée en quatre sous-populations qui sont définies par la zone géographique où a été élevée la G1 : Paimpol (15 individus), Quiberon (28 individus dont 2 issus de géniteurs inoculés), La Trinité (4 individus), ainsi que les lots X (12 individus) et Y (13 individus) qui ont été assignés à la P85-G2. Les résultats de l'analyse par FCA sont présentés sur la Figure V-5. Bien que les deux premiers axes n'expliquent que 14.8 % de la variance totale, on peut observer d'une part que les individus du lot X se regroupent avec la sous-population Quiberon, et que les individus du lot Y se regroupent avec la sous-population Paimpol. D'autre part, les individus se regroupent en fonction de leur sous-population d'origine, indiquant une certaine divergence entre les deux sous-populations Paimpol et

Quiberon. Vu le nombre très réduit de représentants des deux autres sous-populations (Trinité et Quiberon noninoc), il est difficile de tirer des conclusions. La sous-population Quiberon semble plus dispersée que la sous-population Paimpol, indiquant une possible plus grande homogénéité génétique pour Paimpol.

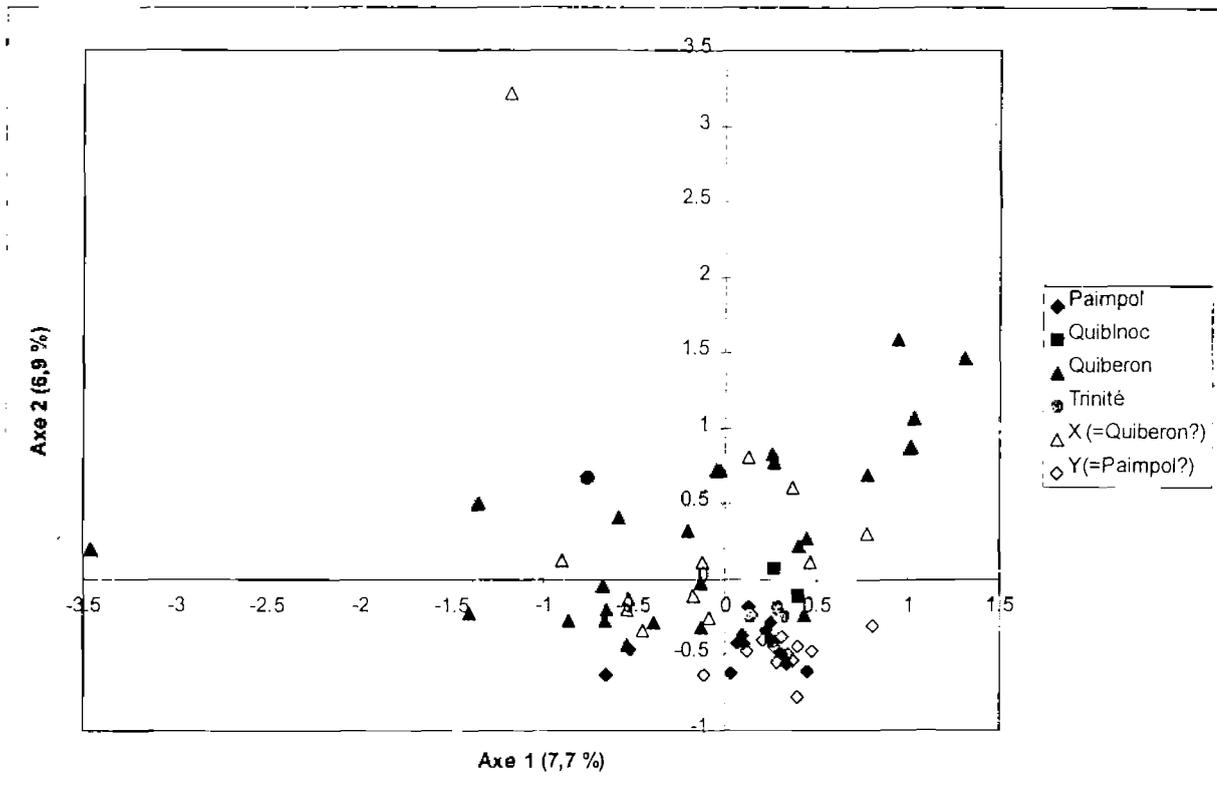


Figure V-5: Associations entre individus dans la P85 sur la base des deux premiers axes de l'analyse par FCA des données microsatellites.

Si on assigne le lot X à Quiberon et le lot Y à Paimpol, il est possible alors de recalculer le nombre de géniteurs efficace à l'origine de chacune des sous-populations. Par la méthode des variances temporelles, on estime à 11.1, avec un intervalle de confiance [7.0-17.0], le nombre de fondateurs efficaces pour la sous-population Paimpol et à 25.0, avec un intervalle de confiance [14.6-43.8], le nombre de fondateurs efficaces dans la sous-population Quiberon.

L'identité moyenne au sein de la P85 est de 0.167 (± 0.130). I est plus élevé pour la P85-Paimpol (0.308 ± 0.131) que pour la P85-Quiberon (0.129 ± 0.118 , $p < 0.001$), ce qui corrobore une plus grande variabilité au sein de la sous-population Quiberon.

b) *Population P89i*

(1) Diversité génique et hétérozygotie

Le nombre d'allèles est plus faible dans la P89i que dans la population témoin (9.4 ± 0.9 pour la P89i, $p < 0.01$). Là encore, les allèles présents dans la population témoin et perdus dans la P89i sont en fréquence plus faible que les allèles conservés (0.033 ± 0.028 contre 0.076 ± 0.058 , $p < 0.001$).

L'hétérozygotie observée dans la population P89i est supérieure à celle de la population témoin pour 4 des 5 locus étudiés (sauf *OeduJ12*). Par contre, H_{nb} est plus faible dans la population P89i que dans la population témoin pour tous les locus. Par ailleurs, la population P89i montre un excès d'hétérozygotes par rapport à la valeur attendue pour 3 des 4 locus.

(2) Relations entre individus

Les résultats de l'analyse par FCA sont présentés sur la Figure V-6. Les deux premiers axes expliquent 25.4 % de la variance totale et le premier axe discrimine clairement les différentes familles identifiées au paragraphe C.1.a.

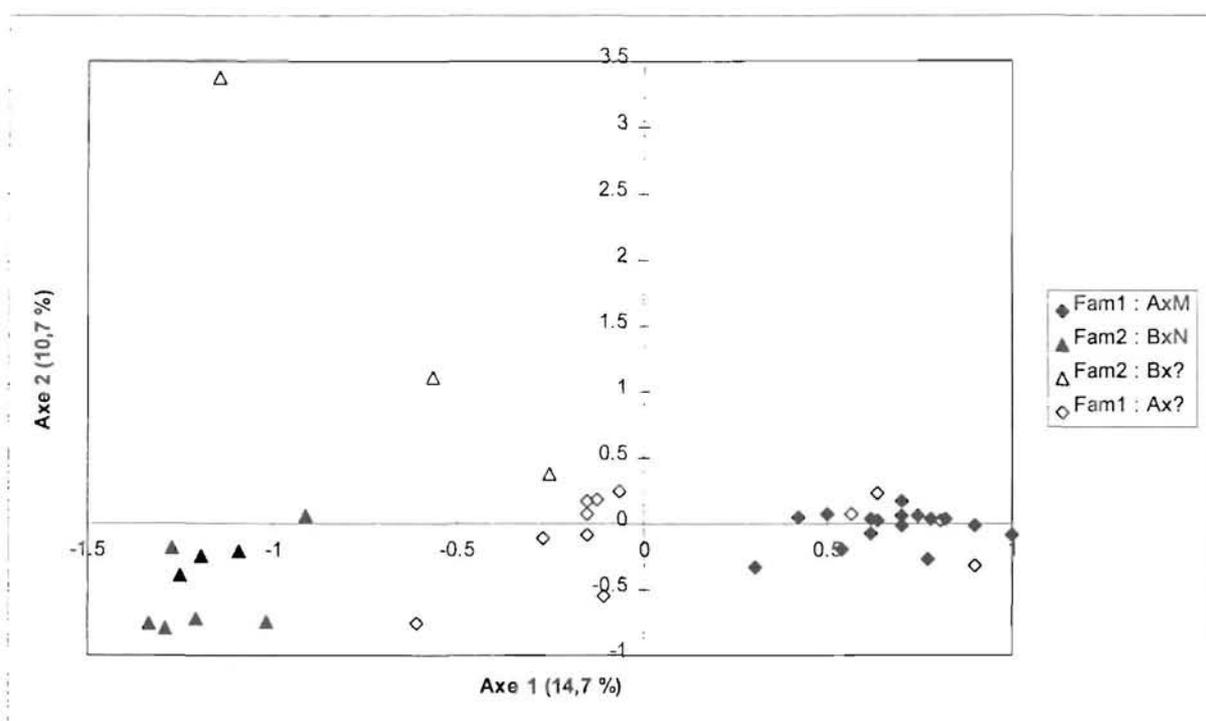


Figure V-6 : Associations entre individus dans la P89i sur la base des deux premiers axes de l'analyse par FCA des données microsatellites.

c) *Population P89ni*

La diversité allélique dans cette population est beaucoup plus faible que dans la population témoin (5.4 ± 0.5 allèles par locus en moyenne, $p < 0.01$), et les allèles conservés dans cette population sont en fréquence plus élevés dans la population témoin que les allèles perdus (0.076 ± 0.062 contre 0.037 ± 0.039 , $p < 0.01$). Ce faible polymorphisme ainsi que la forte hétérozygotie observée s'expliquent par la structure familiale supposée (croisement tri-parental). Le calcul de H_{nb} selon Nei (1978) n'a pas grande signification avec cette structure familiale. Au vu des génotypes déduits pour les géniteurs de cette population, l'hétérozygotie attendue dans la P89ni-G1 peut être calculée dans l'hypothèse de l'absence de distorsion de ségrégation. Les résultats sont donnés dans le tableau V-9.

La diversité génique dans les populations sélectionnées correspond à celle attendue sous le modèle de goulots d'étranglement. Par contre, et malgré la baisse du nombre d'allèles, il n'y a pas d'augmentation de l'évenness, il y a même une baisse à tous les locus pour les populations P85 et P89i; en d'autres termes, il n'y a pas de tendance à l'homogénéisation des fréquences alléliques.

D. DISCUSSION

1. Estimation du nombre de géniteurs

L'utilisation de marqueurs microsatellites hypervariables a permis, par observation directe des génotypes de la descendance, d'identifier tous (pour la P89ni) ou une partie (pour la P89i) des géniteurs à l'origine de ces populations sélectionnées. Cependant, on a atteint pour la P89i les limites de la méthode, puisqu'on n'a pas pu identifier certains des géniteurs qui n'ont contribué qu'à un nombre très faible de descendant dans la G1.

Le calcul de N_e à partir des variances temporelles des fréquences alléliques implique plusieurs hypothèses sous-jacentes:

- 1) l'effet de la mutation est négligeable
- 2) les allèles étudiés sont neutres
- 3) les échantillons analysés sont choisis au hasard dans les populations

4) il n'y a pas de migration depuis d'autres populations

Les hypothèse 4) et sûrement 2) sont respectées. L'hypothèse 1) est probable sur l'échelle de temps considérée (2 générations au plus).

L'hypothèse 3) est certainement non respectée. Cette méthode pour estimer les tailles efficaces de populations soumises à la dérive est dépendante d'un échantillonnage aléatoire et de l'estimation fiable des fréquences alléliques dans une population fermée à différents points dans le temps. Ici, nous dévions du plan d'échantillonnage préconisé par Waples (1989) car l'échantillonnage représentatif de la population d'origine, ici la population naturelle de la Baie de Quiberon, n'est pas prélevé au temps 0 mais au temps t , au même moment que la population sélectionnée. Les variations dans les fréquences alléliques entre des échantillons contemporains de la population naturelle et sélectionnée cumulent les changements à travers 2 généalogies, l'une pour la population naturelle et l'autre pour la population sélectionnée. Dans notre cas où t est faible, une valeur attendue de F peut être exprimée par

$E(F) \approx t/2N_{ne} + t/2N_{se} + 1/2S_n + 1/2S_s$ où N_{ne} , N_{se} , S_n et S_s sont les nombres de géniteurs et les tailles d'échantillons de la population naturelle et sélectionnée respectivement (Hedgcock *et al.*, 1990). Ceci se simplifie en $E(F) \approx t/N_e + 1/2S_n + 1/2S_s$ où N_e est la moyenne harmonique

du nombre de géniteurs le long des deux généalogies. L'estimateur de N_e , $\hat{N}_k = t / [\bar{F} - 1/2S_n - 1/2S_s]$ diffère d'un facteur 2 avec l'estimateur donné en Matériel & Méthodes qui correspond au cas où l'échantillon S_0 est issu du pool gamétique parental. De ce fait, les valeurs de \hat{N}_k données dans le tableau V-5 peuvent être interprétées comme les moyennes du nombre de parents pour à la fois la population naturelle et la population sélectionnée, sur l'intervalle de temps depuis la création de la population sélectionnée. Les valeurs de \hat{N}_k pour les populations sélectionnées présentées dans ce tableau correspondent à la valeur asymptotique quand N_{ne} tend vers l'infini. De ce fait, il est important d'estimer N_e et l'effet de la dérive dans la population source. En plus de l'échantillon de 49 individus de la Baie de Quiberon capté en 1993, nous disposons de deux autres échantillonnages dans le temps de la population de la Baie de Quiberon. Nous pouvons estimer N_e entre un échantillon vraisemblablement capté en 1990 (ou peut-être 1989) et un échantillon capté en 1992. Les valeurs de N_e estimées se situent entre 460 (si on considère qu'il y a eu deux générations entre les deux échantillons) et 690 (pour trois générations). Ce résultat doit être pris avec précaution pour estimer les

véritables tailles efficaces dans les populations naturelles, car il est basé sur des échantillons de petites tailles (autour d'une trentaine d'individus). Néanmoins, ces valeurs élevées de N_e indiquent une **dérive limitée** dans la population source, et de ce fait les valeurs de \hat{N}_k peuvent être considérées comme des estimations satisfaisantes du nombre de **générateurs** à l'origine des populations sélectionnées.

Ces valeurs sont en accord avec les estimations par bootstrap. L'estimation du nombre de **générateurs** par bootstrap est basée sur le calcul de la diversité dans les populations sélectionnées par le nombre d'allèles observé dans notre échantillonnage. Etant donné que nous disposons de l'ensemble des individus qui ont contribué aux nouvelles générations, on décrit ainsi toute la diversité qui a été **transmise** à la génération suivante.

En conclusion, les populations sélectionnées sont issues d'un nombre réduit de **générateurs**: entre 15 et 20 pour la population P85, autour de 10 pour la P89i et exactement 3 pour la population P89ni.

Les populations en sélection ont donc subi des goulots d'étranglement sévères, ce qui peut être relié à la technique de ponte utilisée. Ce n'est pas le premier exemple de changements génétiques importants dans des populations d'écloserie d'*Ostrea edulis*. Alvarez *et al.* (1989) ont observé un effet de fondation **important** lors de tentatives de pontes **en masse**; les pontes impliquant 60 parents ont été recueillies pendant 7 jours mais le nombre de **générateurs effectifs** a été estimé à 6-10 parents. Saavedra & Guerra (1996) ont recueilli sur 5 jours les pontes d'un bac comptant 120 parents, et ont observé un effet de fondation encore plus accentué, avec un nombre de **générateurs** estimé à 3,5. Les populations d'écloserie de bivalves marins montrent souvent des tailles efficaces **plus faibles que** le nombre de **générateurs utilisés** après un certain nombre de générations (voir Hedgecock *et al.*, 1992; Gaffney *et al.*, 1992). Cependant, dans notre étude comme dans celles mentionnées sur *Ostrea edulis*, la baisse importante de la taille efficace est observée dès les premières générations, et ceci suggère que *Ostrea edulis* est une espèce particulièrement sensible aux effets de fondation. Saavedra & Guerra (1996) suggèrent que ce phénomène peut être dû au cycle de vie particulier de cette espèce, où les pontes ne sont pas synchronisées.

2. Effet du goulot d'étranglement sur la variabilité génétique

De nombreuses études théoriques soutiennent l'hypothèse que lorsqu'une population subit un goulot d'étranglement et que la taille efficace est réduite de façon significative, on observe une réduction progressive du nombre d'allèles et de l'hétérozygotie, la diversité allélique étant supposée baisser beaucoup plus vite que l'hétérozygotie (voir notamment Nei *et al.*, 1975). Nos données sont en accord avec cette théorie. Le nombre d'allèles dans les populations sélectionnées est réduit de façon importante par rapport à la population témoin, et cela est surtout lié à l'absence dans les populations sélectionnées d'allèles rares dans la population témoin. L'effet de la réduction de la taille efficace sur l'hétérozygotie est plus complexe. Pour la P85-G2, qui a probablement subi deux goulots d'étranglement successifs, l'hétérozygotie aussi bien observée qu'attendue est plus faible que dans la population témoin, ceci à tous les locus. Pour les populations P89i-G1 et P89ni-G1, nous observons la génération qui suit immédiatement le goulot. Ces populations sont supposées être issues d'un nombre de fondateurs très réduit (10 pour l'une et 3 pour l'autre), et des études de goulots d'étranglement aussi sévères ont montré des baisses de l'hétérozygotie (Leberg, 1992). Cependant, ces études utilisaient surtout des marqueurs allozymes peu variables, alors que les marqueurs utilisés ici sont des marqueurs hypervariables. L'hétérozygotie à un locus particulier est une variable aléatoire qui peut soit croître soit décroître après un goulot (Wright, 1931; Crow & Kimura, 1970). Dans le cas particulier des marqueurs microsatellites, il n'est pas rare de trouver des individus n'ayant aucun allèle en commun, et si ces individus sont retenus lors du bottleneck, l'hétérozygotie à ces locus dans la génération suivante peut atteindre 1 comme on l'observe dans la P89ni-G1.

Etant donné le faible nombre de fondateurs efficaces pour la P85-G2, et que l'on suppose que cette population a subi deux générations de goulots d'étranglement, on peut relier les déficits en hétérozygotes à l'apparition dans cette population de consanguinité.

3. A posteriori : qu'a t'on fait en 1995?

Les croisements réalisés en 1995 ont été réalisés sans la connaissance préalable de la variabilité génétique présente. A posteriori, il est possible de savoir si on a croisé des individus plus ou moins apparentés, et si on a perdu de la variabilité par rapport à ce qui était initialement présent dans la population.

Pour chaque population, on peut faire un bilan de chaque croisement intrapopulation réalisé en 1995. Le Tableau V-11 indique les géniteurs employés, l'origine parentale et l'identité estimée des deux parents pour chaque croisement formant la P85-G3.

Tableau V-11 : Croisements réalisés en 1995 pour la production de la P85-G3 : nom du croisement, nom, origine et indice d'identité des 2 parents

N° famille	parent 1 N°	parent 2 N°	Identité	parent 1 origine	parent 2 origine
L85pa-A	500	501	0,236	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85qn-B	X11	X12	0,179	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85qn-C	Y7	Y8	?*	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85qn-D	536	532	?*	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85&&-E	413	470	0,31	85-G2 Paimpol	85-G2 Quib. non-inoc
L85pa-F	Y11	Y12	0,3	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85pa-G	502	505	0,315	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85qn-H	544	516	0,074	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85pa-I	Y13	Y14	0,46	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85pa-J	494	496	0,73	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85qn-K	X10	X9	0,124	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85qn-L	526	529	0,105	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85pa-M	486	487	0,228	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85&&-N	406	478	0,043	85-G2 Paimpol	85-G2 Quib. non-inoc
L85qn-O	X3	X4	0,202	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85&&-P	540	408	0,128	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Paimpol
L85qi-Q	424	428	0,326	85-G2 Quiberon inoc	85-G2 Quiberon inoc
L85tr-R	458	459	0,236	85-G2 Trinité	85-G2 Trinité
L85qn-S	514	524	0,062	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85qn-T	X6	X5	0,087	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85pa-U	Y3	Y4	0,298	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85pa-V	Y5	Y6	0,393	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85pa-W	Y1	Y2	0,247	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85&&-X	467	481	0,319	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Paimpol
L85pa-Y	491	492	0,285	85-G2 Paimpol	85-G2 Paimpol
L85qn-Z	X7	X8	0	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85qn-AA	554	555	0	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc
L85tr-AB	454	457	0,5	85-G2 Trinité	85-G2 Trinité
L85qn-AC	465	466	0	85-G2 Quib. non-inoc	85-G2 Quib. non-inoc

* ? indique qu'un des géniteurs n'a pu être analysé (mort avant biopsie)

Cinquante-six géniteurs de la P85-G2 parmi les 74 analysés ont participé à la création de la P85-G3, et la plupart de la diversité génétique a été conservée à l'exception d'un allèle pour le locus *OeduJ12* et de 2 allèles pour le locus *OeduU2*. Sur les 29 familles produites, 12 sont issues de la sous-population Quiberon, 10 de la sous-population Paimpol, 2 de la sous-

population Trinité, 1 de la sous-population Quiberon Inoc, et 4 sont issus de croisements entre les sous-populations Quiberon et Paimpol.

Le Tableau V-12 résume les croisements réalisés pour former la P89i-G2. Les deux familles identifiées dans la P89i-G1 ont fourni le même nombre de géniteurs (11) et 7 croisements ont été réalisés en croisant des individus issus des 2 familles. Un seul croisement entre plein-frères a été réalisé. Des allèles ont été perdus à tous les locus (entre 1 au locus *OeduJ12* et 3 au locus *OeduH15*). Cependant, 4 autres géniteurs ont produit des familles par croisement avec des individus de la P89ni-G1, mais ils n'apportent pas plus de diversité aux locus étudiés.

Tableau V-12 : Croisements réalisés en 1995 pour produire la P89i-G2. Nom, origine et apparentement supposé des géniteurs

N° famille	parent 1 N°	parent 2 N°	Parent 1 Origine	Parent2 Origine	Apparentement
L89i.-AC	267	269	Fam1	Fam2	NR
L89i.-C	263	264	Fam1	Fam1	HS
L89i.-D	258	259	Fam2	Fam1	NR
L89i.-E	270	271	Fam1	Fam2	NR
L89i.-H	255	257	Fam1	Fam2	NR
L89i.-I	230	234	Fam2	Fam1	NR
L89i.-J	286	287	Fam1	Fam2	NR
L89i.-M	213	214	Fam1	Fam2	NR
L89i.-U	206	210	Fam2	Fam2	FS
L89i.-W	242	245	Fam1	Fam1	HS
L89i.-Y	289	290	Fam2	Fam2	HS

Fam1, Fam2 : voir Tableau V-6.

Apparentement estimé d'après le Tableau V-6 (NR = non apparenté, HS = Demi-frère, FS = Plein-frère)

En ce qui concerne la P89ni-G2 (voir Tableau V-13), 8 familles sont issues de croisements entre demi-frères et 5 sont issues de croisement entre plein-frères. Pour 3 familles, les relations de parenté entre les géniteurs n'ont pas pu être identifiées car l'un des parents est mort avant d'avoir pu être analysé.

Les différentes familles produites en 1996 ont donc des niveaux de consanguinité qui peuvent être très différents d'une famille à l'autre. Ce paramètre est à prendre en compte lorsqu'on va vouloir comparer entre elles ces différentes familles, comme on le verra au chapitre VIII.

Tableau V-13. Croisements réalisés en 1995 pour produire la P89ni-G2. Nom, origine et apparentement supposé des géniteurs

N° famille	parent 1 N°	parent 2 N°	Grands- parents	Grands- parents	Apparentement
L89ni-A	316	317	AxB	AxC	HS
L89ni-AA	355	356	AxC	AxC	FS
L89ni-AB	345	346	?	AxB	?
L89ni-AD	339	340	AxB	AxC	HS
L89ni-AE	343	344	AxC	AxB	HS
L89ni-F	327	328	?	AxB	?
L89ni-K	314	315	AxC	AxB	HS
L89ni-L	310	313	AxC	?	?
L89ni-N	300	301	AxB	AxB	FS
L89ni-O	362	363	AxB	AxC	HS
L89ni-P	347	353	AxB	AxC	HS
L89ni-Q	320	321	AxB	AxB	FS
L89ni-R	306	307	AxB	AxB	FS
L89ni-V	333	334	AxB	AxC	HS
L89ni-X	351	352	AxC	AxB	HS
L89ni-Z	323	337	AxB	AxB	FS

A, B : voir Tableau V-5.

Apparentement estimé d'après le Tableau V-5. NR = non apparenté, HS = Demi-frère, FS = Plein-frère

E. CONCLUSION : PISTES POUR LA GESTION FUTURE DES ANIMAUX

Les populations sélectionnées semblent avoir subi des goulots d'étranglements sévères et leur variabilité génétique est réduite par rapport à une population naturelle qui dérive de leur population d'origine. La P85 a probablement subi ce phénomène pendant 2 générations successives, et même si peu de variabilité a été perdue au moment de la production de la P85-G3, on peut craindre l'apparition de consanguinité, notamment dans les familles issues de la sous-population Paimpol. La P89ni-G1 est constituée de 2 familles impliquant l'une environ 6 fondateurs et l'autre 3 fondateurs, apparemment sans fondateur commun aux deux familles. Il semble que par hasard on ait limité la consanguinité en produisant la P89ni-G2 puisque la plupart des croisements impliquent un géniteur issu de chacune des deux familles. Pour la P89ni-G2, toutes les familles produites en 1995 sont issues de géniteurs fortement apparentés, soit demi-frères soit plein-frères. Or, il semble que le fardeau génétique soit important chez les bivalves, comme le montre l'étude de Bierne *et al.* (1997) sur des croisements consanguins. On peut donc craindre une baisse de performance dès la G2 pour la P89ni, aussi bien en survie (Ibarra *et al.*, 1995) qu'en croissance (Beattie *et al.*, 1987). L'impact de la consanguinité sur les paramètres de croissance sera étudié au Chapitre VIII.

Pour bien gérer la consanguinité, il apparaît donc nécessaire de prendre certaines précautions quant à la production des prochaines générations, avec en particulier une prise en compte et un suivi précis de la généalogie. Etant donné le faible nombre de géniteurs fondateurs, on pourra envisager d'augmenter la variabilité génétique dans les populations sélectionnées en introduisant dans le programme de nouveaux individus issus de populations naturelles bien choisies.

D'autre part, même si notre propos n'était pas directement d'étudier le niveau de résistance des populations sélectionnées vis-à-vis de la bonamiose, notons tout de même que les expériences d'inoculation de la maladie, réalisées en 1996 comme prévu par le programme, ont été fortement perturbées par des mortalités importantes lors de l'été 1996, mortalités corrélées à la présence d'*Herpesvirus* dans certaines familles. D'autre part, les animaux âgés de 1 an se sont révélés parfois trop petits pour supporter l'inoculation. Le schéma de sélection présenté sur la Figure V-1 doit donc être rediscuté, pour tenir compte des informations nouvelles apportées par ce travail, mais également pour tenter de s'adapter autant que possible aux menaces nouvelles d'*Herpesvirus* qui pèsent sur l'écloserie.

VI. STRUCTURATION DES POPULATIONS NATURELLES D'*OSTREA*

EDULIS

Nous allons, dans cette partie, étudier la structure génétique des populations naturelles de l'huître plate *Ostrea edulis* à l'aide de marqueurs neutres hypervariables, afin de compléter les données déjà obtenues sur la variabilité et les relations génétiques à l'intérieur de cette espèce à l'aide de marqueurs enzymatiques.

Les études génétiques existantes, et reposant uniquement sur l'étude des polymorphismes enzymatiques, ont montré comme nous l'avons vu au Chapitre I une certaine différenciation génétique entre Atlantique et Méditerranée (Jaziri, 1990; Saavedra *et al.*, 1993, 1995). Au sein de chaque mer, de très faibles différenciations apparaissent entre la Scandinavie et le reste de l'Atlantique (Johannesson *et al.*, 1989), et en Méditerranée entre ouest et est (Saavedra *et al.*, 1993, 1995), mais globalement la différenciation entre populations semble faible (Wilkins & Mathers, 1973 ; Buroker, 1982 ; Le Pennec *et al.*, 1985 ; Blanc *et al.*, 1986 ; Jaziri *et al.*, 1987 ; Saavedra *et al.*, 1987, 1993, 1995 ; Johannesson *et al.*, 1989). Ces résultats suggèrent deux conclusions : existence d'un fort flux génique, conduisant à l'homogénéisation de la variabilité génétique, puis d'un contact secondaire entre deux stocks, atlantique et méditerranéen, après séparation et évolution indépendante pendant les glaciations du Quaternaire. Cependant, l'ensemble de ces données ont été obtenues à partir de l'étude de marqueurs enzymatiques. Normalement, le flux génique affecte de manière homogène l'ensemble du génome, mais la sélection ou la mutation peuvent influencer la répartition des polymorphismes à certains locus. Ceci peut conduire à une hétérogénéité entre locus, certains montrant une forte différenciation géographique, d'autres non.

A. LES ALLOZYMES : MARQUEURS NEUTRES OU SELECTIONNES?

L'électrophorèse de protéines solubles sur gel d'amidon a été pendant près de 30 ans la technique privilégiée pour les études de génétique des populations. L'hypothèse qui a soutenu l'utilisation de ces marqueurs est que la majorité des polymorphismes aux locus allozymes (tout comme aux locus ADN) évoluent selon la théorie de neutralité (Kimura, 1990), et peuvent être interprétés à la lumière de cette théorie pour étudier les structures de populations, estimer les flux géniques et les apparentements génétiques. Pourtant, plusieurs études ont montré que la sélection naturelle pouvait agir sur certains locus enzymatiques

(Buroker *et al.*, 1979; Zouros *et al.*, 1980; Hilbish & Koehn, 1985; Mitton & Grant, 1984). Ces études portent essentiellement sur des animaux marins et plus particulièrement des bivalves qui, comme nous l'avons rappelé, montrent des populations de très grande taille, ce qui contrarie les effets de la dérive. En l'absence de dérive, les effets de sélection sont d'autant plus faciles à mettre en évidence.

Une possibilité pour tester l'effet de la sélection sur la distribution des polymorphismes enzymatiques est d'utiliser en parallèle deux types de marqueurs sur le même échantillonnage. Dans des populations qui se sont séparées suffisamment récemment pour que les mutations puissent être négligées, les variations géographiques due à la dérive de polymorphismes neutres sont une fonction de la taille des populations, de leur date de séparation et du taux de migration entre elles. Quand deux classes de marqueurs, comme par exemple les allozymes et les marqueurs ADN, révèlent différents niveaux de variation géographique, il est alors tentant de conclure que l'une des classes de marqueurs est affectée non seulement par la dérive, mais également par la sélection naturelle (Karl & Avise, 1992; Berry & Kreitman, 1993). Il existe deux études importantes comparant les différenciations génétiques inférées avec des locus enzymatiques d'une part et des marqueurs "neutres" (ADN mitochondrial ou marqueurs nucléaires anonymes) d'autre part, et elles ont conduit à remettre en cause la neutralité des polymorphismes enzymatiques chez les organismes marins : une étude de Karl & Avise (1992) sur la structuration des populations d'huîtres creuses *Crassostrea virginica* le long de la côte Atlantique des Etats-Unis et dans le Golfe du Mexique, et une étude de Pogson *et al.* (1995) sur le cabillaud *Gadus morhua*. Ces deux études sont l'un des principaux soutiens de l'hypothèse selon laquelle la variabilité génétique révélée par les allozymes est fortement influencée par la sélection naturelle. Il est donc important d'en rappeler le contenu et les critiques auxquelles elles se sont opposées.

1. *Crassostrea virginica* (Karl & Avise, 1992)

a) *Les faits*

L'exemple le plus frappant de la mise en évidence de la sélection sur les marqueurs allozymes est celui de l'huître américaine, *Crassostrea virginica*. Buroker (1983) observe peu de variation sur 14 locus enzymatiques sur des échantillons couvrant toute la côte Atlantique des Etats-Unis depuis le Massachusetts jusqu'au Texas, ce qu'il a attribué à d'importants flux géniques permis par l'existence d'une longue phase larvaire planctonique durant 2 à 3

semaines. Par contre, l'utilisation de marqueurs de l'ADN mitochondrial (ADNmt) montrait une discontinuité majeure entre les populations de l'Atlantique et celles du Golfe du Mexique (Reeb & Avise, 1990). Mais la nature même de l'ADNmt (et notamment sa transmission uniquement maternelle) rendant difficiles les interprétations de cette apparente contradiction, Karl & Avise (1992) ont utilisés 4 marqueurs ADN anonymes (Karl & Avise, 1993) en comparaison avec les études précédentes. Ils observent, avec les marqueurs ADN, une importante discontinuité dans les fréquences alléliques entre Atlantique et Golfe du Mexique, avec un point de rupture situé, comme pour les marqueurs mitochondriaux, le long de la côte est de la Floride. Dans une étude ultérieure (Hare & Avise, 1996), la zone précise du changement dans les fréquences alléliques aux locus ADN nucléaires a été précisément localisée comme une bande de 20 km de long au large du Cap Canaveral. Comme il n'y a pas de raison a priori de penser que la sélection puisse agir sur des marqueurs ADN anonymes, les auteurs concluent qu'il existe, dans le Golfe du Mexique d'une part et sur les côtes atlantiques d'autre part, deux populations qui sont de tailles suffisamment faibles, qui sont séparées depuis suffisamment longtemps et qui échangent suffisamment peu de migrants pour qu'elles aient pu se différencier par dérive. Ces résultats apparaissent cohérents avec l'histoire biogéographique du Golfe du Mexique et avec la structuration observée dans cette zone pour d'autres espèces inféodées au milieu côtier. Pour pouvoir montrer alors une si grande uniformité, les allozymes devraient alors subir des forces évolutives particulières et, pour tenir compte également du fait qu'il existe chez les mollusques des associations fortes entre hétérozygotie aux locus allozymiques et paramètres liés à la valeur sélective (voir chapitre suivant), les auteurs mettent en avant comme la plus probable l'hypothèse de sélection équilibrée. Il leur apparaît donc important de ne pas émettre de conclusions définitives sur des structures génétiques de populations ou des études de flux géniques en se basant sur un seul type de marqueurs.

b) Discussion

Ces résultats peuvent être discutés à deux niveaux : les résultats de Karl & Avise peuvent-ils être reproduits avec d'autres marqueurs nucléaires anonymes ? D'autre part, que peut-on dire sur la conclusion même que tirent Karl & Avise de leur résultats ?

Ce résultat est troublant car il requiert non seulement que la sélection équilibrée joue sur les 14 locus étudiés, mais aussi que, pour chaque locus, la sélection favorise les mêmes allèles

dans 2 environnements connus pour être pourtant différents (en température etc... et probablement pour d'autres variables environnementales). Une hypothèse explicative autre que la sélection balancée sur les allozymes pour expliquer ces résultats est que les marqueurs neutres utilisés par Karl & Avise (1992) ne représentent pas, pour des raisons qui restent à déterminer, de façon fiable le niveau de variabilité géographique révélé par les marqueurs ADN chez les huîtres. McDonald *et al.* (1996) ont complété ces données par une étude utilisant 6 nouveaux marqueurs ADN anonymes, qui n'ont pas montré plus de variation que les marqueurs allozymes. Bien que le F_{st} calculé sur les 4 marqueurs utilisés par Karl & Avise (1992) soit significativement plus important que celui calculé sur les locus allozymes, ce n'était pas le cas des F_{st} calculés sur les 6 autres marqueurs ADN anonymes. Ces résultats conduisent donc à envisager avec prudence l'hypothèse de sélection équilibrée pour expliquer l'uniformité apparente des fréquences allozymiques chez *C. virginica*.

D'autre part, il semble que la réalité même de l'absence de différenciation Atlantique/Golfe du Mexique révélée par les locus enzymatiques soit sujette à discussion. Buroker (1983) donne des valeurs de F_{st} moyennes de 0.029, 0.034 et 0.039 pour respectivement l'Atlantique, le Golfe du Mexique et l'ensemble de la zone, mais il est possible qu'il ait sous-estimé la divergence entre Atlantique et Golfe. Notamment, Buroker *et al.* (1979) rapportent des différences fixées pour deux locus enzymatiques entre ces deux zones, et une distance génétique moyenne $D=0.198$ entre des échantillons de Nouvelle-Ecosse (Canada) et de l'Ouest de la Floride. Ces mêmes auteurs, ainsi que Reeb & Avise (1990), citent par ailleurs des résultats non publiés de W.W. Anderson qui montrent une différenciation entre Golfe et Atlantique. Enfin, il semble que Karl & Avise n'utilisent pas l'ensemble des données citées dans Buroker (1983) mais seulement 18 locus (sur 22 utilisés) et 9 populations (sur 19 analysées). Hedgecock (non publié, comm.pers.) a évalué la diversité génétique à partir de 18 populations et 20 locus cités dans Buroker (1983). Une population et deux locus ont été omis pour cause de données manquantes. Cette analyse indique que la distance génétique moyenne entre Atlantique et Golfe du Mexique ($D=0.03$) est significativement plus élevée qu'au sein de chacune des deux zones ($D=0.025$ et 0.017 pour Atlantique et Golfe du Mexique respectivement). et d'autre part, la diversité génétique moyenne, estimée par le nombre d'allèles n_a et la diversité génique moyenne H_e , est significativement plus élevée pour le Golfe

du Mexique ($n_a=3.81\pm 0.08$, $H_e=0.358\pm 0.003$) que pour l'Atlantique ($n_a=3.38\pm 0.07$, $H_e=0.309\pm 0.003$).

2. *Gadus morhua* (Pogson *et al.*, 1995)

a) *Les faits*

Remarquant que souvent, dans les populations de poissons marins, une grande uniformité était trouvée au niveau des locus allozymes, uniformité expliquée par des flux géniques importants, Pogson *et al.* (1995) ont étudié le flux génique dans des populations de *Gadus morhua* en comparant la variabilité génétique révélée d'une part par 10 marqueurs allozymiques et d'autre part par 17 locus RFLP nucléaires. Ils ont trouvé que, contrairement aux locus allozymiques qui montraient une grande uniformité, les marqueurs ADN révèlent des différences significatives entre populations, en accord avec un modèle de structuration des populations du type isolement par la distance. Ils rejettent alors l'hypothèse de l'action d'un important flux génique pour expliquer l'homogénéité révélée par les marqueurs allozymes. Ils concluent finalement à une action de la sélection, affectant la distribution de la variation au niveau des protéines entre les populations naturelles chez cette espèce.

b) *Discussion*

Pogson *et al.* (1995) trouvent pour 6 populations de cabillaud une valeur de F_{st} moyenne de 0.069 pour les marqueurs RFLP et 0.014 pour les allozymes, les deux mesures étant statistiquement différentes. Cependant, seuls 2 locus RFLP donnent en fait des valeurs de F_{st} statistiquement différentes des allozymes, à savoir GM798 ($F_{st} = 0.309$) et GM738 ($F_{st}=0.142$). De plus, il semble que, suite à cette étude, Pogson ait découvert que le locus GM798 fait partie d'un gène codant pour une hormone (Fevolden & Pogson, 1997). Il semble donc qu'une conclusion possible pour expliquer le patron de différenciation observé dans ces populations n'est pas une sélection équilibrante sur les locus allozymes qui homogénéiserait les fréquences alléliques, mais au contraire une sélection sur certains allèles d'un locus ADN anonymes en fonction de certaines conditions de milieu.

En conséquence, même si on s'attend a priori à révéler avec les microsatellites davantage de variabilité qu'avec les allozymes, il ne faudra envisager qu'avec précaution l'hypothèse de sélection sur les allozymes.

B. NOTIONS DE GENETIQUE DES POPULATIONS**1. Equilibre de Hardy-Weinberg****a) Définition**

Cette loi centrale de la génétique des populations a été formulée indépendamment par l'anglais Hardy et l'allemand Weinberg en 1908. Elle peut être énoncée comme suit :

Soit une population de taille infinie, et dans cette population un gène possédant 2 allèles A et a de fréquences respectives p et q ($p+q=1$). En l'absence de mutation, de migration et de sélection, et si tous les individus se croisent aléatoirement (panmixie), alors les fréquences alléliques ne changent pas d'une génération à l'autre et les fréquences génotypiques se déduisent directement des fréquences alléliques. Les fréquences des génotypes AA, Aa et aa sont alors respectivement p^2 , $2pq$ et q^2 .

On dit alors que la population est à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Cette loi se généralise facilement à plusieurs allèles. Dans le cas d'un locus à plusieurs allèles (A_1, A_2, \dots, A_n), les fréquences génotypiques sont issues directement du développement du binôme $(p_1+p_2+\dots+p_n)^2$. La fréquence d'un homozygote A_iA_i est alors p_i^2 et la fréquence d'un hétérozygote A_iA_j est alors $2p_i p_j$.

b) Ecart à l'équilibre de Hardy-Weinberg : quelles causes ?

Si l'équilibre d'Hardy-Weinberg n'est pas observé dans une population, cela signifie qu'une au moins des hypothèses n'est pas vérifiée. Cela peut être dû alors soit à une sélection sur certains allèles ou génotypes, soit à un mode de reproduction différent de la panmixie, soit encore à la présence dans l'échantillon de plusieurs sous-populations avec des fréquences alléliques différentes (effet Wahlund, Wahlund, 1928).

Par ailleurs, quand on utilise des marqueurs moléculaires pour décrire la variabilité génétique dans une population, le fait d'observer plus d'homozygotes qu'attendu sous l'équilibre de Hardy-Weinberg peut également être lié à une non-détection du polymorphisme. Des phénomènes biologiques tels que l'aneuploïdie (perte d'un fragment de chromosome ou d'un chromosome entier, Thiriot-Quievreux, 1986) ou techniques tels que l'existence d'allèles nuls

ou silencieux (non visualisés, Foltz, 1986) peuvent conduire à une surévaluation de la fréquence des homozygotes.

Par contre, le fait de ne pas observer de déviation n'implique pas que la population étudiée vérifie les hypothèses de départ. Ainsi, des écarts faibles ne seront pas forcément détectés. Il est également possible que plusieurs hypothèses ne soient pas vérifiées en même temps, mais que leurs effets se compensent (Guo & Thompson, 1992).

2. Populations structurées

On peut définir une population comme un ensemble d'individus de la même espèce entre lesquels les croisements sont libres. Les généticiens des populations ont développés des modèles décrivant la structure des populations dispersées. Ces modèles peuvent être départagés en deux grands types : ceux décrivant une structure continue dans l'espace et ceux qui prennent en compte des populations subdivisées en populations discrètes. Ces modèles permettent de faire des prédictions sur l'équilibre entre la dérive (changements des fréquences alléliques entre générations sous l'effet du seul hasard) et les flux de gènes (tout mouvement des gènes dans l'espace entre les populations).

a) Analyse de la structuration des populations

Les méthodes directes d'étude de la structure des populations (et notamment des flux de gènes) reposent sur l'observation directe des individus. Si les individus sont identifiables, il est possible d'analyser les flux migratoires et de dispersion. Cependant cette méthode souffre de différents biais pour estimer le flux de gènes ; par ailleurs elle est limitée dans le temps (l'impact du flux de gènes en termes évolutifs devrait se mesurer sur un grand nombre de générations) et dans l'espace (problème de l'échelle géographique à retenir) (Slatkin, 1987).

Les méthodes indirectes reposent sur l'observation de la répartition géographique des fréquences alléliques de marqueurs moléculaires (allozymes, RAPDs, RFLPs, microsatellites...). Il est nécessaire de disposer de modèles mathématiques permettant de corréler les observations brutes (génotypes, séquences...) avec des conclusions en terme de structure génétique ou de flux de gènes

(1) Les statistiques F de Wright

Wright (1931, 1951, 1965) a mis au point un ensemble de paramètres, connus sous le nom de statistiques F, permettant de décrire la répartition de la variabilité génétique entre les populations et à l'intérieur de ces populations, et de la mettre en relation de manière relativement simple avec les flux géniques à l'équilibre. Ceci constitue la méthode la plus utilisée actuellement en génétique des populations.

A l'origine, Wright a défini le paramètre F en tant qu'indice de fixation, pour mesurer la perte d'hétérozygotie dans des croisements présentant une certaine part de consanguinité. F représente la corrélation entre allèles portés par des gamètes s'appariant sous un système de reproduction donné, et en fonction des fréquences alléliques dans l'ensemble des populations dérivées de la population ancestrale.

Comme F mesure la perte d'hétérozygotie par rapport à la panmixie, on montre, dans le cas d'un locus à deux allèles A et a, que les proportions attendues pour chacun des trois génotypes AA, Aa et aa ne sont plus p^2 , $2pq$ et q^2 mais p^2+Fpq , $2pq(1-F)$ et q^2+Fpq respectivement.

F varie en théorie de -1 à 1. Les valeurs négatives correspondent à des excès d'hétérozygotes, 0 signifie l'équilibre panmictique et les valeurs positives correspondent à un déficit en hétérozygotes.

Dans le cas d'un ensemble de populations subdivisées, Wright a défini trois coefficients qui ventilent la variabilité génétique dans un ensemble de populations :

- ◆ F_{st} (pour *sous-population* et *total*) mesure la différenciation génétique entre populations
- ◆ F_{is} (pour *individu* et *sous-population*) mesure les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg à l'intérieur de chaque population
- ◆ F_{it} (pour *individu* et *population*) mesure les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg sur l'ensemble de la collection d'individus sans tenir compte dans le calcul de la structuration en populations

La différence entre F_{is} et F_{it} tient uniquement à l'unité d'échantillonnage. Par contre, F_{st} est de nature différente des deux autres (c'est un rapport de variance, toujours positif)

Ces trois paramètres sont liés entre eux par la relation suivante :

$$1-F_{it}=(1-F_{is})(1-F_{st})$$

(a) *Approche de Nei (1973)*

Nei a proposé d'estimer la variabilité génétique par un terme qu'il appelle "diversité génique" ou "hétérozygotie attendue" qu'il définit de la façon suivante:

$$H_e = 1 - \sum x_i^2$$

où x_i est la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle. Cela correspond à l'hétérozygotie attendue à l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Nei définit alors un terme qui correspond au F_{st} de Wright, et qu'il appelle G_{st} , par la formule suivante:

$$G_{st} = (H_t - H_s) / H_t$$

où H_t est la diversité de la population totale et H_s la diversité moyenne d'une population.

Nei (1973) remarque que ce G_{st} est en fait égal à une moyenne des F_{st} alléliques de Wright où chaque allèle serait pondéré par le produit $p_i(1-p_i)$.

Il a également redéfini les deux autres indices de Wright en terme d'hétérozygotie attendue et observée, de la façon suivante:

$$F_{it} = (H_t - H_o) / H_t \text{ et } F_{is} = (H_s - H_o) / H_s$$

où H_o est l'hétérozygotie moyenne observée

(b) *Approche de Weir & Cockerham (1984)*

Cockerham (1969) puis Weir & Cockerham (1984) ont étudié la correspondance entre les paramètres F définis par Wright et les composantes de la variance des fréquences alléliques dans les populations structurées. Ils définissent trois paramètres, égaux respectivement à F_{st} , F_{is} et F_{it} , qui peuvent être estimés par le biais d'une analyse de variance:

- θ la corrélation des allèles de différents individus dans une même sous-population
- f la corrélation des allèles d'un même individu dans une sous-population donnée
- F la corrélation des allèles au sein des individus sur l'ensemble des sous-populations

Pour estimer ces paramètres, considérons un modèle à r sous-populations de même taille, dérivées d'une population ancêtre à l'équilibre de Hardy-Weinberg et en équilibre de liaison, les sous-populations étant supposées n'avoir différencié les unes des autres que sous l'effet de la

dérive génétique et de la dérive d'échantillonnage. Pour le cas d'un locus à deux allèles, les composantes de la variance sont:

- a la composante de la variance entre les sous-populations
- b la composante de la variance au sein des sous-populations
- c la composante de la variance au sein des individus

et les estimateurs des paramètres θ , f et F sont:

$$\hat{\theta} = \frac{a}{a+b+c}$$

$$1-\hat{f} = \frac{c}{b+c}$$

$$1-\hat{F} = \frac{c}{a+b+c}$$

Ces estimateurs dépendent de la taille des populations et de leur histoire mais sont indépendants de la stratégie d'échantillonnage (nombre d'individus par population, nombre de populations, nombre d'allèles par locus). Ces estimations se généralisent à plusieurs allèles et plusieurs locus. Par ailleurs, l'estimateur de θ est un estimateur sans biais de F_{st} dans le cas d'un modèle en île, ou chaque population est censée représenter une réalisation particulière du même processus d'équilibre entre migration et dérive.

- (2) Autres méthodes d'analyse de la structure génétique :
quel indice pour les microsatellites?

Slatkin (1995) a proposé un analogue au F_{st} pour estimer la part de la variabilité génétique due aux variations entre populations dans le cas particulier de l'utilisation de locus microsatellites. Cette mesure, appelé R_{st} , incorpore l'information sur la taille des allèles. De ce fait, cette mesure est supposée plus informative sous l'hypothèse d'une mutation de type SMM, et quand les temps de divergence estimés sont grands (Slatkin, 1995). Cependant, cet indice est très sensible aux écarts du modèle de mutation par rapport à un SMM strict. Ruzzante (1998) a comparé les variances d'échantillonnage pour les deux indices en fonction des tailles d'échantillon. Les variances pour les deux indices décroissent sensiblement quand les tailles d'échantillons augmentent. Cependant, les variances des estimations de R_{st} dans des

comparaisons par paires peuvent être très importantes quand les échantillons ne sont pas de même taille, même quand ces tailles sont grandes ($N > 50$), ce qui a également été observé par Bentzen *et al.* (1996). Quand il y a de grandes différences dans les tailles d'échantillons, et quand la taille moyenne des échantillons est faible (> 50), F_{st} semble être la mesure préférentielle pour la structuration des populations.

En conséquence, c'est cette mesure (F_{st}) que nous avons retenue dans cette étude.

C. MATRIELS ET METHODES

1. Echantillonnage

13 populations naturelles d'*Ostrea edulis* ont été échantillonnées sur les côtes atlantique (de la Norvège au Portugal) et méditerranéenne (Nord Méditerranée). Par "population naturelle", nous entendons soit une population n'ayant pas subi d'exploitation au cours d'un passé récent, soit une population exploitée pour l'ostréiculture à partir de captage naturel local. Autant que possible, nous avons exclu les populations qui avaient subi des apports d'animaux de provenances géographiques différentes.

Les données connues sur les différents échantillons sont présentées dans le Tableau VI-1 et leur localisation géographique sur la Figure VI-1.

Tableau VI-1: Caractéristiques des échantillons

Origine géographique	Code	Effectif
Atlantique Nord		
Norvège	OSL	48
Pays-Bas	PBA	27
Irlande-Nord	IRN	50
Irlande-Sud	IRS	50
Normandie	NOR	34
Atlantique Sud		
Quiberon	QUI	49
La Rochelle	ROC	44
Espagne (Galice)	GAL	35
Portugal	POR	14
Méditerranée Ouest		
Etang de Thau	THA	50
Port Saint Louis du Rhône	RHO	50
Méditerranée Est		
Venise	VEN	23
Croatie	CRO	50

Les échantillons ont été regroupés en fonction de leur origine géographique : Atlantique Nord, Atlantique Sud, Méditerranée Ouest, Méditerranée Est.

↳ Atlantique Nord:

- Norvège. Le site d'Oslofjorden (à l'intérieur du fjord menant vers Oslo) n'a pas connu d'ostréiculture depuis au moins 50 années (S.Mortensen, comm.pers.)
- Irlande. Une population provient du nord de l'Irlande, du site de Lough Foyle (baie fermée) où les gisements naturels sont exploités par pêche des individus de taille commerciale. L'autre population vient du sud du pays, de la région de Cork.
- Pays-Bas. La population étudiée provient de la mer intérieure de Grevelingen
- Normandie

↳ Atlantique Sud:

- Bretagne Sud. Les animaux proviennent de captage ostréicole en Baie de Quiberon en 1993.
- La Rochelle. Les animaux ont été collectés par dragage de gisements naturels non exploités au large de La Rochelle.
- Espagne (Galice).
- Portugal (Algarve).

↳ Méditerranée Ouest

- Etang de Thau. L'étang de Thau a connu au cours des dernières décennies d'importants transferts d'animaux depuis les côtes atlantiques. L'échantillon a été collecté par dragage sur les bancs "naturels" (ou devenus tels?)
- Port-Saint Louis du Rhône. L'échantillon a été obtenu par dragage en mer profonde.

↳ Méditerranée Est

- Italie (Venise). L'échantillon provient d'un site de captage local pour exploitation ostréicole

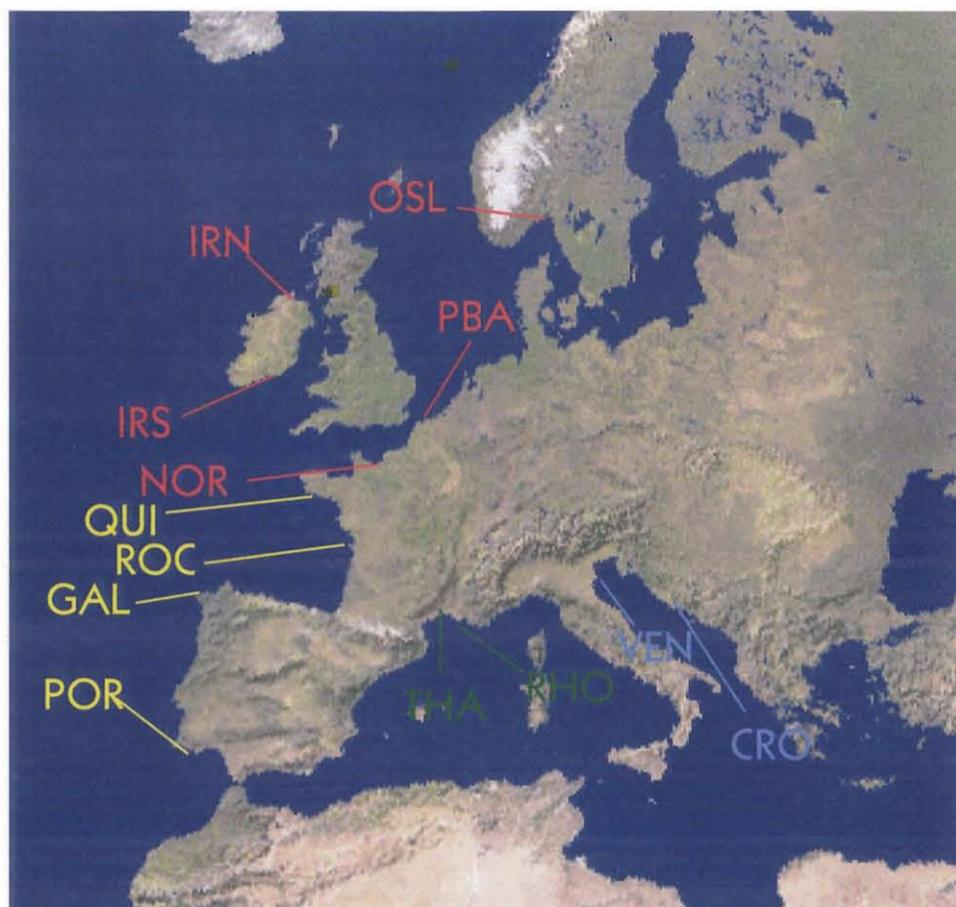


Figure VI-1 : Répartition géographique des populations naturelles d'*Ostrea edulis* échantillonnées

➤Croatie. L'échantillon provient d'un site de captage local pour exploitation ostréicole dans la région de Dubrovnik

Après échantillonnage, un fragment de branchies est prélevé localement sur chaque animal et placé dans l'éthanol à 95% puis envoyé au laboratoire. Trois populations (Pays-Bas, Quiberon, Portugal) font exception, les animaux ayant été envoyés vivants au laboratoire. Dans ce cas, un fragment de branchies a été également prélevé par biopsie puis congelé.

2. Analyses génétiques

Les extractions d'ADN ont été réalisées sur un fragment de branchie congelée ou conservé dans l'alcool par la méthode du Chelex (voir Annexe D). Cinq locus ont été analysés sur l'ensemble des individus : *OeduJ12*, *OeduH15*, *OeduU2*, *OeduO9* et *OeduT5*. Les conditions de PCR sont identiques à celles décrites dans le chapitre III et rappelées en Annexe D.

Afin de minimiser les erreurs de lecture, chaque gel a été relu 2 fois (mais par la même personne...). Quand un génotype posait problème (deux lectures différentes), l'analyse a été refaite qui dans tous les cas a confirmé une des deux lectures. Le pourcentage d'erreurs a été estimé en dessous de 1%. Une double analyse a été effectuée sur tous les individus génotypés comme homozygotes.

3. Analyses statistiques

a) Mesures de variabilité

La variabilité génétique au sein des populations a été estimée par plusieurs mesures :

- le nombre d'allèle par locus et par échantillon
- le nombre moyen d'allèles par locus
- l'hétérozygotie observée H_o qui est la fréquence des individus hétérozygotes à chaque locus
- l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Nous utiliserons la formule de l'hétérozygotie non biaisée H_{nb} (Nei, 1987) :

$$H_{nb} = [2n/(2n-1)].(1-\sum x_i^2)$$

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

Ces descripteurs de la variabilité génétique sont calculés à l'aide du logiciel Genetix (Belkhir *et al.*, 1996).

L'analyse a été effectuée par locus et par population, mais également en regroupant les populations par régions (Atlantique Nord, Atlantique Sud, Méditerranée Ouest, Méditerranée Est) d'après les regroupements effectués par Saavedra *et al.* (1993, 1995).

b) Déséquilibre de liaison

Nous avons étudié les déséquilibres de liaison sur les 13 échantillons ainsi que pour l'ensemble des populations, pour les 5 locus soit 10 combinaisons de locus deux à deux, ce qui donne au total 140 tests possibles.

Pour tester les déséquilibres de liaison pour un système multiallélique, et notamment quand des allèles rares sont présents, le test du χ^2 n'est pas adapté. Il est possible de regrouper les allèles les moins fréquents, mais la perte d'information est importante. Nous avons utilisé ici un test par permutations, qui permet de générer une distribution théorique des coefficients de corrélation (R) sous l'hypothèse nulle d'indépendance des deux locus ($R=0$).

Le calcul des coefficients de corrélation et les tests associés ont été effectués à l'aide du logiciel Genetix, qui reprend les algorithmes du programme "LinkDis" de Black & Krafur (1985).

c) Mesure de la différenciation génétique par les statistiques F de Wright

Les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été mesurés par l'indice de fixation de Wright F_{is} estimé selon Weir & Cockerham (1984). La différenciation des populations a été estimée par l'indice de fixation F_{st} estimé selon Weir & Cockerham.

Il existe plusieurs tests permettant d'estimer la significativité des valeurs des statistiques F : le test du χ^2 (Brown, 1970; Workman & Niswander, 1970), les tests par bootstrap permettant de construire des intervalles de confiance à 95% (Weir, 1990) et les procédures de permutations (Roff & Bentzen, 1989; Hudson *et al.*, 1992, Goudet, 1995). Dans cette étude, nous avons utilisé le logiciel Genetix qui effectue des tests par permutation. Pour tester l'hypothèse nulle

Fis = 0, on effectue une permutation des allèles à l'intérieur des populations : pour chaque locus, une urne gamétique est construite à partir des allèles des individus de la population. Le tirage aléatoire dans cette urne permet de reconstruire les génotypes monolocus en simulant la panmixie. Pour tester l'hypothèse nulle $F_{st} = 0$, on effectue des permutations des individus sur l'ensemble des échantillons pour le F_{st} . Dans ce dernier cas, les génotypes multilocus sont conservés, ce qui permet de s'affranchir de la non-indépendance des allèles à l'intérieur des individus quand le Fis est différent de 0. La valeur observée sur les données réelles est ensuite comparée à la distribution obtenue, et permet d'avoir une estimation de la probabilité d'obtenir une valeur supérieure ou égale à la valeur observée sous H_0 . Les tests ont été effectués avec 1000 permutations.

d) Distances génétiques

Nous avons estimé la différence entre groupe par la distance génétique de Reynolds par paire de populations :

$$D = -\ln(1-F_{st})$$

Cette distance est bien adaptée pour comparer des populations faiblement différenciées (Reynolds *et al.*, 1983).

A partir d'une matrice de distances, il est possible de reconstruire un arbre improprement appelé "phénétique". Ce type de reconstruction donne une image correcte si l'arbre obtenu permet d'expliquer les données à partir desquelles il est construit, et si des événements évolutifs peuvent être interprétés à partir de celui-ci.

Différents algorithmes de reconstruction phylogénétique ont été développés. La plus ancienne méthode est la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method; Sneath & Rohlf, 1973). Nous avons utilisé la méthode des plus proches voisins dite "Neighbor-Joining" (Saitou & Nei, 1987), qui produit un arbre non raciné. A partir d'un arbre en étoile dont chaque branche correspond à une UTO (unité taxonomique opérative), l'algorithme recherche la configuration qui minimise la taille totale de l'arbre, en traitant la matrice des distances selon un modèle additif. Dans un premier temps, il recherche les deux UTOs les plus proches, puis les groupe et calcule une nouvelle matrice de distances. Sur cette nouvelle matrice, les deux UTOs les plus proches sont à nouveau identifiées, et le processus est poursuivi jusqu'à ce que toutes les UTO soient agglomérées.

e) *Estimation du flux génique*

Le flux génique est le transfert de matériel génétique entre les populations, correspondant à des mouvements efficaces des individus ou de leurs gamètes. Classiquement, on exprime le flux génique, non pas simplement par la proportion de migrants échangée à chaque génération, m , mais par le nombre de migrants échangés par génération, $N_e m$. Les estimations du flux génique sont basées sur les distributions spatiales d'allèles supposés neutres, selon une approche statistique basée sur l'espérance à l'équilibre, sous les conditions d'un modèle théorique de structure des populations. Différents modèles de structures des populations existent. L'un est le modèle en îles (Wright, 1931), où l'espèce est supposée être subdivisée en différentes sous-population (ou dème) qui échangent des allèles avec la même probabilité. Les fréquences alléliques sur l'ensemble de la population ne changent pas, mais chaque dème est soumis à la dérive génétique et à la migration. Un autre modèle de structure populationnelle est le modèle dit en "stepping-stone" (Kimura, 1953), où les populations ne peuvent échanger des individus qu'avec leurs plus proches voisins. Enfin, Wright (1943) définit le modèle d'isolement par la distance pour décrire une situation d'équilibre entre dérive génétique et flux génique dans une population dont la densité est spatialement uniforme et où la distance parcourue par les migrants à chaque génération est suffisamment petite par rapport à l'étendue de la population.

L'intérêt du paramètre $N_e m$ est que sous l'hypothèse de neutralité, et à l'équilibre, le niveau de divergence des populations est fonction du nombre de migrants.

Différentes méthodes existent pour calculer $N_e m$: à partir des F-statistiques de Wright (1969); par la méthode du maximum de vraisemblance (Slatkin & Barton, 1989); par la méthode des allèles privées (Slatkin, 1985) qui utilise les allèles n'existant que dans une population, méthode qui n'est pas adéquate si le taux de mutation est trop élevé; ou à partir des phylogénies de gènes (Slatkin & Maddison, 1989). Il faut noter qu'aucune de ces méthodes ne permet d'inférer une estimation précise du flux de gènes entre dèmes, mais seulement un ordre de grandeur des échanges (flux génique important, modéré ou faible).

De manière générale, on peut procéder en deux étapes

- rechercher un isolement par la distance au sens large. Slatkin (1993) note que la courbe représentant le logarithme de la distance géographique entre populations en fonction du logarithme du nombre de migrants (sous l'hypothèse d'un modèle en île) est une droite de

penne non nulle. Nous avons utilisé le test de Mantel (1967) qui permet de déterminer s'il y a corrélation des deux matrices, par exemple celle des distances génétiques et celle des distances géographiques. La valeur d'un paramètre de corrélation, r , entre les deux matrices (X et Y), est calculée à partir des données réelles, puis comparée à la série de valeurs obtenues par permutations aléatoires de l'ordre des populations dans l'une des deux matrices de distance.

S'il n'y a pas de relation entre les deux matrices de distances, la valeur de r obtenue sur les données réelles ne s'écartera pas de la distribution des r obtenus après permutations. Dans le cas contraire, on rejette l'hypothèse nulle d'absence de corrélation.

Les analyses ont été effectuées avec le programme Mantel dérivé de Fstat (Goudet, 1995)

Selon les recommandations de Rousset (1997), l'indice de distance utilisé est $F_{st}/1-F_{st}$, qui a été testé contre la matrice des distances géographiques, mesurées au curvimètre sur un atlas.

- Estimer le nombre de migrants d'après les formules théoriques correspondant au modèle de populations.

Sous l'hypothèse d'un équilibre mutation/dérive, d'un modèle en nombre infini d'îles, d'un taux de mutation négligeable par rapport à la taille efficace N_e et si $m \ll 1$, F_{st} est relié simplement à une mesure du flux de gènes $N_e m$ selon la formule

$$F_{st} = 1/(1+4N_e m)$$

f) Estimation des tailles efficaces

La taille efficace (N_e) peut se définir comme la taille d'une population idéalisée (Hartl & Clark, 1989) qui aurait les mêmes propriétés génétiques que la population observée (mêmes fréquences alléliques, même taux d'hétérozygotie...). N_e est généralement beaucoup plus petit que l'effectif total réel de la population, les différences pouvant être liées à des paramètres de la reproduction et à l'histoire des populations (sex-ratio biaisé, fluctuations démographiques, variations dans la fertilité individuelle, etc...).

L'estimation de l'effectif efficace est fortement dépendant du modèle de mutation considéré. Sous le modèle IAM, Crow & Kimura (1970) montrent que l'hétérozygotie peut être estimée

par $H=4N_e\mu/(4N_e\mu+1)$, d'où une expression simple permettant d'estimer N_e à partir de l'hétérozygotie et du taux de mutation μ :

$$N_e = [H/(1-H)]/4\mu$$

Sous le modèle SMM, Ohta & Kimura (1973) ont montré que l'hétérozygotie à l'équilibre mutation/dérive peut s'écrire $H = 1-(1/(1+8N_e\mu)^{0.5})$; d'où :

$$N_e = [1/(1-H)^2]-1]/8\mu$$

On a ainsi, selon le modèle de mutation envisagé, une estimation de la taille efficace qui est directement fonction de H (hétérozygotie attendue) et de μ (taux de mutation). Des études récentes (Dallas, 1992; Ellegren, 1995) indiquent que les taux de mutation des microsatellites sont en général compris entre 10^{-2} et 10^{-5} . En l'absence de données sur les taux de mutation des microsatellites chez *Ostrea edulis*, nous avons retenu une valeur moyenne de 10^{-4} .

D. RESULTATS

1. Déséquilibre de liaison.

Les résultats des tests de liaison sont présentés dans le Tableau VI-2, qui ne donne que les valeurs significatives. Un test de Bonferroni (Rice, 1989) est appliqué sur ces résultats. Dix tests ont été effectués pour chaque population avec, pour chacun de ces tests, une valeur $\alpha = 0.05$. Ce seuil est donc ramené à $0.05/10$ soit 0.003 . Sur les 140 tests réalisés, 1 seul est significatif au seuil indiqué (pour mémoire : déséquilibre de liaison de 0.13 entre *OeduU2* et *OeduH15* dans la population RHO). On ne peut alors pas supposer l'existence de déséquilibre de liaison dans les populations naturelles.

Tableau VI-2 : Coefficients de corrélation associés aux tests de déséquilibre de liaison

Pop	OSL	IRN	IRS	QUI	ROC	GAL	THA	RHO	CRO	VEN
J12/U2			0.19**							
J12/H15		0.14*	0.18*						0.13*	
J12/O9							0.13*			
J12/T5						0.18*				
U2/H15								0.13**		
U2/O9					0.15*					
U2/T5									0.22*	
H15/O9	0.17*		0.15*			0.20*				0.33**
H15/T5										
O9/T5	0.16*			0.13*						

Seules les valeurs significatives sont indiquées. Seuil de signification : * : $p < 0.05$, ** $p < 0.01$
en gras : valeurs significatives après correction de Bonferroni

2. Variabilité intra-population

a) Polymorphisme

Les fréquences alléliques par locus et par population sont données en Annexe F.

Le nombre total d'allèles pour chacune des 4 régions géographiques (Atlantique Nord et Sud, Méditerranée Ouest et Est) est donné dans le Tableau VI-3.

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

Région	N	J12	U2	H15	O9	T5	N_{am}
Atlantique N	154	25	31	16	21	28	24.2 (5.3)
Atlantique S	181	23	32	18	22	27	24.4 (4.8)
Méditerranée W	99	25	30	16	24	27	24.4 (4.7)
Méditerranée E	73	24	31	17	25	25	24.4 (4.5)

Le nombre moyen d'allèles est le même pour chacune des 4 régions (24.4 allèles par locus en moyenne), mais l'effectif est beaucoup plus important pour l'Atlantique. Nous avons utilisé le programme d'estimation par bootstrap du nombre d'allèles dans un sous-échantillonnage d'une population, programme décrit au chapitre V, pour comparer le nombre d'allèles dans chacune des zones géographiques pour un effectif identique (ici : 73 individus qui est le plus petit effectif étudié). Les courbes d'évolution du nombre d'allèles en fonction de la taille de l'échantillon sont données en Annexe G pour chacune des zones Atlantique Nord (AtlN), Atlantique Sud (AtlS), Méditerranée Ouest (MedW) et Méditerranée Est (MedE). Pour trois locus (*OeduT5*, *OeduO9*, *OeduU2*), MedE et MedW ont plus d'allèles que AtlN et AtlS. Pour les deux autres locus, MedE a la richesse allélique la plus élevée, suivi de MedW/AtlS, et enfin AtlN est l'échantillon le moins polymorphe.

b) Répartition des fréquences alléliques

Les 13 échantillons (comptant 507 individus) ont été regroupés et les distributions des fréquences alléliques sur les différents locus sont données sur les Figures VI-2 et VI-3. La distribution pour le locus *OeduO9* est proche d'une distribution normale, mais tous les autres locus montrent des distributions multimodales. On n'observe pas de discontinuité majeure dans les distributions et les pas entre allèles correspondent dans tous les cas à une répétition du motif de base (dinucléotide pour tous les locus sauf *OeduH15* qui est un tétranucléotide).

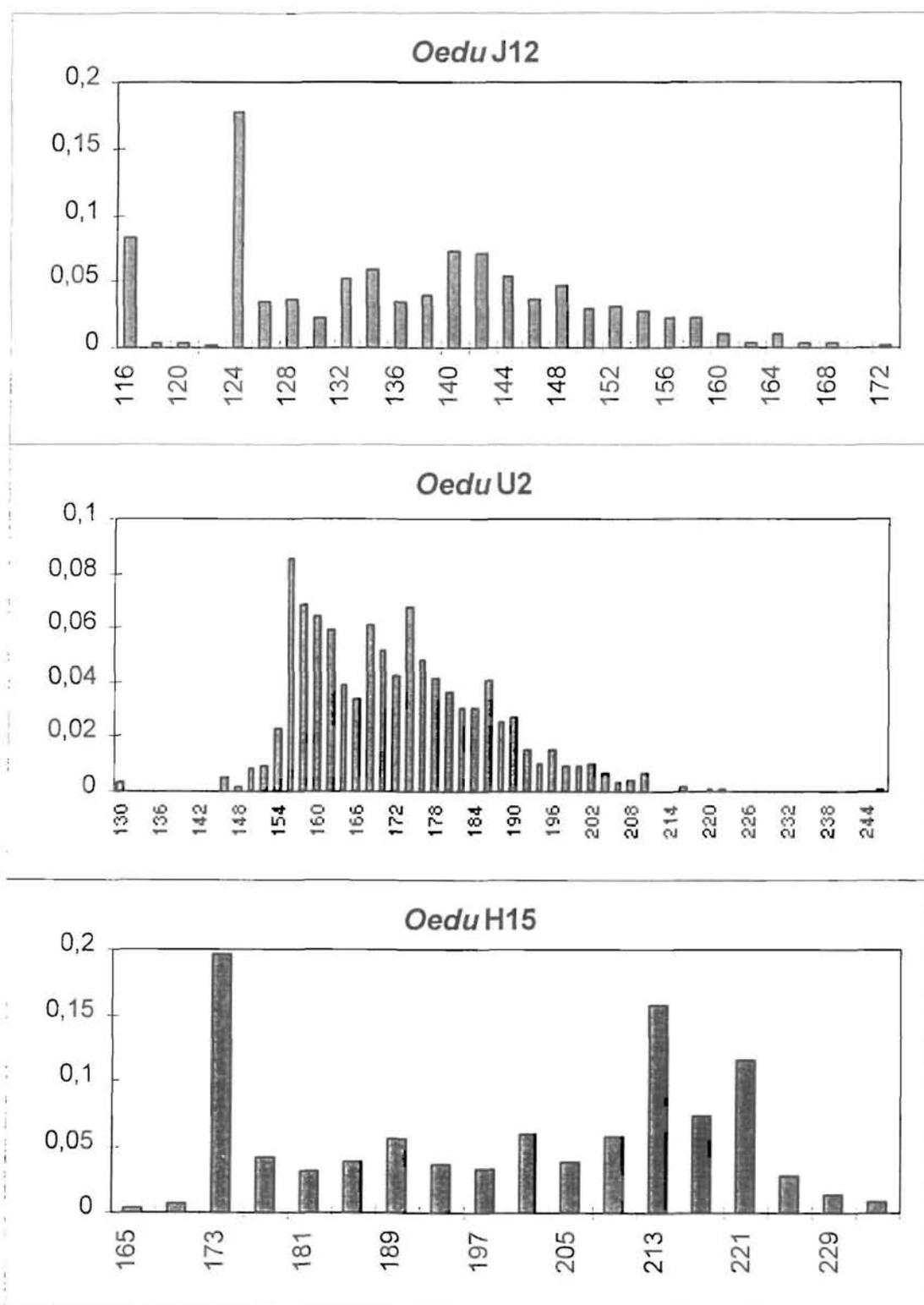


Figure VI-2 : Fréquences alléliques aux locus microsatellites *OeduJ12*, *OeduU2* et *OeduH15* sur l'échantillonnage total des populations naturelles d'*Ostrea edulis*

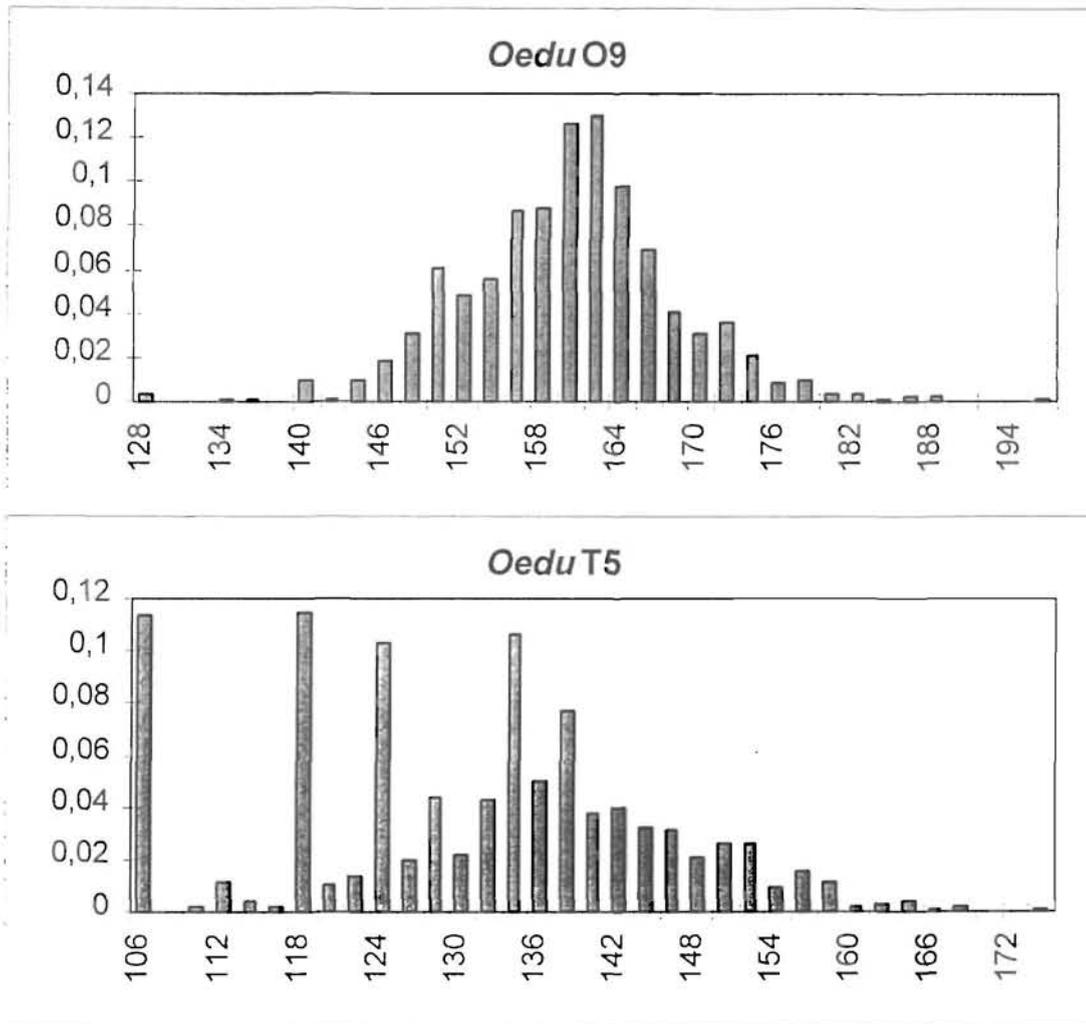


Figure VI-3 : Fréquences alléliques aux locus microsatellites *OeduO9* et *OeduT5* sur l'échantillonnage total des populations naturelles d'*Ostrea edulis*

c) *Taux d'hétérozygotie*

Les valeurs d'hétérozygotie moyenne observée et attendue sont rappelées dans le Tableau VI-4. L'hétérozygotie moyenne attendue, sur tous les locus, est de 0.91 ± 0.04 , soit une valeur considérablement plus élevée que pour les allozymes. Globalement, l'hétérozygotie moyenne observée est inférieure à l'hétérozygotie théorique attendue au vu des fréquences alléliques, et ceci pour toutes les populations, à l'exception des populations du Portugal (POR) et de Port-Saint-Louis du Rhône (RHO).

Tableau VI-4 : hétérozygoties moyennes par locus, observée (Ho) et attendue (Hnb). 'Entre parenthèses, écart-type).

Population	Ho	Hnb
OSL	0.79 ± 0.24	0.86 ± 0.09
PBA	0.81 ± 0.11	0.91 ± 0.02
IRN	0.78 ± 0.14	0.91 ± 0.02
IRS	0.83 ± 0.09	0.90 ± 0.03
QUI	0.83 ± 0.09	0.91 ± 0.02
NOR	0.87 ± 0.04	0.92 ± 0.03
ROC	0.84 ± 0.05	0.91 ± 0.04
GAL	0.83 ± 0.18	0.89 ± 0.03
POR	0.92 ± 0.09	0.93 ± 0.02
THA	0.86 ± 0.1	0.92 ± 0.02
RHO	0.88 ± 0.03	0.88 ± 0.1
CRO	0.86 ± 0.14	0.93 ± 0.05
VEN	0.81 ± 0.21	0.92 ± 0.05

Un test statistique pour le déficit en hétérozygotes est proposé sur le Tableau VI-5, qui donne les valeurs de Fis (estimée selon Weir & Cockerham, 1984) et la probabilité associée aux tests sur permutons. On applique une correction de Bonferroni sur ces données; en considérant que les populations et les locus sont indépendants, la valeur seuil devient $\alpha = 0.05/65 = 0.0007$ pour les tests monolocus et $\alpha = 0.05/13 = 0.004$ pour les tests multilocus. Tous les tests multilocus restent positifs, mais pour les tests monolocus, seuls ceux notés *** sont significatifs. Sur l'ensemble des locus, toutes les populations montrent des déficits en hétérozygotes par rapport aux proportions attendues sous Hardy-Weinberg, déficits qui sont significatifs pour toutes les populations à l'exception encore de POR et RHO. Cependant, si on calcule les Fis locus par locus, la situation apparaît différente selon les locus et selon les populations. Les locus *OeduU2*, *OeduO9* et *OeduT5* montrent alternativement des Fis positifs ou négatifs, et rarement significatifs. Au locus *OeduJ12*, on observe surtout des valeurs de Fis positives, qui sont significatives dans la moitié des cas. Par contre, des déficits en hétérozygotes significatifs sont observés pour tous les échantillons au locus *OeduH15*; les valeurs de Fis relevées à ce locus sont particulièrement élevées, jusqu'à 0.57 pour l'échantillon de Norvège. Cet échantillon de Norvège, cependant, montre aux autres locus un excès en hétérozygotes, qui est même significatif pour le locus *OeduT5*. De fait, pour un bon nombre de populations, le déficit en hétérozygotes est essentiellement dû au locus *OeduH15*. Les populations des Pays-Bas, de Croatie et dans une moindre mesure de Venise font exception, avec un déficit en hétérozygotes significatif à plusieurs locus.

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

	Tous locus	<i>OeduJ12</i>	<i>OeduU2</i>	<i>OeduH15</i>	<i>OeduO9</i>	<i>OeduT5</i>
OSL	0.083 ***	-0,049	-0.016	0,568 ***	-0,051	-0.055 *
PBA	0.110 ***	0,194 ***	0,131 **	0,246 ***	-0,030	0,012
IRN	0.141 ***	0,184 ***	0,056	0,376 ***	0,048	0,052
IRS	0.078 **	0,048	0,117 **	0,206 ***	0,060	-0,032
QUI	0.082 ***	0,008	0,047	0,213 ***	0,048	0,102 **
NOR	0.056 **	0,114 *	0,032	0,085 *	0,044	0,006
ROC	0.081 ***	0,155 ***	0,039	0,095 *	0,064	0,051
GAL	0.070 **	0,009	-0,036	0,377 ***	0,070	-0,045
POR	0.014	0,032	-0,043	0,152 *	-0,082	0,015
THA	0.068 ***	0,088	-0.002	0,233 ***	-0,008	0,037
RHO	0.032	0,007	0,023	0,205 ***	-0,051	-0,020
CRO	0.072 ***	0,130 ***	0,056 *	0,249 ***	-0,042 *	-0,016
VEN	0.124 ***	0,257 ***	-0.004	0,405 ***	-0,061 ***	0,046

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Pas d'indication : $p > 0.05$

3. Différenciation génétique dans des populations naturelles d'*Ostrea edulis*

Au vu des résultats de Saavedra *et al.* (1993, 1995), nous avons étudié la structuration génétique au sein de l'Atlantique, au sein de la Méditerranée, puis entre les deux mers.

Les valeurs des index de fixation F_{st} entre population à l'intérieur des zones géographiques et entre zones sont présentées sur le Tableau VI-6. Les valeurs de F_{st} par paire de populations sont présentées dans le Tableau VI-7.

Tableau VI-6 : valeur de F_{st} à l'intérieur et entre régions géographiques

Régions	F_{st}
Atlantique	0,014 ***
Méditerranée	0,017 ***
Atlantique / Méditerranée	0,010 ***
Méditerranée E / le reste	0,019 ***

Tableau VI-7 : Différenciation entre populations estimée par la valeur du Fst par paire

	PBA	IRN	IRS	QUI	NOR	ROC	GAL	POR	THA	RHO	CRO	VEN
OSL	0.015 **	0.029 ***	0.043 ***	0.025 ***	0.034 ***	0.034 ***	0.032 ***	0.044 ***	0.030 ***	0.044 ***	0.055 ***	0.058 ***
PBA		0.008 *	0.009 *	0.004	0.004	0.007 *	0.017 ***	0.005	0.007 **	0.017 ***	0.024 ***	0.029 ***
IRN			0.011 ***	0.004	0.003	0.006 *	0.017 ***	- 0.003	0.006 *	0.015 ***	0.019 ***	0.032 ***
IRS				0.011 ***	0.007 *	0.008 **	0.020 ***	0.009	0.009 **	0.017 ***	0.026 ***	0.037 ***
QUI					- 0.001	- 0.001	0.013 ***	0.007	0.006 **	0.018 ***	0.030 ***	0.035 ***
NOR						0.003	0.015 ***	0.002	0.008 ***	0.015 ***	0.020 ***	0.026 ***
ROC							0.016 ***	0.007	0.009 ***	0.018 ***	0.027 ***	0.034 ***
GAL								0.022 ***	0.021 ***	0.034 ***	0.036 ***	0.052 ***
POR									- 0.007	- 0.003	0.009 *	0.029 ***
THA										0.001	0.015 ***	0.028 ***
RHO											0.022 ***	0.034 ***
CRO												0.023 ***

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.001

a) Structuration géographique en Atlantique

Il existe une structuration faible entre les populations de l'Atlantique comme semble l'indiquer la valeur de $F_{st}=0.014$ significative. Les plus fortes différenciations sont observées entre la population de Norvège et les autres; toutes les valeurs de F_{st} entre cette population et les autres sont significatives, bien que faibles (entre 0.015 et 0.049).

Les tailles efficaces estimées varient entre 15000 et 34000 sous le modèle IAM; sous SMM, les valeurs estimées sont beaucoup plus fortes, entre 63000 et 260000. Les valeurs de N_e les plus faibles correspondent à la population de Norvège.

b) En Méditerranée

La valeur de F_{st} de 0.017, significative, semble indiquer une différenciation faible entre les populations méditerranéennes, différenciation due essentiellement aux populations de la

Méditerranée Est. La taille efficace estimée varie entre 26000 et 33000 sous le modèle IAM, et entre 165000 et 250000 sous le modèle SMM.

c) *Entre Méditerranée et Atlantique*

Nous avons regroupé toutes les populations atlantiques d'une part et méditerranéennes d'autre part, et nous observons une différenciation significative entre Méditerranée et Atlantique, mais qui est plus faible que la différenciation entre populations au sein de chacune des origines géographiques ($F_{st} = 0.010$, $p < 0.001$).

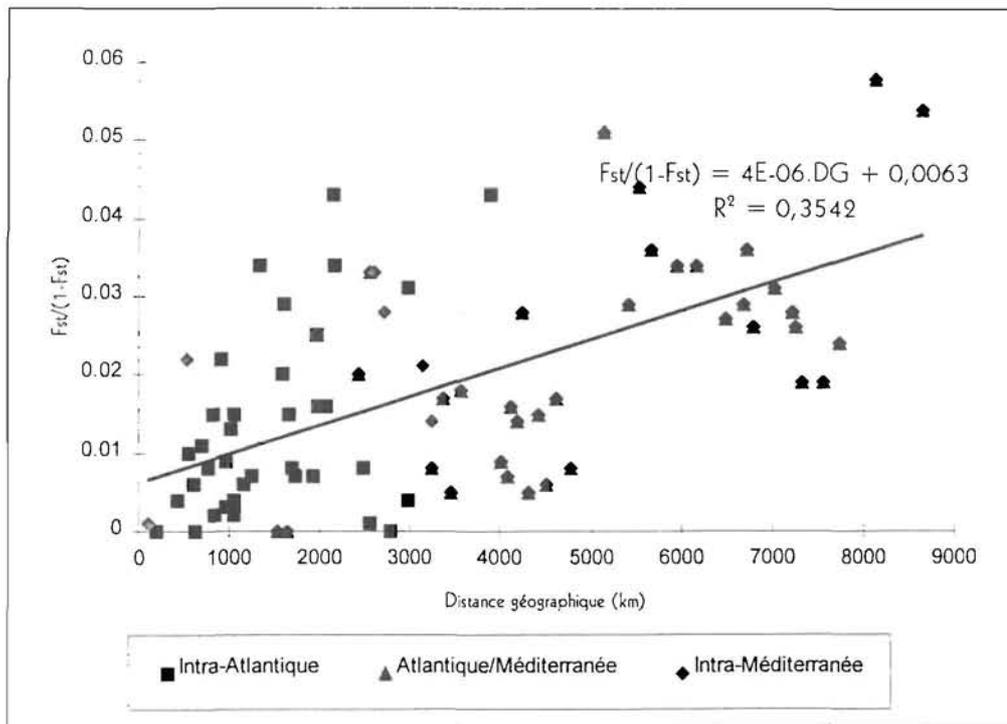


Figure VI-4 : Estimation de l'isolement par la distance par régression de la distance génétique (estimée par $F_{st}/(1-F_{st})$) sur la distance géographique

La Figure VI-4 montre la régression de la distance génétique estimée par $F_{st}/(1-F_{st})$ sur la distance géographique (Rousset, 1997). Des tests de Mantel simples et partiels ont été effectués entre 3 matrices : la matrice A de distances génétiques estimée par $F_{st}/(1-F_{st})$ et deux matrices "géographiques", une matrice B de cluster Méditerranée/Atlantique et la matrice C de distances géographiques. Les résultats des tests sont présentés sur le Tableau VI-8.

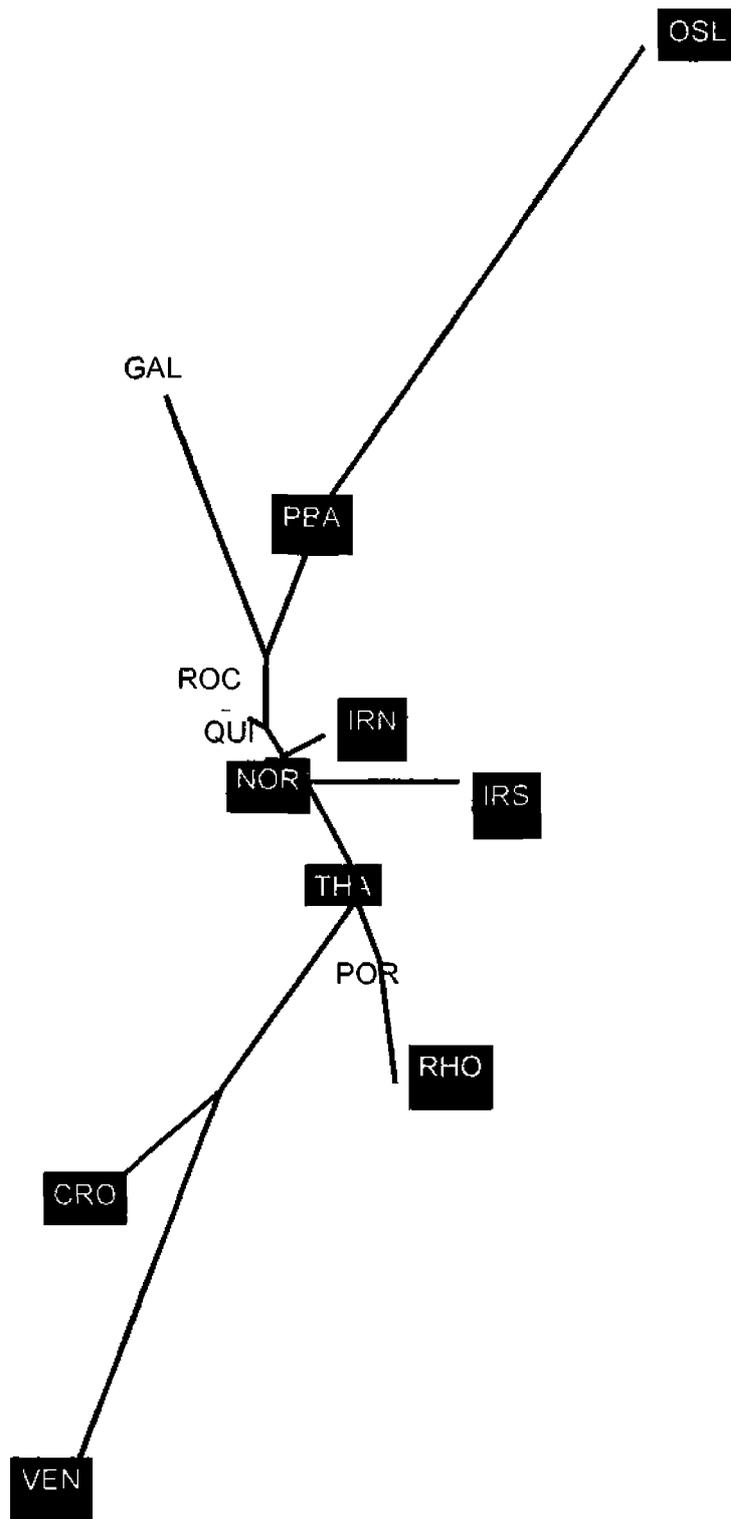
Tableau VI-8 : Corrélation entre la distance génétique (matrice A), la matrice B de cluster Méditerranée/Atlantique et la distance géographique (matrice C) dans les populations naturelles d'*Ostrea edulis*.

Comparaison	corrélation	Probabilité
A.B	0.320	0.0268
A.C	0.586	0.0002
(A.B.C)	-0.360	0.209
(A.C.B)	0.868	0.0029

Les deux tests de Mantel simples (AB et AC) sont significatif ($g=0.320$, $p<0.05$ et $g = 0.586$, $p<0.001$), cependant la corrélation entre distances génétiques et distances géographiques est plus forte que celle entre distances génétiques et cluster. Cette différence est confortée par le fait que la matrice de cluster (B) n'apporte aucune corrélation supplémentaire lorsque celle entre A et C est prise en compte. A l'inverse, la matrice des distances reste informative même lorsque la corrélation entre distance génétique (A) et le cluster (B) a été prise en compte. Ces résultats indiquent que le modèle d'isolement par la distance est approprié pour nos observations, si les populations sont effectivement à l'équilibre migration/dérive, et sous l'hypothèse de neutralité.

Par ailleurs, les F_{st} par paire les plus élevés sont observés entre les populations de Méditerranée (RHO, VEN, CRO) et les populations atlantiques (F_{st} moyen = 0.028, $p<0.001$) mais la population de Thau semble moins différenciée vis-à-vis des populations atlantiques (F_{st} moyen = 0.011, $p<0.01$)

Les relations génétiques entre populations sont illustrées par l'arbre construit par Neighbor-Joining à partir des distances de Reynolds, présenté sur la Figure VI-5. La population de Norvège apparaît très différenciée par rapport aux autres populations atlantiques, qui sont elles relativement proches les unes des autres. On distingue un rameau méditerranéen bien différencié avec les populations RHO, VEN et CRO, auquel on peut joindre la population POR. La population THA (Etang de Thau) apparaît intermédiaire entre Méditerranée et Atlantique.



0.01

Figure VI-5 : Arbre obtenu par Neighbor-joining à partir des distances de Reynolds entre populations d'huître plate.

E. DISCUSSION

1. Déficits en hétérozygotes

Nos données montrent l'existence dans 11 populations sur 13 de déficits en hétérozygotes par rapport aux fréquences génotypiques attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg, et notamment au locus *OeduH15*.

Le déficit en hétérozygotes aux locus enzymatiques est un phénomène fréquemment observé dans les populations de bivalves marins (voir par exemple Skibinski *et al.*, 1983; Zouros & Foltz, 1984; Fairbrother & Beaumont, 1993). Cela peut paraître étonnant, car les caractéristiques principales du cycle de vie des bivalves marins semblent en faire des candidats idéaux pour remplir les conditions nécessaires à la réalisation de l'équilibre de Hardy-Weinberg : effectifs importants, grand nombre de gamètes et de zygotes produits et existence de formes de dispersions (gamètes, larves). Les principales explications pour ce phénomène sont de trois types:

- effets populationnels : consanguinité, effet Wahlund (mélange de populations de fréquences alléliques différentes)
- non-détection du polymorphisme : aneuploïdie, allèles nuls
- effets sélectifs

L'explication d'un déficit en hétérozygotesq aux locus microsatellites est complexe puisqu'il peut exister un certain nombre de causes difficiles à distinguer.

Chez *Ostrea edulis*, il n'existe pas d'études du comportement reproducteur permettant de comprendre comment les géniteurs se croisent. Les populations de bivalves marins, à fécondation externe et à fort effectifs, sont a priori de bons candidats pour illustrer le modèle de panmixie. Cependant, David *et al.* (1997) ont analysé la microstructuration de populations de spicule *Spisula ovalis*, et observent une distribution spatiale des cohortes en mosaïques, les individus recrutés la même année n'étant pas distribués de façon homogène dans la population mais spatialement agrégés. Ceci rend possible l'existence de microdifférenciation génétique dans l'espace; cependant, ces microdifférenciations sont trop faibles pour expliquer les déficits en hétérozygotes observés.

Si le déficit en hétérozygotes est dû à un effet Wahlund, le F_{is} estimé peut alors être considéré comme un F_{st} qui mesurerait la divergence entre sous-unités elles-mêmes à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Or, les valeurs de F_{st} observées ($F_{st} = 0.017$) sont inférieures au F_{is} moyen ($F_{is} = 0.077$) et plus de 15 fois inférieures au F_{is} moyen dû au seul locus *OeduH15* ($F_{is} = 0.256$), et il est donc difficile de supposer qu'il y a, à l'intérieur des échantillons, des sous-unités suffisamment différenciées pour créer des F_{st} 5 à 10 fois plus élevés que celui que l'on observe entre les échantillons.

L'existence de consanguinité (due au croisement d'individus apparentés) est également difficile à prouver, mais elle semble peu adaptée à notre cas, car la consanguinité entraînerait une augmentation du taux d'homozygotie à tous les locus, or les déficits en hétérozygotes sont observés surtout au locus *OeduH15*, mais pas du tout aux locus *OeduO9* ou *OeduT5*.

L'existence d'allèles nuls chez les microsatellites a été déjà rapporté dans de nombreuses études (Callen *et al.*, 1993; Pemberton *et al.*, 1995). Ils peuvent être dûs à l'existence de mutation dans les régions flanquantes qui empêcherait le bon appariement des amorces, ou par des phénomènes de compétition lors de l'amplification d'allèles de tailles très différentes. Dans le premier cas, on s'attend à observer des individus homozygotes pour les allèles nuls, qui ne montrerait aucune amplification. Or, 35 individus sur les 507 étudiés (6,9%) n'ont pu être amplifiés à l'aide des amorces de *OeduH15* malgré des essais répétés, et bien que ces individus aient été amplifiés sans problèmes aux autres locus étudiés, ce qui exclue les possibilités de dégradation de l'ADN. L'existence d'allèles nuls pour ce locus peut alors être soupçonnée.

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

$$r = (H_e - H_o) / (H_e + H_o).$$

La fréquence des allèles nuls peut être estimée selon Brookfield (1996) qui, contrairement à Chakraborty *et al.* (1992), prend en compte l'existence de ces individus non amplifiés, considérés comme homozygotes pour l'allèle nul.

Si la proportion d'homozygotes nuls est N , Brookfield (1996) montre que le maximum de vraisemblance pour l'estimateur de r (fréquence d'allèles nuls) est :

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

où He est l'hétérozygotie attendue, Ho l'hétérozygotie observée, A=He (1+N)-Ho et B=4N(1-He²)

Les deux méthodes donnent des estimations respectivement minimales et maximales pour la fréquence des allèles nuls.

Le calcul des fréquences des allèles nuls au locus *OeduH15* est donné pour chaque population dans le Tableau VI-9. Ces fréquences sont relativement élevées, avec une moyenne de 0.15 (selon Chakraborty *et al.*, 1992) à 0.18 (selon Brookfield, 1996).

Tableau VI-9 : Estimation des fréquences d'allèles nuls au locus *OeduH15* (r) en fonction du taux d'hétérozygotie observé (H_o), attendu (H_{nb}) et de la fréquence des individus n'ayant pas amplifié (N), selon Brookfield (1996) et Chakraborty *et al.* (1992)

	H n.b.	H obs.	N	r (Brookfield, 1996)	r (Chakraborty <i>et al.</i> , 1992)
OSL	0,877	0,382	0,26	0,42	0,39
PBA	0,879	0,666	0,00	0,11	0,14
IRN	0,882	0,553	0,02	0,19	0,23
IRS	0,862	0,687	0,12	0,19	0,11
QUI	0,884	0,697	0,02	0,11	0,12
NOR	0,890	0,815	0,15	0,17	0,04
ROC	0,852	0,772	0,00	0,04	0,05
GAL	0,845	0,529	0,03	0,19	0,23
POR	0,901	0,769	0,07	0,13	0,08
THA	0,895	0,688	0,08	0,17	0,13
RHO	0,896	0,714	0,02	0,11	0,11
CRO	0,847	0,638	0,06	0,17	0,14
VEN	0,830	0,5	0,17	0,31	0,25

Rappelons que la séquence de ce microsatellite est la suivante :

(ATCT)₄ATGT(ATCT)₂ATGTATCTATATATCTATGT(ATCT)₅(TACC)₄AATTTTCT(ATCT)₃AAATATCTCTTACCTACTAACCTACCA(ATCT)₃

Cette séquence est relativement "perturbée", le motif de base (ATCT) étant souvent interrompu par des motifs qui pourraient en dériver par mutation d'une base (ATGT). Si cette séquence du génome est fortement soumise à mutation (pour une raison inconnue) cela pourrait expliquer l'existence d'allèles nuls par mutation dans les zones flanquantes. Par ailleurs, on pourrait émettre l'hypothèse qu'une séquence de ce type est fortement soumise à

l'homoplasie, et que 2 allèles de même taille pourraient être de séquences différentes, ainsi certains individus typés homozygotes seraient en fait hétérozygotes. Pour résoudre ce problème, il faudrait séquencer certains allèles (Estoup *et al.*, 1995b).

Par ailleurs, on a noté pour ce locus d'importantes distorsions de ségrégation (voir chapitre IV) et donc on ne peut pas exclure que ce locus soit lié à un allèle délétère contre-sélectionné.

En résumé, l'hypothèse la plus plausible pour expliquer l'existence d'un déficit en hétérozygote au locus *OeduH15* est la présence d'allèles nuls, bien que des effets sélectifs sur ce locus puissent être envisageables.

2. Comparaison avec la structuration révélée par les allozymes

La variabilité génétique intrapopulation révélée avec les locus microsatellites dans des populations d'huître plate est beaucoup plus élevée que celle révélée avec les locus enzymatiques sur cette espèce, que ce soit en termes de nombre d'allèles ou de diversité génique. En effet, on observe un nombre moyen de 20.3 allèles par locus microsatellites et par population. Jaziri *et al.* (1987) ont analysé 10 populations d'*Ostrea edulis* en provenance des côtes françaises atlantiques et méditerranéennes, avec 10 locus allozymes; en moyenne, seul 50% de ces locus sont polymorphes avec 3 allèles par locus en moyenne. Saavedra *et al.* (1995) ont trouvé un nombre moyen d'allèles de 1.8 à 2.8 pour les locus allozymes dans les populations européennes de cette espèce. De même, la diversité génique aux locus microsatellites est très élevée ($H_{nb} = 0.907$) alors que Saavedra *et al.* (1995) estiment à 0.176 ± 0.052 la diversité génique moyenne aux locus allozymes. Ceci confirme l'intérêt des marqueurs microsatellites pour caractériser la variabilité génétique intrapopulation, intérêt déjà souligné pour de nombreuses espèces (Viard *et al.*, 1996).

Cependant, la structuration génétique révélée par les microsatellites est remarquablement congruante avec celle révélée par les marqueurs allozymes (Saavedra *et al.*, 1993; 1995, Jaziri, 1990). Les valeurs de F_{st} global sur l'ensemble de l'échantillonnage (voir Tableau VI-10) révélées par les microsatellites ne sont pas différentes de celles révélées par les allozymes, et même, le F_{st} moyen sur les locus allozymes (0.058) est plus élevé que le F_{st} moyen sur les locus microsatellites (0.018), même si les deux valeurs ne sont pas significativement différentes.

Tableau VI-10 : valeur de Fst global estimé sur l'ensemble de l'aire de répartition d'*Ostrea edulis*, à l'aide de locus allozymes (15 populations, de la Norvège à la Turquie, d'après Saavedra *et al*, 1993) et de marqueurs microsatellites (13 populations, de la Norvège à la Croatie, en gras)

Locus	Fst
OeduU2	0.009
OeduT5	0.013
MDH-1	0.017
Idh-2	0.018
PGI	0.020
OeduO9	0.020
OeduJ12	0.024
OeduH15	0.027
ALDH	0.029
ME-1	0.032
Est-3	0.045
PGM	0.046
Est-5	0.059
ARK	0.289

Ainsi, on retrouve avec les deux types de marqueurs les caractéristiques suivantes :

- variabilité génétique réduite dans les populations atlantiques

On observe une réduction de la variabilité génétique dans les échantillons atlantiques par rapport à ceux de Méditerranée, et notamment Méditerranée Est. Les données bibliographiques indiquent une faible diversité génétique commune à l'ensemble des populations atlantiques (Wilkins & Mathers, 1973; Saavedra *et al.*, 1987; Magennis *et al.*, 1983; Johannesson *et al.*, 1989). Ces travaux montrent un taux d'hétérozygotie plus faible dans les populations atlantiques ($0.08 < H_o < 0.12$) que dans les populations méditerranéennes ($0.12 < H_o < 0.15$). Jaziri (1990), ainsi que Saavedra *et al.* (1995), observent aussi une variabilité génétique plus réduite dans les populations atlantiques (1.8 à 2.1 allèles par locus, $H_e = 0.101$ à 0.113) que dans les populations méditerranéennes (2.2 à 2.8 allèles par locus, $H_e = 0.120$ à 0.174).

- Corrélation entre la distance génétique et la distance géographique.

On observe une corrélation entre distances génétiques révélées par les microsatellites et distances géographiques sur l'ensemble de l'aire de répartition. Le même phénomène peut être observé quand on utilise comme mesure de distance génétique les valeurs de Gst liées aux marqueurs enzymatiques (Borsa *et al.*, 1997, voir Figure VI-6). Par contre, la pente de

la droite de régression de la distance génétique par rapport à la distance géographique est plus grande pour les locus allozymes que pour les locus microsatellites, ce que l'on peut relier à l'observation d'un F_{st} moyen plus élevé pour les allozymes. Deux explications sont possibles pour ce décalage du niveau de structuration révélé par les deux types de marqueurs : une sélection sur les allèles des locus enzymatiques (rappelons notamment l'existence de clines dans les fréquences alléliques pour certains locus enzymatiques depuis l'Atlantique Nord jusqu'à la Méditerranée Est (Saavedra *et al.*, 1995)), ou alors l'existence d'une forte homoplasie aux locus microsatellites qui diminuerait quantitativement la diversité génétique observée.

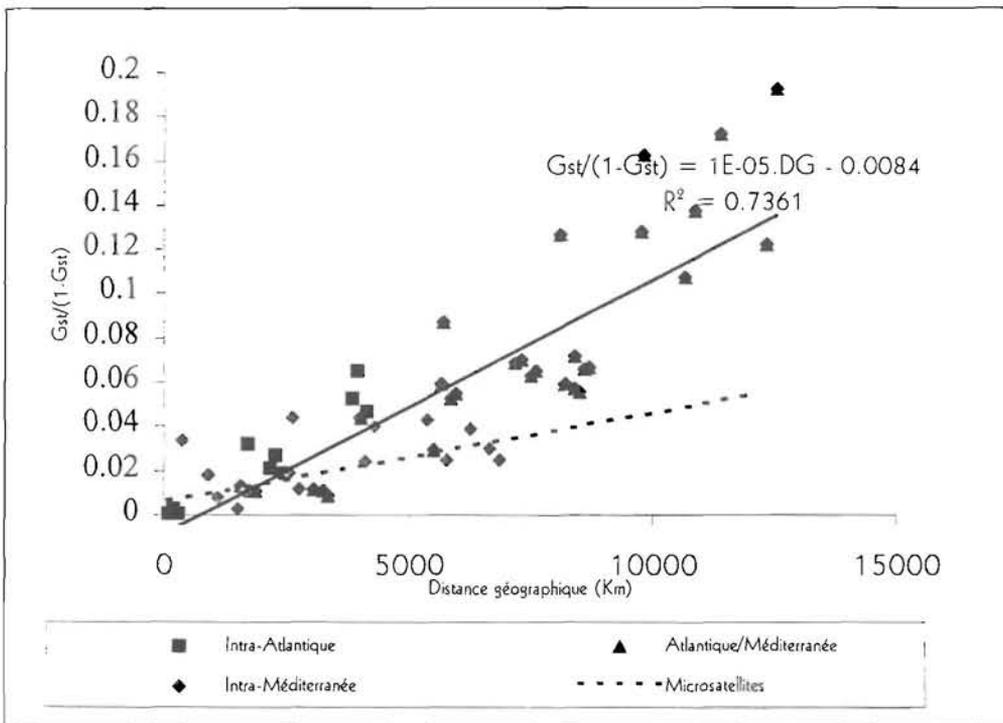


Figure VI-6 : Estimation de l'isolement par la distance par régression de la distance génétique calculée pour 13 locus allozymes (estimée par $G_{st}/(1-G_{st})$) sur la distance géographique. En pointillés : droite de régression analogue obtenue pour 5 locus microsatellites.

- L'arbre construit à partir des distances génétiques révèle une structuration Atlantique/Méditerranée. La structuration observée aux locus microsatellites reflète globalement la structuration observée avec les locus allozymes par Jaziri (1990) et Saavedra *et al.* (1995) (voir Figure VI-7).

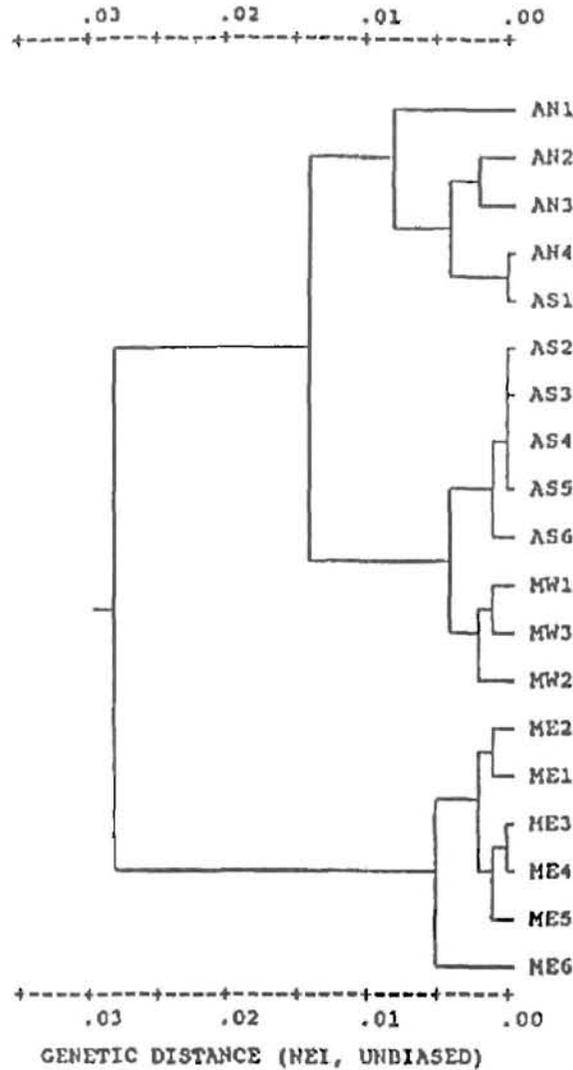


Figure VI-7 : Arbre obtenu par UPGMA à partir des distances de Nei estimées à l'aide de locus microsatellites entre populations d'huître plate (Saavedra et al., 1995).

- Position intermédiaire de l'échantillon de l'Etang de Thau entre Atlantique et Méditerranée. Sur la base du calcul du F_{st} et des distances de Nei inférées de 12 locus allozymes, Jaziri (1990) a montré que la population de l'Etang de Thau est génétiquement plus proche des populations Atlantique que des populations Méditerranée. Cela peut s'expliquer par l'importation massive d'huîtres atlantiques dans l'Etang de Thau pour grossissement et engraissement (Pichot, comm.pers.). Ces géniteurs atlantiques auraient pu "faire souche" dans l'Etang.

La structuration actuelle des populations d'huîtres plates serait alors liée à trois phénomènes qui interagissent :

- **histoire du peuplement**

Les données paléontologiques indiquent que l'espèce est apparue au début du Pléistocène (-6 à -5 Ma) (Martineil & Marquina, 1981) et aurait colonisé l'Atlantique et la Méditerranée avant le début des glaciations du quaternaire (-1,7 Ma). Le quaternaire est marqué par une succession de variations climatiques importantes, ayant entre autres donné lieu à une série de périodes glaciaires et inter-glaciaires (Van Donk, 1976; Thunell & Belyea, 1982). La dernière, la plus importante, remonterait à -100000 ans. Dans l'océan Atlantique, ces événements climatiques ont engendré la migration des espèces boréales vers l'Atlantique Sud et la Méditerranée. Dans le cas de l'huître plate, les glaciations les plus importantes auraient pu engendrer l'extinction des stocks atlantiques d'Europe, probablement jusqu'au détroit de Gibraltar. La Méditerranée ayant gardé une certaine stabilité écologique, ses populations n'auraient pas été touchées. En période post-glaciaire, l'espèce aurait recolonisé le littoral Atlantique à partir de populations ayant survécu dans l'Atlantique Sud et à partir de propagules provenant de Méditerranée. La réduction du polymorphisme observée dans les populations atlantiques pourrait s'expliquer par la perte d'une part de la diversité génétique initiale par dérive génétique suite à un effet fondateur.

- **Sélection différentielle impliquée par l'écologie du milieu**

La sélection naturelle a été souvent proposée pour expliquer la différenciation à certains locus enzymatiques. L'exemple le plus décrit est celui du locus LAP chez *Mytilus edulis* (Koehn *et al.*, 1976, 1980; Hilbish & Koehn, 1985). La sélection a parfois été invoquée pour expliquer des clines géographiques majeurs liés à des gradients environnementaux (Buroker, 1983). On peut noter ici le cas des locus allozymes AP et ARK qui montrent les clines de fréquence les plus significatifs de l'Atlantique Nord à la Méditerranée (Saavedra *et al.*, 1995). Or, des études ultérieures ont conduit à remettre en cause la neutralité de ces locus (Saavedra & Guerra, 1996).

- **Action anthropique.**

L'exploitation par l'homme des stocks naturels d'huître plate sur le littoral atlantique est connu depuis l'Antiquité (voir Chapitre I). Cette exploitation s'est transformée en surexploitation, à

laquelle se sont ajoutés les effets néfastes des maladies parasitaires. Cependant, les résidus de populations aujourd'hui présents semblent largement suffisants pour éviter un effet de goulots d'étranglement. En effet, dans les zones les plus touchées, les stocks résiduels ont été évalués à plusieurs milliers d'individus (Grizel, comm.pers.). L'action de l'homme est évidente aussi pour expliquer la proximité des populations de l'Etang de Thau avec les populations Atlantiques.

3. Apport de nos données à l'étude des marqueurs microsatellites

On a vu que les marqueurs microsatellites sont des marqueurs de choix pour le généticien des populations. Inversement, la description de la variabilité génétique, et en particulier la distribution des fréquences alléliques, nous permet d'obtenir des renseignements sur le marqueur et notamment sur les processus de mutation sous-jacents.

Rappelons ce que nous avons déjà exposé en première partie de ce travail. Le modèle classique de mutation utilisé pour les allozymes est un modèle en nombre infini d'allèles (IAM). Le modèle de mutation pas à pas (Stepwise mutation model ou SMM) et ses variantes (modèle à deux phases ou TPM), abandonnés pour les allozymes, sont revenus au goût du jour avec les marqueurs microsatellites. En effet, les processus de mutation sont certainement liés à des glissements de la polymérase lors de la réplication, et il est vraisemblable que ces modifications entraînent des insertions-délétions de quelques unités de répétitions (SMM) plutôt que des changements aléatoires potentiellement en nombre infini (IAM).

Les attendus théoriques sur le polymorphisme populationnel, en particulier en terme de diversité génique, sont différents selon le modèle de mutation utilisé. Ainsi, une méthode indirecte pour tester la validité de ces modèles est la comparaison de données observés (taille et fréquence des allèles dans une population) avec des attendus théoriques produits par les modèles. Cette approche a été utilisée par Valdès *et al.* (1993) et Di Rienzo *et al.* (1994) pour tester la validité des modèles SMM et TPM. Ainsi Di Rienzo *et al.* (1994) ont comparé pour 10 locus microsatellites dans une population humaine la diversité génétique et la fréquence de l'allèle le plus commun avec ces mêmes paramètres générés sous l'hypothèse d'un SMM ou d'un TPM. Dans 8 cas sur 10, le SMM a pu être rejeté.

On peut également émettre des hypothèses sur le modèle de mutation d'après l'observation directe des distributions des allèles. Dans nos données, la distribution des fréquences

alléliques au locus *OeduO9*, du type normal, correspond à celle attendue à l'équilibre sous SMM. Les autres locus, par contre, montrent des distributions multimodales. Des distributions multimodales des fréquences alléliques aux locus microsatellites sont fréquemment observées, par exemple chez l'homme (Weber & May, 1989; Edwards *et al.*, 1992; Valdes *et al.*, 1993) ou chez des poissons (Nielsen *et al.*, 1994; Garcia de Leon, 1995). La présence de plusieurs modes dans la distribution des fréquences alléliques peut s'expliquer sous un modèle à deux phases (TPM).

On peut tenter à partir des descriptions de fréquences alléliques de déceler un modèle de mutation qui explique la variabilité. On peut se demander quelles mesures alors utiliser pour décrire la variabilité génétique. Certaines mesures (nombre d'allèles, nombre de modes) sont fortement influencées par la taille de l'échantillon (Shriver *et al.*, 1993), alors que d'autres mesures (nombre moyen de répétitions) le sont moins. Nous avons utilisé les résultats théoriques générés par Shriver *et al.* (1993) pour estimer quel modèle de mutation explique le mieux la variabilité génétique observée, variabilité décrite par le nombre d'allèles, le nombre de modes dans la distribution des fréquences alléliques, l'étendue du nombre de répétitions et le taux d'hétérozygotie). Les résultats apparaissent dans le Tableau VI-11. Ces comparaisons n'étant basées que sur des observations visuelles à partir d'une figure construite pour une taille d'échantillon de 250 chromosomes en supposant un taux de mutation de 10^{-3} , il faut les prendre avec précaution, mais on voit que le choix d'un modèle de mutation pour les locus microsatellites chez *Ostrea edulis* n'est pas évident.

Tableau VI-11 : Test du modèle de mutation des locus microsatellites adaptés aux données observées (d'après Shriver *et al.*, 1993).

	A_t	M_t	R_t	H_{nb}	Modèle A_t	Modèle M_t	Modèle R_t
<i>OeduJ12</i>	28	6	29	0.93	?	SMM1	SMM1
<i>OeduU2</i>	38	5	57	0.95	IAM	SMM1	*
<i>OeduH15</i>	18	5	18	0.89	SMM1	SMM1	SMM1
<i>OeduT5</i>	32	6	33	0.93	IAM	SMM1	SMM1

A_t = nombre d'allèle total observé sur l'échantillon total

M_t = nombre de modes observés dans les histogrammes de fréquences alléliques

R_t = étendue du nombre de répétitions du motif répété du locus microsatellite

H_{nb} = hétérozygotie attendue non biaisée

Les trois dernières colonnes indiquent le modèle de mutation qui pourrait expliquer les relations entre les descripteurs de la variabilité génétique (d'après Shriver *et al.*, 1993)

SMM1 : modèle de mutation à pas simple, IAM : modèle de mutation à nombre infini d'allèle, ? : on ne peut pas discriminer entre les deux modèles, * : valeur en dehors du champ d'études.

QUATRIEME PARTIE

VARIABILITE GENETIQUE ET CROISSANCE DANS DES POPULATIONS NATURELLES ET DES CROISEMENTS CONTROLES CHEZ *OSTREA EDULIS*

VII. APPORT DES MARQUEURS MICROSATELLITES DANS LA COMPREHENSION DE LA RELATION HETEROZYGOTIE-CROISSANCE CHEZ LES BIVALVES MARINS

A. INTRODUCTION

Des corrélations positives entre l'hétérozygotie multilocus aux locus allozymes et des caractères liés à la valeur sélective ont été observées chez de nombreux animaux et plantes (voir pour revue Mitton & Grant, 1984; Zouros & Foltz, 1987; Zouros & Pogson, 1994). Des corrélations entre hétérozygotie aux locus allozymiques et croissance ont été trouvées tout particulièrement chez de nombreuses espèces de bivalves, notamment l'huître creuse japonaise *Crassostrea virginica* (Zouros *et al.*, 1980), la moule *Mytilus edulis* (Koehn & Gaffney, 1984), la pétoncle *Mulinia lateralis* (Koehn *et al.*, 1988, Gaffney *et al.*, 1990), l'huître plate *Ostrea edulis* (Alvarez *et al.*, 1989), la moule zébrée *Dreissena polymorpha* (Garton & Haag, 1991), la coquille Saint Jacques *Placopecten magellanicus* (Pogson & Zouros, 1994), ou la spicule *Spisula ovalis* (David *et al.*, 1995).

En dépit de nombreuses études, la base génétique de cette relation entre hétérozygotie et croissance (RHC) n'a cependant pu être déterminée de façon consensuelle. Le problème est en effet de savoir si les allozymes étudiés sont directement impliqués dans la corrélation observée, ou bien s'ils ne sont que des marqueurs neutres de phénomènes se produisant à l'échelle du génome. David *et al.* (1995) ont ainsi introduit la distinction entre "effet local" et "effet général" :

- L'hypothèse d'effet local suppose que les allozymes sont marqueurs d'une petite région chromosomique, fonctionnellement superdominante. La configuration limite de cette hypothèse correspond au cas où les allozymes eux-mêmes sont superdominants (hypothèse de superdominance directe). Il est pratiquement impossible de départager ces deux aspects de l'hypothèse d'effet local.
- L'hypothèse d'effet général suppose que les allozymes sont marqueurs de l'hétérozygotie globale du génome, et qu'ils co-ségrègent avec des gènes délétères, partiellement ou totalement récessifs (hypothèse de superdominance associative). Ces corrélations génotypiques peuvent être dues à différentes causes, que l'on peut regrouper en deux classes : déséquilibre de liaison dans le pool gamétique de la population, ou consanguinité (union des gamètes non aléatoires sur une seule génération). La recherche de consanguinité pour

soutenir l'hypothèse de superdominance associative a été souvent fructueuse. En effet, la corrélation hétérozygotie/croissance a souvent été décrite en association avec des déficits en hétérozygotes significatifs (Zouros, 1987). De même, Gaffney *et al.* (1990) ont décrit une corrélation positive entre la contribution d'un locus à la corrélation hétérozygotie/croissance et l'importance du déficit en hétérozygotes à ce même locus.

Plusieurs approches ont été envisagées pour tenter de discriminer ces deux hypothèses (effet local / effet général) :

i) L'une de ces approches consiste à chercher des différences physiologiques qui pourraient être dûes à une forme allozymique particulière et qui pourraient expliquer l'existence d'une superdominance à un locus particulier. Ainsi, des expériences *in vitro* ont montré que les génotypes hétérozygotes ont une activité enzymatique spécifique plus importante que les génotypes homozygotes pour les enzymes *Lap-2* et *Odh* (Sarver *et al.*, 1992), indiquant l'existence de superdominance probable pour ces enzymes. Les travaux de Koehn *et al.* (1988) ont permis de montrer que les différents locus ont une contribution différente à la RHC chez *Mulinia lateralis*, et que les enzymes impliquées dans la glycolyse ou le catabolisme des protéines exerçaient un effet plus fort sur la corrélation que les enzymes impliquées dans d'autres voies métaboliques.

ii) Une autre approche consiste à tester des prédictions mathématiques de la corrélation sous différentes hypothèses et à comparer ces prédictions à des données expérimentales (Smouse, 1986, David *et al.*, 1995). Les modèles possibles sont rappelés par David *et al.* (1995).

- Le modèle le plus simple est celui d'une régression linéaire de la performance phénotypique (par exemple la croissance = Y) sur la MLH :

$$Y = \alpha (X_1 + X_2 + \dots + X_n) + \beta + \varepsilon_i$$

où X_i code l'hétérozygotie au locus i (1 si le locus est hétérozygote, ou 0 si le locus est homozygote). Bien que ce soit le modèle le plus couramment utilisé pour l'étude de la RHW chez les bivalves marins, il n'a pas permis de trancher en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses.

- Smouse (1986) a conçu un modèle plus sophistiqué, afin qu'il s'ajuste spécifiquement à l'hypothèse de superdominance directe à plusieurs locus indépendants. Si un locus à 2 allèles A et B est maintenu par superdominance, il existe une relation entre les fréquences alléliques à l'équilibre (p et q) et les valeurs sélectives des 3 génotypes. Les génotypes

peuvent être caractérisés par leur distance adaptative ($D = 0$ pour AB, $1/p$ pour AA et $1/q$ pour BB). Si on suppose la superdominance à plusieurs locus on peut écrire, avec les mêmes notations que précédemment :

$$\ln(Y) = \alpha_1.D_1 + \alpha_2.D_2 + \dots + \alpha_n.D_n + \beta + \varepsilon_i$$

Pour un locus multiallélique, Smouse (1986) recommande de choisir l'allèle le plus fréquent pour A et de pooler les autres allèles pour B. Bush *et al.* (1987) ont comparé ces deux modèles pour rendre compte des variations de croissance chez *Pinus rigida*; le modèle des distances adaptatives leur a paru le plus approprié et ils ont conclu en faveur de l'hypothèse de superdominance directe des locus enzymatiques.

- David *et al.* (1995) ont conçu un modèle permettant de tester spécifiquement l'hypothèse de superdominance associative, où l'hétérozygote AB a une valeur exactement moyenne entre les deux homozygotes :

$$Y = \alpha_1.R_1 + \alpha_2.R_2 + \dots + \alpha_n.R_n + \beta + \varepsilon_i$$

où $R_i = 0$ pour A_iA_i , 1 pour A_iB_i et 2 pour B_iB_i

Ils ont ensuite combiné ce modèle avec celui des distances adaptatives dans un modèle complet permettant d'évaluer l'importance relative des effets additifs contre les effets de superdominance:

$$Y = \alpha_1.R_1 + \beta_1.D_1 + \alpha_2.R_2 + \beta_2.D_2 + \dots + \alpha_n.R_n + \beta_n.D_n + \gamma + \varepsilon_i$$

Ces différents modèles ont été utilisés par les mêmes auteurs pour expliquer la croissance chez le bivalve *Spisula ovalis*, où $t_{1/2}$ (âge de l'animal à la moitié de la taille maximale) est négativement corrélé avec l'hétérozygotie à 7 locus enzymatiques. La plus grande part de la variance de $t_{1/2}$ semblant d'être principalement à des effets additifs, ils concluent que l'hétérosis observée est due plus à des effets génomiques généraux qu'à des effets de superdominance locale restreints aux allozymes (ou petits segments chromosomiques proches).

- iii) Une troisième approche a été rendue possible par le développement de nouveaux marqueurs ADN neutres, grâce aux progrès de la biologie moléculaire. En effet, sous l'hypothèse d'un effet général, une corrélation hétérozygotie-croissance devrait être trouvée avec tout type de marqueur génétique. Sous l'hypothèse d'un effet direct, la corrélation ne devrait être observée qu'avec les allozymes mais non avec des marqueurs ADN neutres. Pogson & Zouros (1994) ont analysé 222 individus d'une cohorte de *Placopecten*

magellanicus, pour leur taux de croissance et leur génotype à 7 locus allozymes et 10 locus non allozymes (dont 2 protéines à caractère non enzymatique et 8 marqueurs ADN supposés neutres). Ils ont mis en évidence une corrélation significative entre l'hétérozygotie multilocus aux locus allozymes et la croissance, mais pas de corrélation quand ils considéraient l'hétérozygotie aux locus ADN. Ces résultats sont en contradiction avec l'hypothèse d'effet général. Cependant, les auteurs soulignent que l'hétérozygotie aux locus enzymatiques n'explique que 3% de la variance observée pour le taux de croissance, et que leur conclusion doit être confirmée par d'autres études sur d'autres espèces avant d'être retenue.

Notre étude s'inspire de la dernière approche exposée, à savoir l'utilisation sur une même cohorte d'*Ostrea edulis* de marqueurs enzymatiques et de marqueurs microsatellites.

B. MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

Une cohorte a été captée en mer ouverte au large de Sète à la fin de l'été 1993. Les collecteurs n'ont été laissés en place que pendant une dizaine de jours pour s'assurer que tous les animaux aient le même âge à quelques jours près.

Le protocole expérimental est schématisé sur la Figure VII-1.

Après 6 mois de croissance sur les collecteurs, soit en mars 1994, les animaux ont été détachés et pesés individuellement. Les 50 plus petits et les 50 plus gros ont été échantillonnés pour analyse génétique : prélèvement et congélation de la glande digestive et du muscle pour l'électrophorèse enzymatique, et d'un fragment de branchies pour l'étude du polymorphisme aux locus microsatellites. Ces animaux constituent respectivement les groupes "petit" et "grand" de l'échantillon "avant croissance" (AV-pti et AV-gd).

Environ 730 animaux du corps de lot (taille intermédiaire) ont été mis en croissance dans des poches ostréicoles dans l'étang de Thau pendant 5 mois. Ils ont alors été à nouveau pesés individuellement, et les plus petits et les plus gros ont été échantillonnés de la même manière que précédemment. Ils constituent les groupes "petit" et "grand" de l'échantillon "après croissance" (AP-pti et AP-gd). Comme ces animaux avaient le même poids au début de l'expérience, le poids d'un individu à la fin est une mesure direct du taux de croissance.

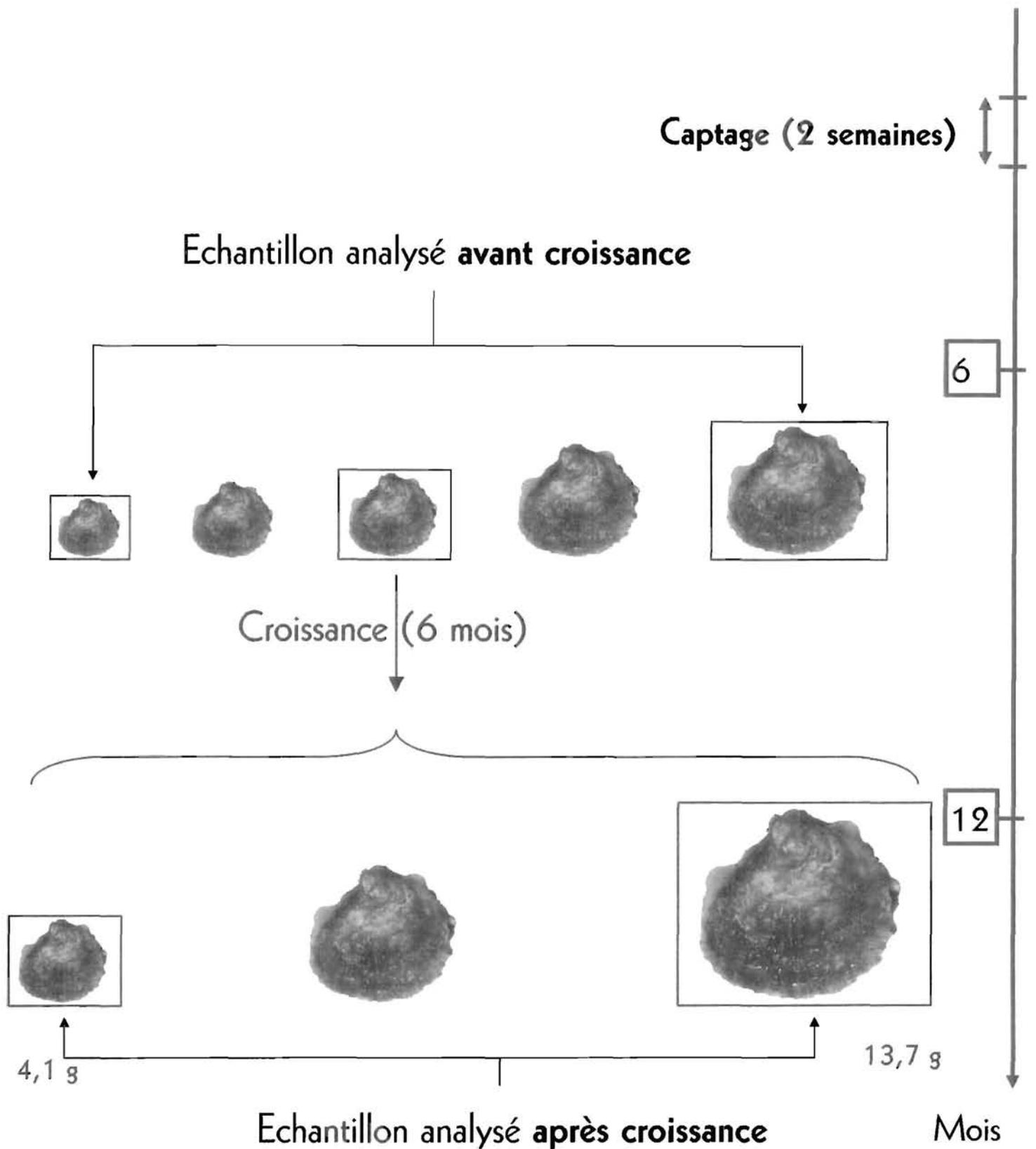


Figure VII-1 : Schéma du dispositif expérimental de suivi de la croissance d'une population naturelle d'*Ostrea edulis*

Ce protocole n'est pas typique des études de RHC, où les auteurs en général analysent les corrélations entre poids à un âge donné et hétérozygotie sur l'ensemble d'une cohorte, et non pas sur les groupes de tailles extrêmes. Une partie de ce travail a été accompli dans le cadre d'un DEA (Vigouroux, 1994) et le protocole a été choisi pour maximiser les chances d'observer un phénomène significatif. En choisissant les extrémités de la distribution des tailles, on est sûr, si il existe une corrélation entre la croissance et l'hétérozygotie, de l'observer.

2. Analyses du polymorphisme

a) Aux locus enzymatiques

Cinq locus allozymes ont été étudiés : phosphoglucomutase (*Pgm*, E.C.2.7.5.1), phosphoglucose-isomérase (*Pgi*, E.C.5.3.1.9), malate-deshydrogénase (*Mdh-1*, E.C.1.1.1.37), esterase (*Est-5*, E.C.3.1.1.1) et isocitrate-deshydrogénase (*Idh-2*, E.C.1.1.1.42). Ils ont été choisis parce que connus pour être polymorphes chez *Ostrea edulis* (d'après Jaziri, 1990; Alvarez *et al.*, 1989; et Saavedra *et al.*, 1993). Les protocoles sont rappelés en Annexe D. L'ensemble de l'étude du polymorphisme enzymatique a été réalisée dans le cadre d'un stage de DEA par Y. Vigouroux (Vigouroux, 1994).

b) Aux locus microsatellites

Cinq locus microsatellites ont été analysés : *OeduB0*, *OeduH15*, *OeduJ12*, *OeduO9* et *OeduT5*. Ils ont été choisis car ils semblent révéler différents niveaux de polymorphismes (voir tableau III-1) L'extraction d'ADN s'est faite selon la méthode du phénol-chloroforme (voir Annexe D) et l'étude du polymorphisme s'est faite selon le protocole décrit au chapitre III.

3. Analyses statistiques

a) Variabilité génétique

Le nombre d'allèles et l'hétérozygotie observée ont été calculés pour chaque locus dans chaque échantillon, ainsi que la diversité génique corrigée pour les effets d'échantillonnage (Nei, REF) selon la formule suivante :

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

où N est la taille de l'échantillon et p_i la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle au locus considéré.

La conformation aux fréquences attendues sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg a été calculée par le F_{is} de Wright (1965) estimé par le f de Weir & Cockerham (1984). La significativité de la valeur de f a été testée par 1000 permutations des allèles à l'intérieur de chaque population. Le F_{is} estimé est considéré comme significatif quand moins de 5% des permutations donnent un résultat plus élevé (en valeur absolue) que la valeur calculée du F_{is} de la population.

Ces calculs ont été réalisés grâce au logiciel Genetix (Belkhir *et al.*, 1996).

b) Comparaison des niveaux d'hétérozygotie

Une valeur d'hétérozygotie a été attribuée à chaque individu pour chaque locus: on a codé 1 les génotypes hétérozygotes et 0 les génotypes homozygotes. L'hétérozygotie multilocus d'un individu peut ainsi être calculée en sommant ces valeurs sur plusieurs locus. Par ailleurs, on peut estimer ainsi l'hétérozygotie moyenne de chaque population pour chaque locus ou pour chaque groupe de locus.

Le but de cette étude est de mettre en évidence des différences de niveau d'hétérozygotie entre Pt et Gd. Si une telle différence existe, le problème est alors de savoir si elle peut être due au hasard. En d'autres termes, la distribution des niveaux d'hétérozygotie peut-elle être due à un simple échantillonnage au hasard des deux groupes dans la population?

Pour cela on va chercher à tester la significativité de d défini comme étant la différence d'hétérozygotie entre Gd et Pt ($d = HML_{Gd} - HML_{Pti}$). Pour chaque stade d'échantillonnage (Av et Ap), une population d'effectif $N_P + N_G$ a été recréée en regroupant les deux échantillons "Pti" et "Gd" d'effectifs respectifs N_P et N_G . Après permutations des individus au sein de cette population, on peut recréer deux sous-populations A et B d'effectifs N_P et N_G , pour lesquelles on peut calculer l'hétérozygotie multilocus. Il est possible alors de comparer $d_{perm} = HML_A - HML_B$ à la valeur d observée sur les données réelles. On répète 1000 fois cette opération. L'hypothèse nulle H_0 de l'égalité de la HML entre Pti et Gd ($d=0$) est rejetée si d est supérieur à d_{perm} dans au moins 95% des cas. Les permutations permettant de recréer deux sous-populations aléatoires et le test de significativité de d ont été réalisés à l'aide du logiciel S-plus (1995).

Pour estimer l'effet de chaque locus sur l'appartenance à la classe Pti ou Gd, la même procédure a été utilisée en testant cette fois non plus la différence des valeurs de HML mais la différence d'hétérozygotie observée à ce locus.

C. RESULTATS

1. Mortalité.

Les huîtres non étudiées et ne faisant pas partie du corps de lot au début de l'expérience (plus grosse ou plus petite que l'échantillon suivi en croissance) montrent des mortalités différentielles. L'estimation de la mortalité donne les résultats suivants (les nombres entre parenthèses correspondent aux nombres initiaux d'huîtres dans chaque sac) :

- Petites huîtres (3 pochons) : 61%(338), 56%(258) et 61%(331).
- Grosses huîtres (4 pochons) : 36%(144), 36%(278), 41%(225) et 40%(245).

Ces taux ne sont pas différents pour une classe donnée mais significativement différents entre les deux classes ($p < 0.01$). Grossièrement, le taux de mortalité a été deux fois plus important pour les huîtres de taille initiale faible que pour celles de taille initiale forte. La densité peut cependant expliquer ces résultats. En effet, les densités étaient en général légèrement plus fortes pour les petites huîtres. Cependant, ces données de mortalité ne sont données qu'à titre indicatif puisqu'elles ne concernent aucun des lots ayant fait l'objet d'analyses génétique. En effet, les huîtres prélevées avant croissance (les plus petites et les plus grosses) n'ont pas pu être suivies pour la survie puisqu'elles ont été sacrifiées pour analyses enzymatiques; quant aux huîtres prélevées après croissance, elles faisaient partie au départ d'un lot homogène (le corps de lot) et on n'a donc pas de données de mortalité différentielles suivants le taux de croissance. Ces données de mortalité concernent donc d'une part les animaux de taille intermédiaire entre les plus petits et le corps de lot d'une part, et entre le corps de lot et les plus gros d'autre part.

2. Croissance

Les poids moyens dans les échantillons Av-Pti et Av-Gd étaient de 1.27 ± 0.33 g et 6.17 ± 1.30 g respectivement. Après croissance, ces moyennes s'élevaient à 4.11 ± 0.91 g pour l'échantillon Ap-Pti et à 13.84 ± 1.86 g pour l'échantillon Av-Gd.

Tableau VII-1 : Diversité génétique dans les différents échantillons étudiés (N_a : Nbre d'allèles, H_o : hétérozygotie observée, H_{nb} : hétérozygotie attendue non biaisée)

Locus	AV-Pti			AV-Gd			AP-Pti			AP-Gd		
	N_a	H_o	H_{nb}	N_a	H_o	H_{nb}	N_a	H_o	H_{nb}	N_a	H_o	H_{nb}
<i>Gpi</i>	1	0.000	0.000	2	0.094	0.091	1	0.000	0.000	2	0.044	0.043
<i>Mdh</i>	3	0.477	0.426	4	0.434	0.360	3	0.457	0.435	2	0.370	0.305
<i>Pgm</i>	3	0.591	0.434	3	0.566	0.437	3	0.383	0.375	4	0.652	0.515
<i>Idh-2</i>	2	0.200	0.217	2	0.226	0.203	2	0.170	0.157	2	0.217	0.196
<i>Est-?</i>	3	0.356	0.299	3	0.491	0.415	2	0.170	0.256	2	0.478	0.368
<i>OeduJ12</i>	13	0.911	0.907	15	0.930	0.866	14	0.907	0.904	11	0.921	0.891
<i>OeduB0</i>	5	0.750	0.728	5	0.793	0.698	6	0.791	0.700	6	0.865	0.736
<i>OeduT5</i>	11	0.933	0.860	12	0.875	0.787	8	0.857	0.787	11	0.816	0.846
<i>OeduH15</i>	9	0.674	0.856	10	0.684	0.790	10	0.684	0.832	9	0.667	0.856
<i>OeduO9</i>	16	1.000	0.923	15	0.912	0.881	16	1.000	0.911	14	0.944	0.915

3. Variabilité génétique

Le nombre d'allèles N_a , ainsi que l'hétérozygotie observée H_o et l'hétérozygotie attendue non biaisée H_{nb} sont donnés pour chaque échantillon dans le Tableau VII-1. Le nombre total d'allèles trouvés dans la population varie de 2 (*Gpi*, *Idh-2-2*) à 5 (*Mdh-1-2*) pour les allozymes et de 5 (*OeduB0*) à 16 (*OeduJ12*, *OeduO9*) pour les microsatellites. L'hétérozygotie moyenne par locus est de 0.319 ± 0.041 pour les allozymes et de 0.815 ± 0.025 pour les microsatellites. Par rapport à la population naturelle d'origine géographique proche étudiée dans le chapitre précédent (RHO), le polymorphisme ainsi que l'hétérozygotie observée pour les locus microsatellites sont plus faibles. (voir Tableau VII-2) alors que les effectifs étudiés sont près de 4 fois plus importants.

Tableau VII-2 : Comparaison de la variabilité génétique dans la population étudiée ici (tous échantillons confondus, N = 188) et une population naturelle de même origine géographique (Population RHO du chapitre VI, N=50)

	Cette étude		Population du delta du Rhône	
	N_a	H_o	N_a	H_o
Microsatellites				
<i>OeduB0</i>	6	0.796	nd	nd
<i>OeduJ12</i>	16	0.918	20	0.918
<i>OeduH15</i>	11	0.678	15	0.714
<i>OeduO9</i>	16	0.961	21	0.915
<i>OeduT5</i>	12	0.873	24	0.957

Les déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg sont estimées par le calcul du Fis estimé par le f de Weir & Cockerham et les résultats sont donnés dans le Tableau VII-3. Il n'y a pas de déficits en hétérozygotes significatifs, excepté pour le locus Est dans l'échantillon AP-Pti et pour le locus *OeduH15* dans tous les échantillons. Les autres locus montrent des excès en hétérozygotes. Une corrélation de Bonferroni pour les tests multiples a été appliquée en considérant que, pour chaque population, les observations sur les 5 locus de même type (allozymes ou microsatellite) ne sont pas indépendantes. Le taux de significativité α devient alors 0,01 et deux locus allozymes présentent un excès en hétérozygotes significatif: *Pgm* dans les échantillons AV-Gd et AP-Gd, et *Mdh* dans l'échantillon AP-Gd uniquement.

Tableau VII-3 : Conformité à l'équilibre de Hardy-Weinberg testée par le Fis de Wright, et probabilités associées calculées pour 1000 permutations sur les allèles.

	AV-Pti	AV-Gd	AP-Pti	AP-Gd
<i>Gpi</i>	x	-0.040 ^{ns}	x	-0.011 ^{ns}
<i>Mdh</i>	-0.129 ^{ns}	-0.208 [*]	-0.031 ^{ns}	-0.227 ^{***}
<i>Pgm</i>	-0.224 [*]	-0.303 ^{***}	-0.025 ^{ns}	-0.260 ^{***}
<i>Idh-2</i>	0.079 ^{ns}	-0.119 ^{ns}	-0.084 ^{ns}	-0.108 ^{ns}
<i>ESt-5</i>	-0.190 ^{ns}	-0.129 ^{ns}	0.336 [*]	-0.296 [*]
Allozymes	-0.142^{ns}	-0.207^{***}	-0.025	-0.260^{***}
<i>OeduJ12</i>	-0.006 ^{ns}	-0.076 ^{ns}	-0.002 ^{ns}	-0.036 ^{ns}
<i>OeduB0</i>	-0.042 ^{ns}	-0.130 [*]	-0.121 [*]	-0.142 [*]
<i>OeduT5</i>	-0.088 ^{ns}	-0.031 ^{ns}	-0.081 ^{ns}	0.028 ^{ns}
<i>OeduH15</i>	0.235 ^{***}	0.116 ^{***}	0.180 ^{***}	0.223 ^{***}
<i>OeduO9</i>	-0.084 [*]	-0.035 ^{ns}	-0.100 [*]	-0.036 ^{ns}
Microsatellites	0.002^{ns}	-0.027^{ns}	-0.026^{ns}	0.007^{ns}

Les niveaux de significativité sont donnés par ^{ns} : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 en italique : valeurs significatives après correction de Bonferroni (voir texte)

4. Hétérozygotie multilocus et monolocus

Les HML moyennes par échantillon sont données dans le Tableau VII-4, pour les locus allozymes d'une part et les locus microsatellites d'autre part.

Tableau VII-4 : nombre moyen de locus hétérozygotes par échantillon

	AV-Pti	AV-Gd	AP-Pti	AP-Gd
Allozymes	1.62	1.84	1.2	1.74
Microsatellites	4.26	4.18	4.25	4.19

Le niveau d'HML est globalement plus faible pour les allozymes que pour les microsatellites. En effet, le niveau de polymorphisme de ces derniers fait que les génotypes homozygotes sont beaucoup plus rares, et aucun individu n'a moins de 2 locus microsatellites hétérozygotes. A l'opposé, seule une faible proportion d'individus présente 3 locus allozymes hétérozygotes (ou plus) et ils sont trouvés surtout dans les échantillons AV-Gd et AP-Gd

Le résultat des estimations de la significativité de $d = HML_{Gd} - HML_{Pti}$ est donné sur la Figure VII-2. La différence des HML entre petites et grosses est significative pour les locus allozymes dans l'échantillon après croissance mais non significative avant croissance. Par contre, elle n'est significative à aucun stade pour les locus microsatellites.

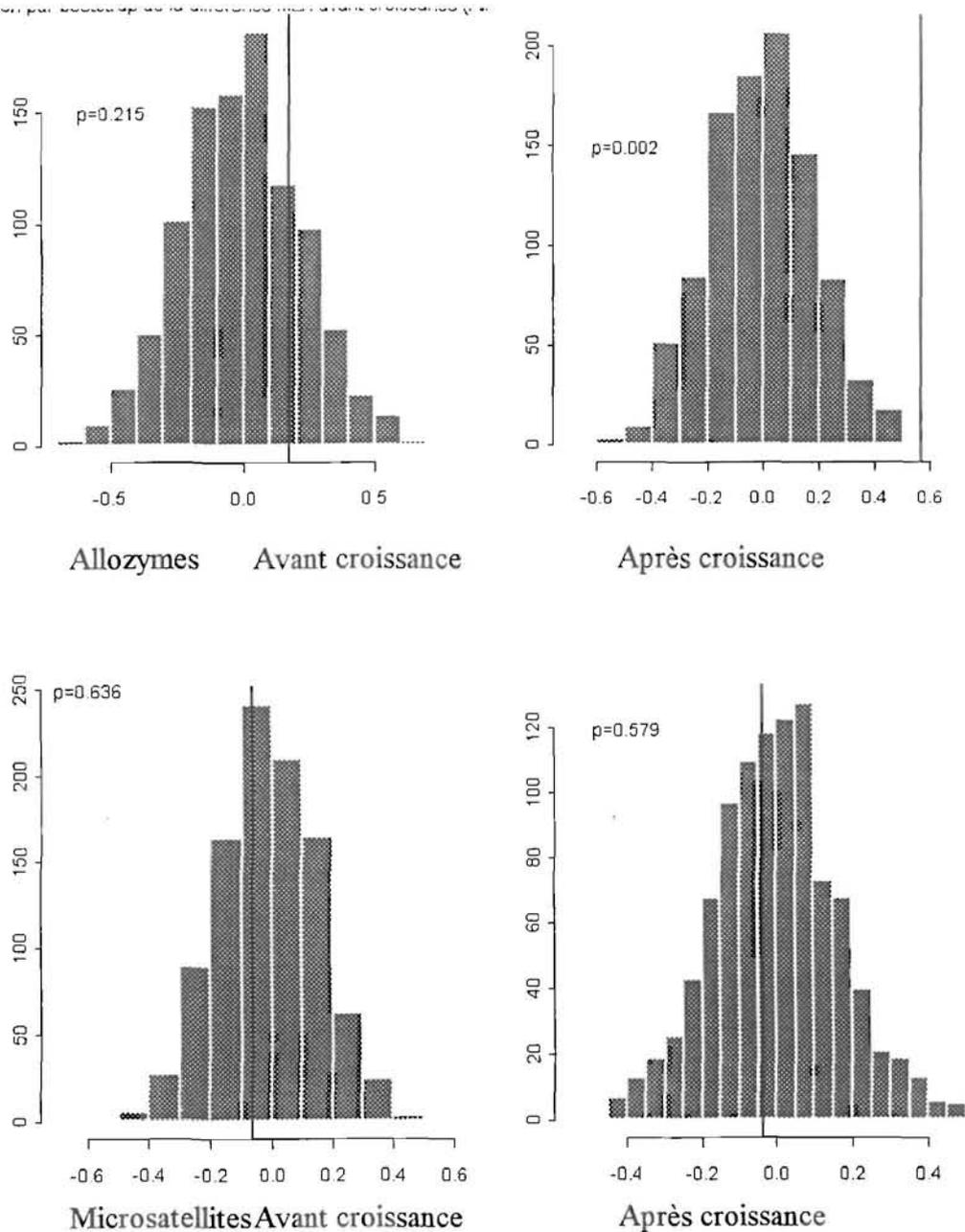


Figure VII-2 : Test par bootstrap de la différence entre hétérozygotie multilocus moyenne des échantillons "pti" et "gd", avant et après croissance, pour les locus allozymes et les locus microsatellites. Les histogrammes représentent les valeurs obtenues par bootstrap et la barre la valeur réelle. p est le pourcentage de valeurs simulées supérieure à la valeur réelle.

L'estimation des effets monocus sont donnés par la valeur p de la probabilité d'obtenir une valeur de d observée plus élevée que la valeur obtenue par bootstrap. Les résultats sont résumés dans le Tableau VII-5. Le niveau d'hétérozygotie observée n'est significativement plus élevé chez Pti que chez Gd que dans 5 cas, à chaque fois pour des locus allozymes : locus *Gpi* et *Est* dans l'échantillon avant croissance et locus *Gpi*, *Pgm* et *Est* dans l'échantillon après croissance.

Tableau VII-5 : Test par bootstrap de la différence entre hétérozygotie monocus moyenne des échantillons "pti" et "gd", avant et après croissance. D représente la valeur réelle. p est le pourcentage de valeurs simulées supérieures à la valeur réelle.

	AV		AP	
	$d=Ho_{\text{grosse}}-Ho_{\text{petite}}$	p	$d=Ho_{\text{grosse}}-Ho_{\text{petite}}$	p
<i>Gpi</i>	0.094	0.01	0.044	0.033
<i>Mdh</i>	-0.430	0.66	-0.087	0.6
<i>Pgm</i>	-0.025	0.65	0.269	0.002
<i>Idh-2</i>	0.026	0.38	0.047	0.35
<i>Est-5</i>	0.135	0.05	0.308	0.001
<i>OeduJ12</i>	0.190	0.37	0.014	0.36
<i>OeduB0</i>	0.043	0.29	0.074	0.20
<i>OeduT5</i>	-0.058	0.47	-0.041	0.69
<i>OeduH15</i>	0.010	0.80	-0.017	0.57
<i>OeduO9</i>	-0.077	0.98	-0.056	0.98

Rappelons les principaux résultats mis en évidence lors de cette étude :

- La diversité génétique de notre échantillon est réduite par rapport à la population naturelle de même origine géographique étudiée au chapitre précédent.
- A part le cas du locus *OeduH15*, il n'y a pas de déficit en hétérozygotes.
- Il n'y a pas de différences en termes d'hétérozygotie moyenne entre Pti et Gd dans l'échantillon AV.
- Par contre, l'échantillon AP montre une corrélation positive et significative entre l'hétérozygotie pour trois locus enzymatiques et les classes de taille.
- Il n'y a pas de relation entre hétérozygotie (mono ou multilocus) et classe de taille pour les locus microsatellites.

D. DISCUSSION

Nous avons montré dans cette étude que l'hétérozygotie multilocus aux locus allozymes dans un lot d'*Ostrea edulis* après 4 mois de croissance est significativement plus élevée pour les grosses huîtres que pour les petites huîtres; comme la taille et surtout l'âge des animaux étaient standardisés au départ de l'expérience, la taille en fin d'expérience est un estimateur direct du taux de croissance. Il y a donc dans notre échantillon une corrélation positive entre hétérozygotie aux locus enzymatiques et croissance. Ces résultats se rapprochent de ceux publiés dans la littérature pour la RHC chez les mollusques bivalves, et notamment chez l'huître plate : Alvarez *et al.* (1989) ont en effet montré une relation semblable dans une cohorte d'*Ostrea edulis* âgée de 30 mois en utilisant le même groupe de locus.

1. Structure génétique de l'échantillon étudié

La population étudiée a été captée sur des collecteurs placés dans le milieu naturel pendant une période relativement courte (une quinzaine de jours), ceci afin d'obtenir une seule cohorte représentative de l'ensemble de la population supposée panmictique présente sur le site. Or, il apparaît dans de nombreuses études que les conclusions que l'on peut tirer sur les effets de l'hétérozygotie aux locus allozymes et la croissance sont largement dépendants de la structure génétique de la population (Gaffney & Scott, 1984). En particulier, la corrélation entre hétérozygotie et croissance n'est en général pas retrouvée dans des populations d'écloserie (Mallet *et al.*, 1986; Beaumont, 1991), qu'elles soient issues de croisements biparentaux ou de ponte en masse. La contribution des différents géniteurs impliqués dans une ponte en masse peut être très disproportionnée, et les paramètres tels la croissance peuvent varier de façon significative à l'intérieur des différentes familles qui peuvent être générées par une ponte en masse, que ce soit pour des raisons génétiques ou non génétiques.

Le nombre d'allèles pour les locus microsatellites *OeduJ12*, *OeduH15*, *OeduO9* et *OeduT5* dans la population étudiée est réduit par rapport à celui de la population de même origine géographique (Port Saint Louis du Rhône) étudiée au Chapitre VI, bien que les niveaux d'hétérozygotie soit comparables entre les deux échantillons. Nous avons vu au Chapitre V que la baisse du nombre d'allèles pouvait être un indice important que la population étudiée est en fait issue d'un faible nombre de géniteurs fondateurs. Cette observation est cohérente avec l'hypothèse de variance interindividuelle dans le succès reproducteur, qui a été discutée par Hedgecock (1994). Par la méthode de bootstrap développée dans le Chapitre V, et en comparaison avec la richesse allélique dans la population de Port Saint Louis du Chapitre VI,

le nombre de parents fondateurs de la population étudiée ici a été estimée entre 9 et 23, les estimations étant assez variables selon les locus (voir Figure VII-3). (N.B. Le locus *OeduBO* n'a pas été étudié dans le chapitre VI).

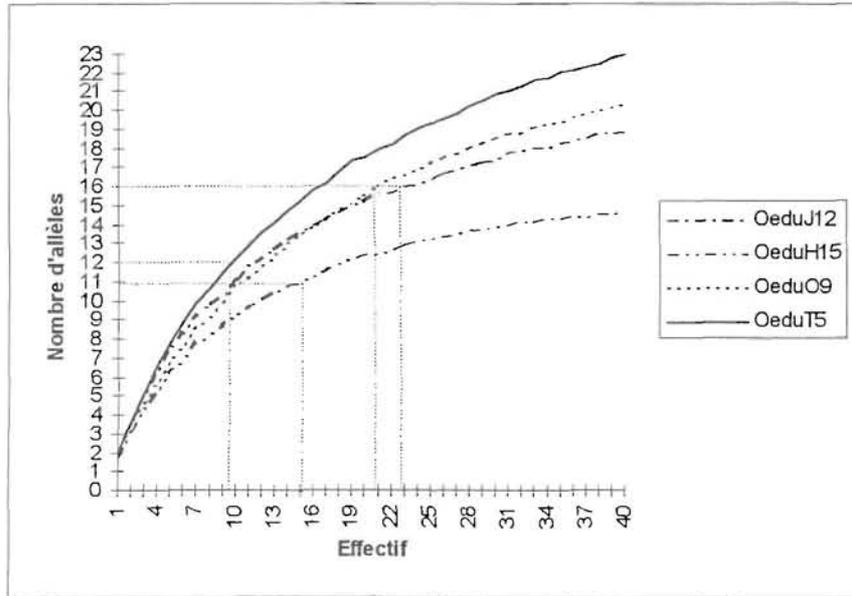


Figure VII-3. Estimation par bootstrap du nombre de géniteurs à l'origine de la population étudiée.

Les courbes représentent la simulation par bootstrap de la richesse allélique dans des échantillons d'effectif variable de la population naturelle de Port-Saint-Louis du Rhône, les droites en pointillés indiquent le nombre de géniteurs correspondant au nombre d'allèle dans la population étudiée dans ce chapitre (voir Chapitre V et Figure V-2 pour les détails sur la méthode)

La population étudiée n'est donc pas comme on le pensait un échantillon représentatif d'une population panmictique de grande taille. Du fait du faible nombre de parents fondateurs à l'origine de cette population échantillonnée, on pourrait craindre une hétérogénéité entre le naissain collecté à différentes dates, ou même l'existence d'une structure familiale dans la population. Dans ce cas, il se pourrait que les individus échantillonnés aux deux extrêmes de la distribution des tailles ne soient pas des échantillons au hasard de la population, mais soient issus de deux groupes familiaux différents. L'hétérogénéité entre les échantillons "Pti" et "Gd", a été testée par un calcul de F_{st} . Les valeurs obtenues sont très faibles, voire nulles (voir Tableau VII-6), indiquant une probable homogénéité de nos différents échantillons, en particulier pour les échantillons AP. Les différents échantillons étudiés sont donc probablement issus du même pool de géniteurs fondateurs, même si ces fondateurs sont en nombre limité.

Tableau VII-6 : hétérogénéité entre les différents échantillons testée par le calcul du Fst (estimé par le Théta de Weir & Cockerham 1984).

	AV-Gd	AP-Pti	AP-Gd
AV-Pti	0.009 **	0.01 **	0.002 ns
AV-Gd		0.01 **	0.004 ns
AP-Pti			0.005 ns

** p < 0.1

ns : valeur non -significative

2. Conformité à Hardy-Weinberg

Contrairement à de nombreuses études sur des populations naturelles de mollusques bivalves (Zouros & Foltz, 1984; Foltz, 1986; Gaffney et al., 1990; Beaumont, 1991; Borsa *et al.*, 1994; Fairbrother & Beaumont, 1993), les locus étudiés ici ne montrent pas de déficits en hétérozygotes par rapport aux proportions attendues sous Hardy-Weinberg. Une exception cependant : des déficits en hétérozygotes significatifs sont observés pour le locus *OeduH15* dans tous les échantillons. Peut-on expliquer ces déficits?

Le déficit en hétérozygote au locus *OeduH15* est observé pour tous les échantillons. De plus, certains individus, bien que permettant des amplifications satisfaisantes aux autres locus, ne montrent aucune amplification à ce locus malgré des essais répétés. Ceci concerne entre 4 et 10% des individus selon les échantillons. Ce résultat est similaire à celui trouvé pour les populations naturelles (voir chapitre précédent). Là encore, nous soupçonnons fortement l'existence d'allèles nuls à ce locus.

La fréquence des allèles nuls a été estimée selon Brookfield (1996) en prenant en compte la fréquence de non-amplification (individus considérés alors comme homozygote pour l'allèle nul) comme cela a été expliqué dans le chapitre précédent. En considérant qu'en moyenne 5% des individus étudiés sont homozygotes nuls, on peut estimer à 0.12 la fréquence des allèles nuls. Etant donné que la fréquence des autres allèles à ce locus est comprise entre 0.02 et 0.3 et qu'il est possible qu'il y ait plusieurs allèles nuls d'origine différentes, l'existence d'un ou plusieurs allèles nuls peut être une hypothèse satisfaisante pour expliquer le déficit en hétérozygotes à ce locus.

Nous avons vu que dans de nombreuses études de la RHC chez les bivalves, la corrélation observée s'accompagne souvent d'un déficit en hétérozygotes (voir notamment Gaffney *et al.*, 1990). Cependant, Alvarez *et al.* (1989) observent dans une cohorte d'*Ostrea edulis* âgée de 18 mois des excès en hétérozygotes pour 2 locus (*Est-3* et *Pgm*) qui disparaissent pour les animaux plus âgés. De même, Saavedra & Guerra (1996) ont étudié la RHC chez cette même

espèce sur des animaux âgés de 6 à 12 mois et ont observé des excès en hétérozygotes significatifs pour un certain nombre de locus. Cependant, dans ces deux cas, les cohortes présentant des excès en hétérozygotes ne montraient pas de corrélation entre HML et croissance. De plus, dans ces mêmes cas, les cohortes étudiées n'étaient pas issues de captage naturel mais de ponte en masse en éclosérie, et les auteurs émettent l'hypothèse d'un effet fondateur important qui expliquerait les excès en hétérozygotes. Nos données sont donc assez atypiques puisqu'on n'observe pas d'écarts aux fréquences génotypiques attendues (et même un excès d'hétérozygotes pour les locus *Pgm* et *Mdh* chez les gros individus) et une relation entre HML aux locus enzymatiques et croissance dans une même cohorte.

3. Consanguinité

Dans des espèces à sexes séparés, une consanguinité partielle peut être produite par croisement d'individus apparentés (Hedrick & Cockerham, 1986). En conséquence, l'homozygotie pour des allèles délétères récessifs augmente chez ces individus, ce qui conduit à une relation positive entre hétérozygotie individuelle et fitness. On observera donc dans la population un excès en homozygotes. Déficits en hétérozygotes et corrélations entre HML et paramètres de croissance sont souvent détectés de façon concomitante dans les études électrophorétiques de populations naturelles de bivalves marins (Gentili & Beaumont, 1988; Gaffney *et al.*, 1990). Si la population étudiée est suffisamment consanguine, alors le déficit en hétérozygotes est évident. L'homozygotie due à la consanguinité entraîne celle d'un certain nombre de gènes délétères récessifs, qui font que les homozygotes auront une moins bonne valeur sélective que les hétérozygotes. A priori, la biologie reproductive des bivalves fait que la présence d'individus apparentés dans un même lieu, leur ponte synchrone et donc la présence d'individus consanguins, sont peu probables.

Nous allons donc d'abord analyser ce que nos données nous apprennent sur l'implication de la consanguinité pour expliquer la RHC, puis nous étudierons les autres hypothèses possibles.

Dans nos données, les déficits en hétérozygotes sont trouvés uniquement au locus *OeduH15* et ont été attribués essentiellement à des allèles nuls. Les autres locus microsatellites ne présentent pas d'écart par rapport aux fréquences attendues. Or, la consanguinité affecte tous les locus de la même façon, sans relation avec les fréquences alléliques. De plus, les microsatellites, du fait de leur important polymorphisme, semblent être un outil particulièrement adéquat pour détecter de la consanguinité dans une population. Chakraborty & Zhong (1994) ont montré par simulation que la puissance de détection de déviations par

rapport à Hardy-Weinberg dues à des causes populationnelles (telles que la consanguinité) augmente avec le nombre de locus, le nombre d'allèles pour chaque locus et la présence d'allèles rares. Bierne *et al.* (1997) ont étudié la descendance de 2 croisements consanguins (plein-frères) d'*Ostrea edulis* avec 4 locus microsatellites (à savoir *OeduB0*, *OeduJ12*, *OeduT5* et *OeduO9*) et ont détecté un effet significatif de l'hétérozygotie à ces locus sur la croissance et la survie, indiquant un fardeau génétique potentiellement très lourd chez cette espèce; les locus microsatellites co-ségrègeraient alors avec des gènes associés à la fitness (Fitness-Associated Genes ou FAGs) qui seraient relativement abondants dans le génome (estimés entre 15 et 40). Ceci confirme le potentiel des locus microsatellites pour révéler les relations de consanguinité, et notamment le potentiel de ces locus-là chez cette espèce (l'article en question est fourni en Annexe A).

Les microsatellites ne montrant aucun écart par rapport aux proportions attendues sous Hardy-Weinberg, on peut dire qu'il n'y a pas de consanguinité dans notre population, ou plus exactement que si il y en a, c'est à un niveau trop faible pour être détecté. En effet l'étude de Bierne *et al.* (1997) impliquaient des plein-frères issus de plein-frères, donc avec un coefficient de consanguinité de 0.5, ce qui est difficilement concevable dans des populations naturelles. La relation observée entre hétérozygotie et classe de taille pour les locus allozymes semble alors due à un avantage des hétérozygotes par rapport à la moyenne, soit un effet de superdominance directe des locus allozymes. Le fait d'observer des excès significatifs de génotypes hétérozygotes pour le locus *Pgm* chez les plus gros individus est une confirmation d'un effet direct des gènes enzymatiques sur la corrélation, car des études mentionnent que ce locus n'est pas sélectivement neutre (voir par exemple Pogson, 1991).

4. Pourquoi n'y a-t'il pas de corrélation dans l'échantillon AV?

La détection statistique de la RHC dépend de nombreux facteurs, dont (1) la structure génétique de la population (Gaffney & Scott, 1984) ou (2) l'échantillonnage d'une cohorte après une phase de mortalité différentielle. Dans ce dernier cas, on peut obtenir des résultats variables. Ainsi, Koehn & Gaffney (1984) ont trouvé une RHC positive dans une cohorte de *Mytilus edulis* échantillonnée deux mois après fixation, mais la même cohorte échantillonnée à 8 mois ne montrait plus de RHC significative (Diehl & Koehn, 1985). Les auteurs suggèrent que des mortalités différentielles, affectant principalement les petits individus (donc homozygotes), peuvent masquer l'effet de l'hétérozygotie sur la croissance, observé aux stages plus jeunes. Un déclin de la corrélation avec l'âge a également été observé chez *Crassostrea*

virginica (Zouros *et al.*, 1980; Singh, 1982), *Ostrea chilensis* (Toro *et al.*, 1996) ou encore *Mytilus edulis* (Mallet *et al.*, 1986). Outre l'hypothèse de viabilité différentielle, une autre hypothèse pour la baisse de significativité de la RHC avec l'âge est le déplacement de l'allocation de l'énergie depuis la croissance vers la reproduction (Rodhouse *et al.*, 1986). La situation observée dans notre étude est cependant inversée : la corrélation devient significative avec l'âge.

Les animaux avant et après croissance n'ont pas été élevés dans le même environnement : sur collecteurs avant croissance, et ensuite en poche. La densité des poches a été contrôlée mais il est très difficile de quantifier les différences entre les deux conditions d'élevage. Alvarez *et al.* (1989) rapportent une RHC significative dans une cohorte d'*Ostrea edulis* de 30 mois, mais pas de corrélation dans la même cohorte à 18 mois. Des effets de densité durant l'élevage des animaux peuvent avoir néanmoins faussé le résultat. En effet, Gentili & Beaumont (1988) ont étudié les relations entre hétérozygotie et croissance dans une cohorte de *Mytilus edulis* divisée en 2 échantillons élevés respectivement à forte et faible densité. Dans le premier cas (élevage en forte densité), une corrélation positive entre l'hétérozygotie et le taux de croissance a été observée, mais elle n'a pas été trouvée dans le lot élevé à faible densité. Ceci suggère que des relations hétérozygotie-croissance peuvent être accentuées, voire même simplement être rendues détectables, par des stress environnementaux. Cette hypothèse est également confortée par les travaux de Green *et al.* (1983) sur *Macoma balthica*, de Rodhouse & Gaffney (1984) chez *Crassostrea virginica*, et même dans le cas des conifères (Ledig *et al.*, 1983).

Vigouroux (1994) a étudié les relations entre hétérozygotie aux locus allozymes et croissance dans une population d'huître plate captée en Baie de Quiberon et élevée en conditions contrôlées à l'écloserie de La Tremblade (avec nourriture non limitante), et n'a pas trouvé de relation significative, voire même une tendance des individus poussant plus vite à être moins hétérozygotes que ceux à croissance lente.

Il semble ainsi que la compétition intrapopulation soit nécessaire pour que la RHC devienne significative. Si la RHC est effectivement due à l'effet direct des allozymes, cela peut s'expliquer par le fait que le phénomène observé (superdominance directe aux locus enzymatiques) s'apparente à un effet d'hétérosis qui est souvent plus fort en situation de compétition. En cas de superdominance associative, on peut expliquer aussi que la RHC se révèle en situation de compétition. En effet, on peut penser que les individus les plus homozygotes ont le plus de chance de porter des allèles récessifs partiellement délétères, qui vont réduire leur performances en situation de compétition.

Une autre explication peut tenir à une éventuelle différence d'âge entre les animaux. Dans l'échantillon AV, des différences de dates de fixation même de quelques jours peuvent produire des différences de tailles sur des animaux de 6 mois. De ce fait, les différences de poids observées peuvent tenir à des potentiels de croissance différents, mais également à des différences d'âge. Par contre, dans l'échantillon après croissance, comme tous les animaux avaient au départ la même taille, les différences de poids ne tiennent qu'à des différences de croissance.

E. CONCLUSION

Nous avons tenté dans cette étude de produire puis d'analyser avec différents types de marqueurs enzymatiques un matériel biologique approprié à l'étude de la relation hétérozygotie/croissance des bivalves marins. Cependant, bien qu'au cours de l'étude il soit apparu que le schéma expérimental n'était pas optimal pour répondre à cette question, cette étude a permis tout de même d'apporter de nombreuses informations sur la biologie de l'huître plate.

Nous avons tenté de récolter un échantillon représentatif d'une large population panmictique, mais en évitant de récolter plusieurs cohortes successives. Il est apparu que le naissain capté sur une période de temps courte était issu d'un nombre réduit de géniteurs (probablement moins d'une vingtaine de géniteurs). Ces résultats, portant sur une population naturelle, sont directement à relier avec ceux du Chapitre V, où l'on a vu que lorsqu'on provoque des pontes en masse impliquant 100 géniteurs, un nombre très faible de ceux-ci peuvent effectivement participer à une ponte. Ceci nous apporte de nouvelles informations sur le comportement reproducteur d'*O. edulis*. Il semble que la maturation sexuelle ne soit pas synchrone chez cette espèce, et que le succès reproducteur soit hautement variable dans le temps selon les individus. Ceci avait déjà été observé pour des populations d'écloserie (Saavedra & Guerra, 1996; A. Gérard, comm. pers) et est ici rapporté pour la première fois pour une population naturelle chez cette espèce.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une relation entre hétérozygotie pour plusieurs locus allozymes et croissance. On ne peut pas conclure directement sur la corrélation entre hétérozygotie aux locus microsatellites et croissance, car les microsatellites sont apparus extrêmement variables, avec des taux d'hétérozygotie observés trop élevés pour permettre des comparaisons statistiquement fiables avec nos tailles d'échantillons. Si l'on veut poursuivre ce type d'étude à l'aide de marqueurs microsatellites, il pourrait être intéressant de chercher des

motifs tri- voire tétra-nucléotidiques qui seraient moins variables. Cependant, l'utilisation dans la même étude de marqueurs microsatellites nous permet de nous affranchir de l'hypothèse de consanguinité forte pour expliquer cette RHC observée pour les allozymes. De même, du fait de l'absence de déficits en hétérozygotes, nous pouvons ici écarter les hypothèses du type allèles nuls ou aneuploïdie aux locus allozymes. En conséquence, nos résultats soutiennent l'hypothèse de superdominance directe à certains locus allozymes (à savoir *Pgm*, *Gpi* et *Est-D3*) pour expliquer la RHC observée ici. Cela n'exclue pas l'hypothèse de superdominance associative comme explication de la RHC dans d'autres études, mais, dans nos données, le rejet de l'hypothèse de consanguinité nous permet de dire que la sélection agissant directement sur certains allozymes peut provoquer l'apparition d'une RHC significative.

VIII. PERFORMANCES DE CROISSANCE ET VARIABILITE GENETIQUE DANS DES CROISEMENTS CONTROLES

A. INTRODUCTION

Après la réorganisation en 1993 du programme de sélection pour une résistance à *Bonamia ostreae* vers l'utilisation de croisements contrôlés (bi-parentaux), les performances de résistance et de croissance ont été testées dans le milieu naturel en Baie de Quiberon, comme nous l'avons vu dans le Chapitre I. Parallèlement, la croissance des huîtres a été suivie en conditions contrôlées à la nurserie IFREMER de Bouin (Vendée). Le but de cette expérience était tout d'abord de vérifier l'existence d'une variabilité génétique pour un caractère quantitatif tel que la croissance, afin d'estimer si les fortes pressions de sélection étaient associées avec une baisse des performances de croissance. Un dispositif expérimental a été mis en place pour réduire au maximum les facteurs environnementaux. La mise au point de ce dispositif s'est faite en 1994-1995 lors d'une expérience visant à comparer les performances de croissance d'un croisement entre un croisement P85-G2 x P89-G1 (G1G2), un croisement P89-G1 x Témoin Quiberon (G0G1) avec deux populations témoins, l'une issue de la Baie de Quiberon et l'autre de Méditerranée (Baud *et al.*, 1997). Après la première année, les croisements impliquant des populations sélectionnées ont montré une meilleure croissance que les deux populations témoins. De plus, la mortalité cumulée était significativement plus faible pour la G1G2. Les bonnes performances des lignées sélectionnées ont été attribuées à une meilleure résistance au confinement.

Ainsi que nous l'avons vu au Chapitre I, les potentialités de sélection pour la croissance existent chez *Ostrea edulis*, à condition que l'on puisse contrôler les variations environnementales. Le dispositif expérimental mis au point semblant adapté dans cette optique, la croissance des familles produites en 1995 a été suivie dans ces mêmes conditions contrôlées, afin de vérifier si effectivement les populations sélectionnées présentent de bonnes performances de croissance. Dans ce cadre, l'apport particulier de notre travail était de tester les relations pouvant exister, dans des croisements contrôlés, entre la variabilité génétique et les performances de croissance.

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, les recherches de corrélation entre hétérozygotie aux locus allozymiques et croissance dans des croisements contrôlés ont souvent été infructueuses (Beaumont *et al.*, 1983; Mallet *et al.*, 1986; Beaumont, 1991). En fait, il

semble que la structure génétique de la population soit très importante pour l'observation de corrélation entre hétérozygotie aux locus allozymes et croissance.

On a vu dans le chapitre précédent que, dans une population naturelle, on n'observe pas de corrélation entre l'hétérozygotie aux locus microsatellites et la croissance. Cependant, nous soupçonnons dans les populations sélectionnées l'existence de sous-populations plus ou moins homogènes, qui sont vraisemblablement constitués d'individus apparentés, et il y a donc un risque d'apparition de consanguinité dans les populations. Or, Bierne *et al.* (1997) ont montré qu'en cas de consanguinité, l'hétérozygotie aux locus microsatellites est corrélée à la croissance, parce que les microsatellites co-segrègent avec de larges portions de chromosomes qui pourraient porter des gènes délétères récessifs, rendus homozygotes par consanguinité. En conséquence, outre analyser la variabilité génétique pour le caractère de croissance, notre objectif était de voir si, dans des populations potentiellement consanguines mais dont on ignore les généalogies (P85, par exemple), on peut espérer, avec l'information déduite d'un nombre réduit de marqueurs (comme un indice d'identité par exemple), choisir des géniteurs à recroiser en étant sur d'éviter (ou de limiter) les risques liés à la consanguinité (baisse de performances notamment).

Nous avons ici tenté de tester si il existe une variabilité pour la croissance dans les familles du programme de sélection produites en 1995, et si on peut expliquer cette variabilité par les relations de parenté existant entre les géniteurs de chacune des familles, parenté réelle (dans le cas de la P89i et ni) ou estimée par un coefficient d'identité (dans le cas de la P85).

B. MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

Les familles produites en 1995 sont présentées au Chapitre V. Rappelons qu'elles sont issues de croisements biparentaux intra et inter-populations sélectionnées P85-G2, P89i-G1 et P89ni-G1.

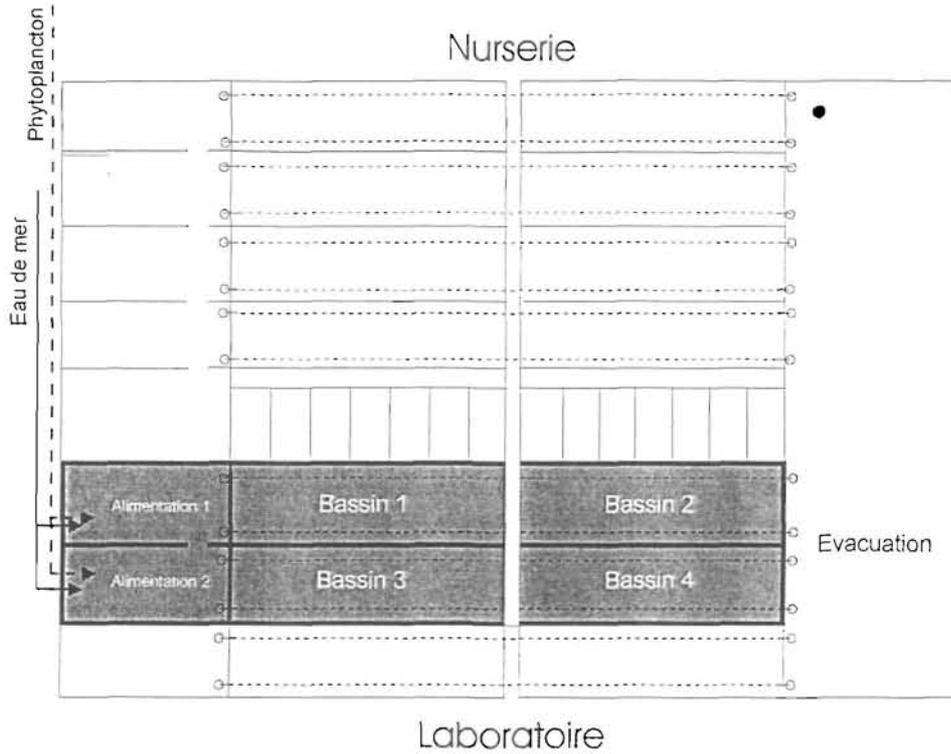
La quasi-totalité des familles a été transférée pour prégrossissement à la station de Bouin entre la mi-avril et fin juin 1995. Des mesures prophylactiques strictes ont été prises pour empêcher sinon l'apparition, du moins la prolifération de l'*Herpès* virus. Certaines familles ont cependant, présenté des mortalités anormales (12 familles au total). Les travaux de Claude Delsert et de l'équipe de Pathologie de La Tremblade ont permis de mettre au point un test diagnostic de l'*Herpès* par PCR. Un échantillon de 5 individus de chacune des familles a été

testé par cette méthode. Seuls trois lots ont donné une réponse positive, dont un n'avait pas (et n'a toujours pas à cette date) présenté de mortalité anormale. Cependant, le test diagnostic n'est pas fiable à 100%. En effet, il n'est actuellement pas possible de détecter le virus en faible quantité dans les cellules sur d'aussi gros animaux. En conséquence, une réponse négative au test n'indique pas de façon sûre que le lot est indemne. Dans le doute, toutes les familles ayant connu des mortalités anormales, ainsi que la famille donnant une réponse positive au test *Herpès*, ont été écartées des expérimentations à la Station de Bouin.

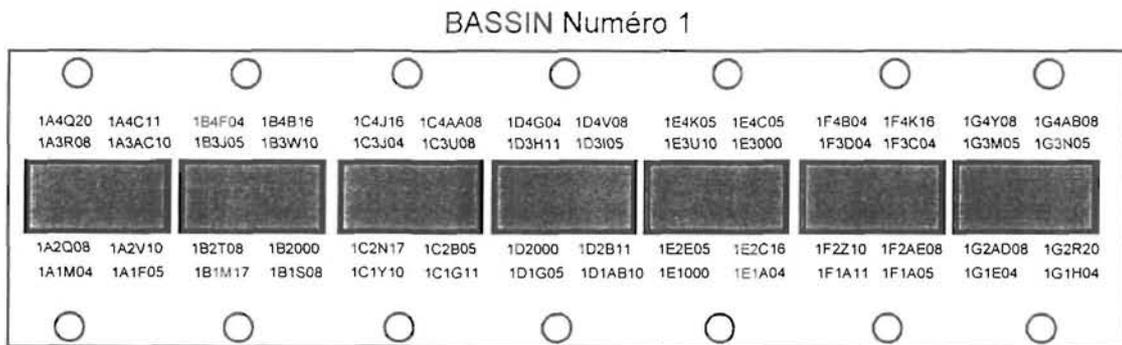
Du fait de grandes variations inter-familiales dans les effectifs disponibles, et du fait que certaines familles ont été suspectées porteuses du virus *Herpes*, toutes les familles n'ont pas été étudiées. La croissance en conditions contrôlées a été suivie sur 50 familles, dont 17 issues de la P85-G2, 8 issues de la P89i-G1, 10 issues de la P89ni-G1 et 10 issues de croisements entre populations sélectionnées, ainsi que 5 familles issues de géniteurs témoins captés en Baie de Quiberon.

2. Dispositif expérimental

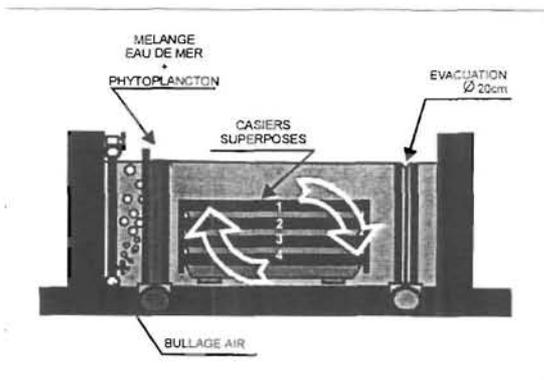
Afin d'évaluer les paramètres génétiques de la croissance chez *Ostrea edulis*, un dispositif expérimental a été mis en place au printemps 1996 à la station de Bouin. Il s'agit d'un plan expérimental en bloc complet, constitué de deux couloirs, chacun avec deux "super-blocs" contenant 100 individus de chaque famille. Au total, ce sont donc 400 individus de chaque famille qui ont été étudiés. Au préalable à la mise en place, des mesures de taille et poids total ont été effectuées sur chaque lot. Dans chaque famille, 40 individus (4 x 10) ont été numérotés individuellement, pesés et mesurés. (voir Figure VIII-1). Les animaux étaient nourris par des microalgues de l'espèce *Skeletonema costatum* cultivée en eau de forage salée souterraine (Baud & Bacher, 1990), à raison de $3 \cdot 10^9$ cellules par huître et par jour (Baud *et al.*, 1997). Le mélange contenant les algues est ajouté progressivement sur 24 heures dans chaque couloir, par 7 bouches d'alimentations identiques distribuées de mètre en mètre dans la largeur du couloir. Un bullage assure l'homogénéité de l'eau.



A. Vue du dessus du dispositif expérimental constitués de 2 couloirs de 2 bassins (super-blocs) chacun



B. Chaque bassin est constitué de 7 blocs. 1 bloc = 4 casiers superposés contenant chacun 2 familles à raison de 100 individus par familles



C. Vue en coupe de l'un des bassins montrant la circulation de l'eau et du phytoplancton.

Figure VIII-1 : Dispositif expérimental de suivi de croissance des familles produites en 1995 (Station IFREMER de Bouin)

3. Mesures

Le suivi des performances a été effectué tous les 15 jours pendant les 3 premiers mois de l'expérience, puis tous les mois ensuite pendant 6 mois. A chaque point de mesure, on a relevé la mortalité dans chaque famille, puis chaque individu numéroté a été pesé et mesuré en longueur et en largeur.

M. Barré (données non montrées) a montré que les courbes de croissance montraient une tendance linéaire, qui a été démontrée par régression linéaire avec des valeurs de R^2 toujours supérieures à 0,95. Nous avons donc utilisé comme indicateur des performances de croissance d'un individu la pente de cette droite de régression linéaire.

4. Analyses statistiques

Pour chaque population, les variances intra-population ont été comparées avec un test F_{max} (Sokal & Rohlf, 1995). Dans tous les cas, on a montré une hétéroscédasticité de la variance. En conséquence, plutôt qu'une analyse de variance classique, nous avons utilisé une méthode d'analyse par bootstrap pour tester les carrés moyens. Les données ont été rééchantillonnées 1000 fois sans remplacement et les carrés moyens calculés pour chaque rééchantillonnage. La valeur réelle pour les carrés moyens a été considérée significative au seuil α quand elle était supérieure à $(1-\alpha)$ % des valeurs simulées. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel S-Plus.

Pour le modèle total qui permettrait de comparer les populations entre elles, et bien que le test de F_{max} indique une hétéroscédasticité de la variance, l'analyse par bootstrap n'a pu être réalisée à temps pour cause de dépassement des capacités de calcul de l'ordinateur utilisé. Nous avons donc effectuée une simple analyse de variance en utilisant la procédure GLM du logiciel SAS, sachant qu'une hétérogénéité faible des variances ne biaise pas trop le test global de significativité, mais peut par contre biaiser les comparaisons par paire à 1 ddl (Sokal & Rohlf, 1995)

Les comparaisons de moyenne ont été effectuées par le test de Student-Neuman-Keuls.

Le modèle testé pour chaque population est le suivant :

$Y_{ijk} = \mu + p_i + r_j + ij + E_{ijk}$, où p_i est l'effet population (ou famille), r_j l'effet bloc (couloir), ij l'interaction entre population et couloir, et E_{ijk} la résiduelle.

Nous avons ensuite étudié les corrélations entre les performances d'un individu et les relations de parenté de ses parents.

C. RESULTATS

a) *Différence de croissance entre populations*

La Figure VIII-2 montre la moyenne et l'écart-type de la pente de la croissance pour chaque famille de chaque population.

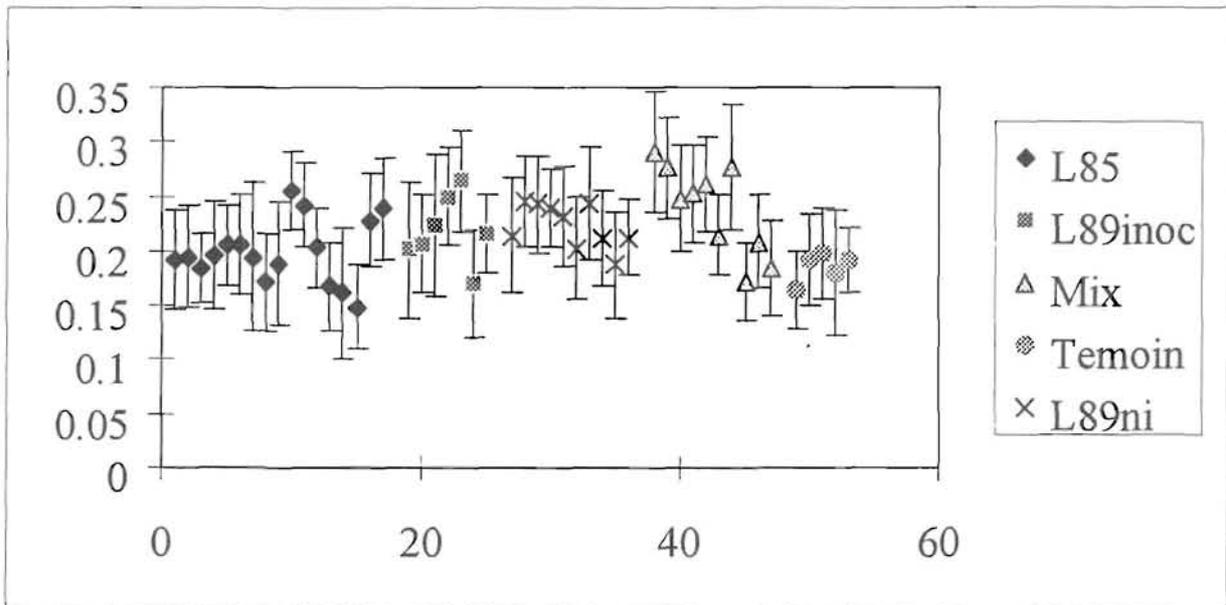


Figure VIII-2 : moyenne et écart-type des pentes pour chaque famille de chaque population

L'analyse de variance indique un effet population et un effet bloc significatifs ($p < 0.001$) mais l'effet d'interaction population*bloc n'est pas significatif ($p = 0.69$)

Les résultats du test de Student-Neumans-Keuls de comparaison de moyennes indiquent que, à part les deux populations P89ni et i, toutes les populations sont significativement différentes. Les meilleurs croissances sont au sein des familles issues de croisement interpopulations (pente moyenne = 0.238), pente qui est significativement supérieure à celles des populations P89ni-G2 et P89i-G2 (0.222 et 0.218). On trouve ensuite la P85-G3 ($p = 0.198$) et la population témoin (0.185).

b) *Différences de croissance entre famille*

Les pentes moyennes par famille sont données dans les Tableaux VIII-1 à VIII-5. Pour toutes les populations, il y a un effet famille et un effet bloc significatifs. Néanmoins, l'interaction famille*bloc n'est jamais significative.

Tableau VIII-1 : Pente moyenne dans les familles de P85-G3

Effet :	Population *** ¹
	Bloc ***
	Interaction ^{ns}
Famille	Pente moyenne
L5H	0.25557
L5J	0.24187
L5Z	0.23776
L5Y	0.22820
L5D	0.20520
L5C	0.20465
L5M	0.20289
L5B	0.19575
L5E	0.19446
L5AB	0.19377
L5A	0.19242
L5G	0.18936
L5AC	0.18377
L5F	0.17164
L5U	0.16701
L5V	0.16157
L5W	0.14879

¹ : ^{ns} : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

Tableau VIII-2: Pente moyenne dans les familles de P89i-G2

Effet :	Population *** ¹
	Bloc *
	Interaction ^{ns}
Famille	Pente moyenne
L9M	0.26431
L9J	0.25025
L9I	0.22326
L9Y	0.21626
L9E	0.20571
L9C	0.20095
L9U	0.16998

¹ : ^{ns} : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

Tableau VIII-3: Pente moyenne dans les familles de P89ni-G2

Effet :	Population *** ¹
	Bloc *
	Interaction ^{ns}
Famille	Pente moyenne
L9AA	0.244988
L9K	0.242886
L9AB	0.242771
L9AD	0.238718
L9AE	0.231294
L9A	0.214302
L9Q	0.211730
L9V	0.211648
L9F	0.202842
L9R	0.187326

¹ : ^{ns} : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

Tableau VIII-4: Pente moyenne dans les familles de croisements entre P85-G2, P89ni-G1 et P89i-G1.

Effet :	Population *** ¹
	Bloc *
	Interaction ^{ns}
Famille	Pente moyenne
L9G	0.290485
MG	0.277608
L9S	0.275838
MB	0.261487
MA	0.252180
L9T	0.247578
L9B	0.233849
MC	0.213736
MM	0.208305
MN	0.183804
MH	0.171320

Nom de famille commençant par M : croisement entre P85-G2 et l'une des P89-G1

Nom de famille commençant par L9 : croisement entre P89i-G1 et P89ni-G1

¹ : ^{ns} : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

Tableau VIII-5: Pente moyenne dans les familles issus de croisements entre Témoins

Effet :	Population *** ¹
	Bloc *
	Interaction ^{ns}
Famille	Pente moyenne
TK	0.197860
TR	0.192437
TJ	0.191650
TQ	0.180412
TC	0.164150

¹ : ns : p>0.05, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

- (1) Différences liées au degré d'apparentement des parents de chaque famille

On a pu mettre en évidence (Chapitre V) les relations de parenté entre les géniteurs des familles des populations P89i-G2 et P89ni-G2. On teste l'effet de l'apparentement de deux individus sur la performance de croissance de leur descendance par une analyse de variance simple : $Y_{ij} = \mu + a_i + E_{ij}$ où Y_{ij} est la pente du $j^{\text{ème}}$ individu de la $i^{\text{ème}}$ famille et a_i est le rapport de parenté des deux géniteurs de la famille i . a_i peut prendre trois modalités différentes, à savoir FS, HS et NR (pour plein-frères, demi-frères et non apparentés).

L'effet "apparentement" est très significatif ($p<0.001$); les familles issues de plein-frères sont significativement moins performantes en termes de croissance que les familles issus de demi-frères, et les familles issues du croisement d'individus *a priori* non apparentés sont encore meilleures. Ces résultats sont à relier directement avec l'existence d'une dépression de consanguinité due à un fardeau génétique qui semble important chez les bivalves (Bierne *et al.*, 1997)

- (2) Différences liées à l'identité génétique entre les 2 parents

La Figure VIII-3 indique les liens entre l'indice d'identité génétique (tel qu'on l'a défini au Chapitre V) de deux géniteurs et la pente moyenne de sa descendance, pour les familles de la P85-G3. Le coefficient de corrélation entre les 2 matrices est très faible (0.07) et il ne semble pas y avoir de lien entre l'indice d'identité entre 2 individus et les performances de leur descendance. Cependant, la droite de régression (en trait plein sur la Figure VIII-3) entre ces deux variables peut apparaître biaisée par le point de coordonnées [0.73; 0.24] à l'extrême droite du graphique (qui correspond à la famille L85J). Si on ne prend pas ce point en compte,

la droite de régression (en pointillés sur la Figure VIII-3) indique une tendance à la baisse de la pente moyenne d'une famille quand l'identité génétique des parents augmente.

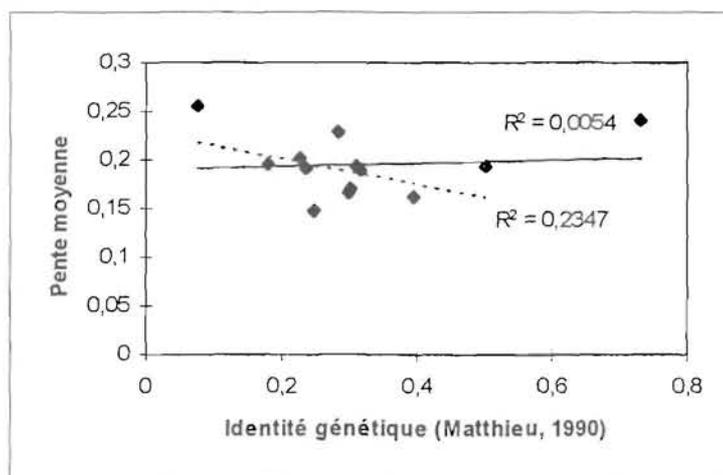


Figure VIII-3 : pente moyenne de la croissance des familles P85-G3 en fonction de l'identité génétique entre les parents.

En traits plein : droite de régression sur l'ensemble des points; en traits pointillés : droite de régression en ôtant le point le plus à droite (de coordonnées [0,73; 0,24])

D. DISCUSSION

Les populations sélectionnées semblent avoir de meilleures performances de croissance que les populations témoins, bien que ces résultats soient à prendre avec prudence étant donné que la population témoin n'est représentée dans notre expérience que par 5 familles. Ces résultats confirment ceux obtenus par Baud *et al.* (1997) sur la première année de croissance de la G1G2 (voir introduction). Cependant, cette expérience a été poursuivie et l'avantage des populations sélectionnées en terme de croissance semble disparaître en deuxième année (Naciri-Graven *et al.*, in prep). Une hypothèse avancée, soutenue par des observations écophysiologicals, est que les conditions optimales de croissance seraient différentes entre les populations sélectionnées et les populations témoins. Ainsi, les populations sélectionnées se comporteraient mieux que le témoin dans des conditions stressantes, les environnements chauds et confinés, alors que les populations naturelles seraient plus adaptées à des eaux plus froides et des environnements moins confinés. Les performances des familles issues d'intercroisements entre les populations, qui présentent une meilleure croissance que les familles intrapopulations, indiquent l'existence d'un effet d'hétérosis, qui pourrait s'expliquer par l'hypothèse de dominance car on croise des populations largement différenciées (voir Chapitre V).

Enfin, il semble plus difficile de pouvoir prévoir ou expliquer la variabilité dans le caractère de croissance à partir des seuls génotypes parentaux à 5 locus microsatellites quand la généalogie

est inconnue, bien qu'une tendance existe vers la baisse des performances de croissance quand l'identité des parents augmente. Le génotypage direct des individus dont la croissance a été suivie pourrait apporter des informations supplémentaires sur les relations entre variabilité génétique révélée par des locus marqueurs et performances de croissance.

D'autre part, ces données apportent un nouvel éclairage aux résultats présentés par Naciri *et al.* (1997) sur les performances aussi bien de croissance que de résistance des P85-G3 et P89-G2 produites par ponte en masse en 1993. Notons que la P89-G2 regroupe à la fois des individus issus de la P89i et de la P89ni. Dans les deux populations, une baisse du niveau de résistance était notée en deuxième génération, et l'hypothèse avancée de l'existence d'une dépression de consanguinité dans ces populations semblent confirmée par nos résultats. En ce qui concerne la croissance, cependant, la variance du poids était systématiquement plus élevée pour les deux populations sélectionnées par rapport au témoin, et ceci de façon significative pour la P89-G2. Ce résultat indiquait l'existence d'une variation importante dans les populations sélectionnées, malgré les pressions de sélection fortes et la probable consanguinité Goodnight (1987) a montré que lors de phénomènes de fondation, la variance génétique de la population fondatrice est redistribuée dans un changement de variance dans la population fondée, alors que la moyenne globale de la population peut changer. Dans certaines conditions, en particulier en présence d'épistatis et/ou de dominance, en cas de petits nombres de géniteurs fondateurs ou de goulots d'étranglements successifs (Goodnight, 1988; Willis & Orr, 1993; Cheverud & Routman, 1996) la variance dans les populations fondées peut dépasser la variance dans la population fondatrice. Cette hypothèse émise par Naciri *et al.* (1997) semble bien confirmée par nos données, puisque les populations sélectionnées sont effectivement issues d'un faible nombre de parents fondateurs, et que les populations étudiées par Naciri *et al.* (1997) sont issues de plusieurs pontes en masse successives, et donc vraisemblablement de goulot d'étranglements successifs, qui ont pu réduire encore le nombre de géniteurs efficaces par rapport aux résultats présentés au Chapitre V.

CONCLUSION

GENERALE

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

BILAN

Le présent travail a permis de mettre au point de nouveaux marqueurs moléculaires du génome d'*Ostrea edulis*. Le laboratoire dispose maintenant de 6 locus microsatellites utilisables en routine, que nous avons utilisés pour répondre à différents aspects de la biologie fondamentale et appliquée de cette espèce.

Ces marqueurs montrent un polymorphisme très élevé, largement supérieur à celui des marqueurs allozymes traditionnellement utilisés sur cette espèce. Cependant, notons tout de suite qu'on a eu à prendre en compte les différentes caractéristiques de ce type de locus, caractéristiques que l'on présentait au Chapitre II : modèle et taux de mutation, allèles nuls, conservation entre espèces. Les modèles de mutation expliquant la variabilité observée oscillent entre le modèle à nombre infini d'allèles et le modèle pas à pas simple. La prise en compte des propriétés structurales de ces séquences (nombre de répétitions, taille du motif répété...) ainsi que des propriétés qui en découlent (distribution de fréquences alléliques, taux de mutation, mode de transmission, forces évolutives qui agissent pour modifier les fréquences alléliques) semblent d'importance pour mieux interpréter d'un point de vue génétique les résultats obtenus avec ces marqueurs. Des allèles nuls ont été trouvés à l'un des locus en fréquences importantes, et cela peut biaiser certaines observations. Nous avons attribué ces allèles nuls à des mutations dans les régions flanquantes empêchant l'appariement des amorces lors de la PCR. Enfin, les microsatellites mis en évidence chez *Ostrea edulis* semblent difficilement transférables à d'autres espèces du genre *Ostrea*; cependant, deux locus ont amplifié des fragments polymorphes chez *Tiostrea chilensis*. Ce résultat est étonnant et pourrait amener à se poser quelques questions sur la phylogénie des huîtres plates, dont peu de choses sont connues jusqu'ici.

Mais si ce travail nous a permis d'en savoir un peu plus sur l'outil, plus encore l'outil lui-même nous a apporté des orientations nouvelles sur des problématiques plus ou moins anciennes de la biologie évolutive et de l'élevage d'*Ostrea edulis* en particulier et des bivalves marins en général.

Notons tout d'abord que cet outil se révèle précieux pour répondre à de nombreuses questions touchant les programmes d'amélioration génétique. Grâce à seulement 5 locus, nous avons pu décrire de façon précise la variabilité génétique au sein de populations, ceci jusqu'à l'identification de familles. Comme nous pouvions le supposer, les populations sélectionnées ont subi des goulots d'étranglement importants et sont menacées de dérive importante à très court terme; l'établissement des relations de parenté entre les individus va permettre de gérer rationnellement les croisements afin d'éviter ou tout au moins de limiter la consanguinité.

L'étude de ségrégations de locus microsatellites a permis l'identification de groupes de liaison, première base d'une cartographie du génome de l'huître plate, outil précieux pour de nombreuses problématiques et notamment l'identification de QTL ou de gènes majeurs. Cependant, nous nous sommes heurtés à cette étape à un problème qui semble être majeur chez les bivalves marins : l'existence à certains locus de distorsions de ségrégation importantes, d'origine incertaine, peut-être liées à des phénomènes sélectifs. Ces distorsions peuvent apparaître très précocement dans le cycle de vie de l'animal et donc biaiser les estimations des taux de recombinaison. L'intérêt d'utiliser des marqueurs microsatellites est qu'ils sont analysables chez des animaux très jeunes, limitant ainsi les distorsions, ou tout au moins les distorsions génotypiques.

Enfin, l'utilisation de cette nouvelle génération de marqueurs a permis de jeter un éclairage nouveau sur des questions posées par le généticien des populations. D'une part, ces marqueurs ont permis de caractériser la structuration génétique des populations d'*Ostrea edulis* sur son aire de répartition et de retracer l'histoire de colonisation de cette espèce. Ces résultats, concordants avec ceux obtenus avec des marqueurs allozymes, indiquent que la répartition actuelle des populations d'huître plate résulte de la recolonisation post-glaciaire des côtes Atlantiques par des populations d'origine méditerranéenne; cette recolonisation a pu s'accompagner d'effets de fondation qui expliqueraient une variabilité moindre pour les populations atlantiques que pour les populations méditerranéennes. La structuration des populations atlantiques a été également influencée par l'action de l'homme et par les attaques parasitaires, mais l'espèce ne semble actuellement pas menacée d'extinction.

Nos travaux nous ont aussi apporté des connaissances nouvelles sur la biologie reproductive de l'huître plate. On soupçonnait depuis longtemps, dans les populations en éclosure, que la reproduction par ponte en masse n'impliquait qu'un faible nombre de géniteurs effectifs. On a ici la preuve que même lorsque 100 géniteurs sont induits à pondre ensemble, la maturation n'est pas forcément synchronisée, et un nombre aussi faible que 3 géniteurs seulement peut

contribuer à une ponte. Ces observations portant sur des populations d'écloserie ont été pour la première fois retrouvée lors d'étude de populations naturelles. Le captage d'individus sur une faible période (une dizaine de jours) conduit à l'échantillonnage d'une population issue d'un nombre très réduit de géniteurs fondateurs, en contradiction avec l'idée reçue que les populations de bivalves marins sont de larges populations panmictiques à effectif efficace important.

Enfin, les microsatellites ont permis une approche très originale de la problématique de la corrélation entre hétérozygotie et croissance. Si ils se sont révélés peut-être trop polymorphes pour permettre une analyse directe en populations naturelles de la corrélation entre hétérozygotie et croissance, les microsatellites se sont révélés des outils relativement puissants pour tester la consanguinité. Notre échantillon, qui présente effectivement une corrélation positive entre hétérozygotie aux locus enzymatiques et croissance, ayant été affranchi de l'hypothèse de consanguinité, on peut dire que la superdominance directe aux locus enzymatiques est l'hypothèse retenue pour la corrélation observée.

PERSPECTIVES

Il existe au laboratoire une réserve potentielle pour d'autres marqueurs sous la forme de couples d'amorces, dont l'utilisation n'a pas encore été mise au point et ils pourront, par exemple, être rajoutés sur la "carte de liaison".

L'utilisation de marqueurs microsatellites présente un intérêt certain pour la gestion de populations d'aquaculture. Ils peuvent aider, dans des programmes de gestion de géniteurs, à la création de plans de croisements complexes. On pourrait également les utiliser pour tester le succès reproducteur, et en particulier essayer de comprendre ce qui se passe lors des expériences de pontes en masse, afin de quantifier *a priori* ce que de nombreuses études sur cette espèce (dont cette thèse) ont découvert *a posteriori*, à savoir que le nombre de géniteurs efficaces avec cette technique de ponte peut se révéler extrêmement faible.

Enfin, ces marqueurs se sont révélés tout a fait appropriés pour des études de génétique des populations, aussi bien pour évaluer la variabilité intra-population qu'inter-population, non pas en remplacement des marqueurs classiques, mais en parallèle, différents types de marqueurs

n'apportant pas le même type d'information. En ce qui concerne la structuration des populations, il est d'ores et déjà prévu d'étudier le même échantillonnage avec des marqueurs mitochondriaux. D'autre part, une étude est en cours pour comparer ces résultats avec la structuration sur la même échelle des populations de *Crassostrea gigas*, espèce récemment introduite d'Asie mais présente auparavant sous la forme de *Crassostrea angulata*. *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas* ont eu des histoires évolutives très différentes et il sera intéressant de savoir ce que la comparaison de la structuration des populations chez ces deux espèces nous révèle sur l'action relative du flux génique par rapport à la sélection naturelle ou sous l'effet de l'action de l'homme.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ADE-4 (Analyse des Données Ecologiques : méthodes Exploratoires et Euclidiennes en Sciences de l'Environnement). Logiciel développé par le laboratoire Biométrie - Génétique et Biologie des Populations, CNRS UMR 5558, Université Claude Bernard, Lyon I. Disponible sur le Web à <http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/ADE-4.html>
- Akagi, H., Yokozeki, Y., Inagaki, A. & Fujimura, T. (1996). Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 1071-1077.
- Akiyama, Y., Nagasaki, H., Nihei, Z., Iwama, T., Nomizu, T., Utsunomiya, J. & Yuasa, Y. (1996). Frequent microsatellite instabilities and analyses of the related genes in familial gastric cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* **87**, 595-601.
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. & Cregan, P.B. (1992). Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* **132**, 1131-1139.
- Akkaya, M.S., Shoemaker, R.C., Specht, J.E., Bhagwat, A.A. & Cregan, P.B. (1995). Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Science* **35**, 1439-1445.
- Alderman, D.J. (1979). Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Marine Fisheries Review* **41**, 67-69.
- Alderman, D.J. (1981). Parasite 'X' - new disease threatens European beds. *Fish Farmer* **4**, 31
- Alexander, L.J., Rohrer, G.A. & Beattie, C.W. (1996). Cloning and characterization of 414 polymorphic porcine microsatellites. *Animal Genetics* **27**, 137-148.
- 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.
- Archibald, A.L., Haley, C.S., Brown, J.F., Couperwhite, S., McQueen, H.A., Nicholson, D., et al., (1995). The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammalian Genome* **6**, 157-175.
- Avise, J. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* **312**, 325-342.
- Bagshaw, J.C. & Buckholt, M.A. (1997). A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene* **184**, 211-214.
- Baker, P. (1995). Review of ecology and fishery of the Olympia oyster, *O. lurida*, with annotated bibliography. *Journal of Shellfish Research* **14**, 501-518.
- Balouet, G., Poder, M. & Cahour, A. (1983). Haemocytic parasitosis: morphology and pathology of lesions in the french oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **34**, 1-14.
- Barendse, W., Armitage, S.M., Kossarek, L.M., Shalom, A., Kirkpatrick, B.W., Ryan, A.M., et al. (1994). A genetic linkage map of the human genome. *Nature Genetics* **6**, 227-235.
- Batargias, C. and Zouros, E. (1993) Development and potential applications of highly polymorphic microsatellites and cDNA markers in gilthead seabream, *Sparus aurata*. Fourth Congress of the European Society for Evolutionary Biology. Montpellier, France, August 22-28.
- Baud, J.P. & Bacher, C. (1990). Use of ground saline water for intensive rearing of *Ruditapes philippinarum* juveniles in a nursery system. *Aquaculture* **88**, 157-178.
- Baud, J.P., Gérard, A. & Naciri-Graven, Y. (1997). Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae* resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. *Marine Biology*, **130**(1), 71-79.
- Beattie, J.H., Purdue, J., Hershberger, W. & Chew, K. (1987). Effect of inbreeding on growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* **6**, 25-28.
- Beaumont, A.R. (1991). Genetic studies of laboratory reared mussels, *Mytilus edulis* : heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biological Journal of the Linnean Society of London* **44**, 273-285.
- Beaumont, A.R., Beveridge, C.M. & Budd, M.D. (1983). Selection and heterozygosity within single families of the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Marine Biology Letters* **4**, 151-161.

- Becher, S.A. & Griffiths, R. (1997). Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in the European hedgehog *Erinaceus europaeus*. *Molecular Ecology* **6**, 89-90.
- Becker, J. & Heun, M. (1995). Barley microsatellites : allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology* **27**, 835-845.
- Beckman, J.S. & Weber, J.L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* **12**, 627-631.
- Begon, M., Krimbas, C.B. & Loukas, M. (1980). The genetics of *Drosophila subobscura* populations. XV. Effective size of a natural population estimated by three independent methods. *Heredity* **45**, 335-350.
- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, and Bonhomme F. (1996) Genetix, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations.
- Bell, C.J. & Ecker, J.R. (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.
- Bensch, S., Price, T. & Kohn, J. (1997). Isolation and characterization of microsatellite loci in a *Phylloscopus* warbler. *Molecular Ecology* **6**, 91-92.
- Bentzen, P., Taggart, C.T., Ruzzante, D.E. & Cook, D. (1996). Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 2706-2721.
- Berry, A. & Kreitman, M. (1993). Molecular analysis of an allozyme cline: alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* on the east coast of North America. *Genetics* **134**, 869-893.
- Bierne, N. (1996). La génétique de la phase larvaire peut-elle expliquer les déficits en hétérozygote chez les bivalves marins? Etude de la segregation de locus microsatellite chez *Ostrea edulis*. Mémoire de DEA Biologie de l'évolution et écologie, Université Montpellier II.
- Bierne, N., Launey, S., Naciri-Graven, Y. & Bonhomme, F. (1997). Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* (in press).
- Bishop, M.D., Kappes, S.M., Keele, J.W., Stone, R.T., Sunden, S.L.F., Hawkins, G.A., Solina Toldo, S., Fries, R., Grossz, M.D., Jakyong, Y. & Beattie, C.W. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* **136**, 619-639.
- Black, W.C. & Krafur, E.S. (1985). A FORTRAN program for the calculation and analysis of two-locus linkage disequilibrium coefficients. *Theoretical and Applied Genetics* **70**, 491-496.
- Blanc, F., Jaziri, H. & Durand, P. (1986). Isolement génétique et taxonomie des huîtres plates dans une lagune du sud de la Méditerranée occidentale. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **303, série III**, 207-210.
- Blanquer-Maumont, A. & Crouau-Roy, B. (1995). Polymorphism, monomorphism and sequences in conserved microsatellites in primate species. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 492-497.
- Bodoy, A. (1993). Les techniques de la conchyliculture en France. In *Coquillages* (P. Elzière-Padovani, ed.), Information Techniques des Services Vétérinaires Français, Paris,
- Boichard, D., Maignel, L. & Verrier, E. (1997). The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genetics, Selection, Evolution* **29**, 5-23.
- Borsa, P., Zainuri, M. & Delay, B. (1991). Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity*, **66**:1-8.
- Borsa, P., Jarne, P., Belkhir, K. & Bonhomme, F. (1994). Genetic structure of the palourde *Ruditapes decussatus* L. in the Mediterranean. In *Genetics and evolution of aquatic organisms* (A. Beaumont, ed.), Chapman & Hall, London.
- Borsa, P., Julia, S., & Bonhomme, F. (1997). Discontinuité océanographique (front Almeria-Oran) et structure génétique des populations marines. XIX^{ème} Colloque du Groupe Biologie et Génétique des Populations, Perpignan (France), 2-5 Septembre.
- Bougrier, S., Tigé, G., Bachère, E. & Grizel, H. (1986). *Ostrea angasi* acclimatation to French coasts. *Aquaculture* **58**, 151-154.

- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R. & Meredith, C.P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* **39**, 628-633.
- Breen, M., Lindgren, G., Binns, M.M., Norman, J., Irvin, Z., Bell, K., Sandberg, K. & Ellegren, H. (1997). Genetical and physical assignment of equine microsatellite - first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome* **8**, 267-273.
- Britten, R.J. & Koehn, D. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science* **161**, 529-540.
- Brook, J.D., McCurrach, M., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P. & Hudson, T. (1992). Molecular basis of Myotonic Dystrophy : expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **68**, 799-808.
- Brookfield, J.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* **5**, 453-455.
- Brown, A.D.H. (1970). The estimation of Wright's fixation index from genotypic frequencies. *Genetica* **41**, 399-406.
- Brown, S.M., Hopkins, M.S., Mitchell, S.E., Senior, M.L., Wang, T., Duncan, R.R., Gonzalez-Candelas, F. & Kresovich, S. (1996). Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats -SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 190-198.
- Buchanan, F.C., Littlejohn, R.P., Galloway, S.M. & Crawford, A.M. (1993). Microsatellites and associated repetitive elements in the sheep genome. *Mammalian Genome* **4**, 258-264.
- Buroker, N.E. (1982). Allozyme variation in three non-sibling *Ostrea* species. *Journal of Shellfish Research* **2**, 157-163.
- Buroker, N.E. (1983). Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. *Marine Biology* **75**, 99-112.
- Buroker, N.E., Hershberger, W.K. & Chew, K.K. (1979). Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology* **54**, 157-169.
- Buroker, N.E., Chanley, P., Cranfield, H.J. & Dinamani, P. (1983). Systematic status of two oyster populations of the genus *Tiostrea* from New Zealand and Chile. *Marine Biology* **77**, 191-200.
- Bush, R.M., Smouse, P.E. & Ledig, F.T. (1987). The fitness consequence of multiple locus heterozygosity : the relationship between heterozygosity and growth rate in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Evolution* **41**, 787-798.
- Byrne, M., Marquez-Garcia, M.I., Uren, T., Smith, D.S. & Moran, G.F. (1996). Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany* **44**, 331-341.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C. & Sutherland, G.R. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* **52**, 922-927.
- Cantatore, P., Roberti, M., Morisco, P., Rainaldi, G., Gadaleta, M. & Saccone, C. (1987). A novel gene order in the *Paracentrotus lividus* mitochondrial genome. *Gene* **53**, 41-54.
- Chakraborty, R. & Zhong, Y. (1994). Statistical power of an exact test of Hardy-Weinberg proportions of genotypic data at a multiallelic locus. *Human Heredity* **44**, 1-9.
- Chakraborty, R., De Andrade, M., Daiger, S.P. & Budowle, B. (1992). Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics* **56**, 45-57.
- Chanley, P. & Dinamani, P. (1980). Comparative descriptions of some oyster larvae from New Zealand and Chile, and a description of a new genus of oyster, *Tiostrea*. *New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research* **14**, 103-120.

- Chapuisat, M., Goudet, J. & Keller, L. (1997). Microsatellites reveal high population viscosity and limited dispersal in the ant *Formica paralugubris*. *Evolution* 51, 475-482.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 237-268.
- Chenuil, A., Desmarais, E., Pouyaud, L. & Berrebi, P. (1997). Does polyploidy lead to fewer and shorter microsatellites in *Barbus* (Teleostei: Cyprinidae)? *Molecular Ecology* 6, 169-178.
- Chevenet, F., Dolédec, S. & Chessel, D. (1994). A fuzzy coding approach for the analysis of long-term ecological data. *Freshwater Biology* 31, 295-309.
- Cheverud, J.M. & Routman, E.J. (1996). Epistasis as a source of increased additive genetic variance at population bottlenecks. *Evolution*, 50(3), 1042-4051.
- Cochennec N.(1997) La bonamiose: caractérisation du parasite *Bonamia ostreae* et étude de ses interactions avec l'hôte, l'huître plate *Ostrea edulis*. Mémoire de Thèse. Ecole Pratique des Hautes Etudes.
- Cockerham, C.C. (1969). Variance of gene frequencies. *Evolution* 23, 72-84.
- Colbourne, J.K., Neff, B.D., Wright, J.M. & Gross, M.R. (1996). DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 342-349.
- Comps, C. & Cochennec, N. (1993). A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *Linnean Journal of Invertebrate Pathology* 62,
- Comps, M. (1983). Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des Mollusques bivalves marins. Thèse d'Etat en Sciences Naturelles. Université de Montpellier.
- Comps, M., Tigé, G. & Grizel, H. (1980). Etude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître plate *Ostrea edulis*. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 290(D), 383-384.
- Condit, R. & Hubbell, S.P. (1991). Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34, 66-71.
- Cooper, S.J.B., Bull, C.M. & Gardner, M.G. (1997). Characterization of microsatellite loci from the socially monogamous lizard *Tiliqua rugosa* using a PCR-based isolation technique. *Molecular Ecology* 6, 793-795.
- Coote, T. & Bruford, M.W. (1996). Human microsatellites applicable for analysis of genetic variation in apes and old world monkeys. *The Journal of Heredity* 87, 406-410.
- Crawford, A., Dodds, G.G., Pierson, C.A. et al. (1995). An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140, 703-724.
- Crooijmans, R.P.M.A., van Kampen, A.J.A., van der Poel, J.J. & Groenen, M.A.M. (1994). New microsatellite markers on the linkage map of the chicken genome. *The Journal of Heredity* 85, 410-413.
- Crouau-Roy, B., Service, S., Slatkin, M. & Freimer, N.B. (1996). A fine-scale comparison of the human and chimpanzee genomes : linkage, linkage disequilibrium and sequences analysis. *Human Molecular Genetics* 5, 1131-1137.
- Crow, J.F. & Kimura, M. (1970). *An introduction to population genetics theory*. Harper and Row Publishers New York, Evanston and London,
- Culloty, S. & Mulcahy, M.F. (1996). Season-, age- and sex-related variation in the prevalence of bonamiosis in the flat oyster (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture* 144, 53-63.
- Dallas, J. (1992). Estimation of microsatellite mutation rate in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome* 2, 452-456.
- Darvasi, A. & Soller, M. (1994). Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 351-357.
- David, P., Berthou, P., Noel, P. & Jarne, P. (1997). Spatially structured recruitment and population dynamics in a marine bivalve : *Spisula ovalis*. *Oecologia* (in press).

- 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.
- DeWoody, J.A., Honeycutt, R.L. & Skow, L.C. (1995). Microsatellite markers in white-tailed deer. *Journal of Heredity* **86**, 317-319.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M. & Freimer, N.B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **91**, 3166-3170.
- Dib, C., Fauré, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. & Weissenbach, J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* **380**, 152-154.
- Diehl, W.J. & Koehn, R.K. (1985). Multiple-locus heterozygosity, mortality and growth in a cohort of *Mytilus edulis*. *Marine Biology* **88**, 265-271.
- Dietrich, W.F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M.A., Damton-Boles, D., Husain, *et al.* (1996). A comprehensive genetic map for the mouse genome. *Nature* **380**, 149-152.
- Dietrich, W.H., Katz, H., Lincoln, S.E., Shin, H.S., Friedman, J., Dracopoll, N.C. & Lander, E.S. (1997). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* **131**, 423-447.
- Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T. & Chakraborty, R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**, 241-253.
- Ellegren, H. (1995). Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mammalian Genome*, **6**, 376-377.
- Ellegren, H., Chowdary, B.P., Johansson, M. *et al.* (1994). A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of recombination. *Genetics* **137**, 1089-1100.
- Elston, R.A., Farley, C.A. & Kent, M.L. (1986). Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Disease of Aquatic Organisms* **2**, 49-54.
- Elston, R.A., Kent, M.L. & Wilkinson, M.T. (1987). Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* **64**, 237-242.
- Engel, S.R., Linn, R.A., Taylor, J.F. & Davis, S.K. (1996). Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. *Journal of Mammalogy* **77**, 504-518.
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D. & Guyomard, R. (1993a). (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* **71**, 488-496.
- Estoup, A., Solignac, M., Harry, M. & Cornuet, J.-M. (1993b). Characterization of (GT)_n and (GC)_n microsatellite in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research* **21**, 1427-1431.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M. & Cornuet, J.M. (1995a). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* **140**, 679-695.
- Estoup, A., Tailliez, C., Cornuet, J.M. & Solignac, M. (1995b). Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* **13**, 1074-1084.
- Estoup, A., Largiader, C.D., Perrot, E. & Chourrout, D. (1996). Rapid one-tube extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **295-298**.
- Fairbrother, J.F. & Beaumont, A.R. (1993). Heterozygote deficiencies in a cohort of newly settled *Mytilus edulis* spat. *Journal of the Marine Biology Association of the U. K.* **73**, 647-653.
- Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, J.R.G. & Foster, W.S. (1972). Oyster herpes-type virus. *Science* **178**, 759-760.

- Farrar, N., Kiyosawa, H., Hughes, J., Welker, D. & Williams, K. (1994). Nucleotide sequence of Ddp1, a high copy number nuclear plasmid of *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **31**, 184-195.
- Favre, L. & Balloux, F. (1997). Characterization of microsatellite loci in the greater white-toothed shrew *Crocidura russula*. *Molecular Ecology* **6**, 595-596.
- Fevolden, S.E. & Pogson, G. (1997). Genetic divergence at the synaptophysin (Syp 1) locus among Norwegian coastal and north-east Arctic populations of Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* **51**, 895-908.
- Field, D. & Wills, C. (1996). Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London B* **263**, 209-215.
- Fields, R.L. & Scribner, K.T. (1997). Isolation and characterization of novel waterfowl microsatellite loci: cross-species comparisons and research applications. *Molecular Ecology* **6**, 199-202.
- Figueras, A.J. (1991). *Bonamia* status and its effect in cultured flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (N.W.Spain). *Aquaculture* **93**, 225-233.
- FitzSimmons, N.N., Moritz, C. & Moore, S.S. (1995). Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 millions years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 432-440.
- Foltz, D.W. (1986a). Segregation and linkage studies of allozyme loci in pair crosses of the oyster *Crassostrea virginica*. *Biochemical Genetics* **24**, 941-956.
- Foltz, D.W. (1986b). Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution* **40**, 869-870.
- Forbes, S.H., Hogg, J.T., Buchanan, F.C., Crawford, A.M. & Allendorf, F.W. (1995). Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 1106-1113.
- Ford, S. & Haskin, H.S. (1987). Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Journal of Parasitology* **73**, 368-376.
- Fredholm, M. & Winterø, A.M. (1995). Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the *Canidae* family. *Mammalian Genome* **6**, 11-18.
- Friedman, C.S. & Perkins, F.O. (1994). Range of extension of *Bonamia ostreae* to Maine, USA. *Journal of Invertebrate Pathology* **64**, 179-181.
- Friedman, C.S., McDowell, T., Groff, J.M., Hollibaugh, J.T., Manzer, D. & Hedrick, R.P. (1989). Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linné, in California, USA. *Journal of Shellfish Research* **8**, 133-137.
- Fries, R., Eggen, A. & Stranzinger, G. (1990). The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics* **8**,
- Fu, Y.H., Kuhl, D.P.A., Pizzuti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A., Holden, J., Fenwick, R. & Warren, S.T. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman Paradox. *Cell* **67**, 1047-1058.
- Fu, Y., Pizzuti, R., Fenwick, R.G. *et al.* (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**, 1256-1258.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J., O'Brien, P.J. & MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* **253**, 448-451.
- Gaffney, P.M. & Scott, T.M. (1984). Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery populations of bivalves. *Aquaculture* **42**, 289-302.
- Gaffney, P.M., Scott, T.M., Koehn, R.K. & Diehl, W.J. (1990). Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* **124**, 687-699.

- Gaffney, P.M., Davis, C.V. & Hawes, R.O. (1992). Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture* **105**, 1-20.
- Garcia, D.K., Dhar, A.K. & Alcivar-Warren, A. (1996). Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **5**, 71-83.
- García de León, F.J., Dallas, J.D., Chatain, B., Cannone, M., Versini, J.J. & Bonhomme, F. (1995). Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serranidae). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **4**, 62-68.
- García de León, F.J., Chikhi, L. & Bonhomme, F. (1997). Microsatellite polymorphisms and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Molecular Ecology* **6**, 51-62.
- Garton, D.W. & Haag, W.R. (1991). Heterozygosity, shell length and metabolism in the European mussel, *Dreissena polymorpha*, from a recently established population in Lake Erie. *Comparative Biochemistry and Physiology* **99A**, 45-48.
- Garza, J.C. & Freimer, N.B. (1996). Homoplasy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Research* **6**, 211-217.
- Gellin, J. & Chevalet, C. (1994). Stratégie d'établissement des cartes géniques. Exemple du porc. *Genetics, Selection, Evolution* **26**, Suppl 1, 35s-51s.
- Gentili, M.R. & Beaumont, A.R. (1988). Environmental stress, heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **120**, 145-153.
- Gile, S.R. & Ferguson, M.M. (1990). Crossing methodology and genotypic diversity in a hatchery strain of rainbow trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**, 719-724.
- Glenn, T.C., Stephan, W., Dessauer, H.C. & Braun, M.J. (1996). Allelic diversity in alligator microsatellite loci is negatively correlated with GC content of flanking sequences and evolutionary conservation of PCR amplifiability. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 1151-1154.
- Goodnight, C.J. (1987). On the effect of founder events on epistatic genetic variance. *Evolution*, **41**(1), 80-91.
- Goodnight, C.J. (1988). Epistasis and the effect of founder events on the additive genetic variation. *Evolution*, **42**, 441-454.
- Goudet, J. (1995). FSTAT v-1.2: a computer program to calculate Weir and Cockerham estimators of F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**(6), 485-486.
- Gouletquer P and Héral M.(1997) Marine molluscan production trends in France : from fisheries to aquaculture. U.S. Dep Commer., NMFS 129, p 137-164.
- Grassé, P. (1960). *Traité de Zoologie. Mollusques Lamellibranches*. Masson et Cie, Paris.
- Green, R.H., Singh, S.M., Hicks, B. & McCaig, J. (1983). An intertidal population of *Macoma balthica* (Mollusca, Pelecypoda) : genotypic and phenotypic components of population structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **40**, 1360-1371.
- Grizel H.(1985) Etude des récentes épizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* Linné, et de leur impact sur l'ostréiculture bretonne. Thèse d'Etat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II.
- Grizel, H. (1987). Recherches sur les maladies des mollusques d'élevage. *Cuadernos da Area de Ciencias Marinas, Seminario des Estudos Galegos* **2**, 45-53.
- Grizel H and Tigé G. (1982) Evolution of the haemocytic disease caused by *Bonamia ostreae*. 3rd International Colloquium on Invertebrate pathology. Anonymous Brighton.
- Grizel, H. & Héral, M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Journal du Conseil National pour l'Exploration de la Mer* **47**, 399-403.

- Grizel, H., Comps, M., Bonami, J.R., Cousserans, F., Duthoit, J.L. & Le Pennec, M.A. (1974). Recherche de l'agent de la maladie de la glade digestive de *Ostrea edulis*, Linné. *Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes* **240**, 7-30.
- Grizel, H., Comps, M., Raguénès, D., Leborgne, Y., Tigé, G. & Martin, A.G. (1983). Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **46**, 290-225.
- Grizel, H., Mialhe, E., Chagot, D., Boulo, V. & Bachère, E. (1988). Bonamiosis: a model study of diseases in marine molluscs. *American Fisheries Society Special Publication* **18**, 1-4.
- Gruet, Y. & Prigent, D. (1986). Les buttes de Saint Michel en l'Herm (Vendée) : caractères de la population d'huîtres *Ostrea edulis* L. et sa faune associée. *Haliotis* **15**, 3-16.
- Guérin, G., Ollivier, L. & Sellier, P. (1983). Etude du groupe de liaison Hal, Phi et Pgd chez le porc : disposition relative des 3 locus et estimation des taux de recombinaison. *Génétique, Sélection et Evolution* **15**, 55-64.
- Guinand, B. (1996). Use of a multivariate model using allele frequency distributions to analyse patterns of genetic differentiation among populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 173-195.
- Guo, S.W. & Thompson, E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy Weinberg for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Haldane, J.B.S. (1919). The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* **8**, 299-309.
- Hamada, H. & Kakunaga, T. (1982). Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* **298**, 396-398.
- Hamada, H., Petrino, M.G. & Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **79**, 6465-6469.
- Hanotte, O., Zanon, C., Pugh, A., Greig, C., Dixon, A. & Burke, T. (1994). Isolation and characterisation of microsatellite loci in a passerine bird: the red bunting *Emberiza schoeniclus*. *Molecular Ecology* **3**, 529-530.
- Hardy, G.H. (1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Science* **28**, 49-50.
- Hare, M.P. & Avise, J.C. (1996). Molecular genetic analysis of a stepped multilocus cline in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Evolution* **50**, 2305-2315.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. (1989). *Principle of population genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass.
- Haskin, H.H. & Ford, S.A. (1979). Development of resistance to *Minchinia nelsoni* (MSX) mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. *Marine Fisheries Review* **41**, 54-63.
- Hearne, C.M., Ghosh, S. & Todd, J.A. (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics* **8**, 288-294.
- Hedgecock, D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (A.R. Beaumont, ed.), Chapman & Hall, London.
- Hedgecock, D. & Okazaki, N.B. (1984). Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia* **25**, 535-549.
- Hedgecock, D. & Sly, F. (1990). Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **88**, 21-38.
- Hedgecock, D., Chow, W. & Waples, R.S. (1992). Effective population numbers of shellfish broodstocks estimated from temporal variance in allelic frequencies. *Aquaculture* **108**, 215-232.
- Hedrick, P. & Cockerham, C.C. (1986). Partial inbreeding: equilibrium heterozygosity and the heterozygosity paradox. *Evolution*, **40**(4), 856-861.

- Hervio, D. (1992) Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (Acetospora), protozoaire parasite de l'huître *Ostrea edulis* (Bivalvia), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont Ferrand.
- Hervio, D., Bachère, E., Boulo, V., Cochenec, N., Vuillemin, V., Le Goguic, Y., Cailletaux, G., Mazurié, J. & Mialhe, E. (1995). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae* : application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture* **132**, 183-194.
- Héral, M. (1986). L'ostréiculture française traditionnelle. In *Aquaculture* (G. Barnabé, ed.), Techniques et Documentation (Lavoisier), Paris,
- Hilbish, T.J. & Koehn, R.K. (1985). Dominance in physiological phenotypes and fitness at an enzyme locus. *Science* **229**, 52-54.
- Hine, P.M., Wesley, B. & Hay, B.E. (1992). Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Disease of Aquatic Organisms* **12**, 135-142.
- Hinegardener, R. (1974). Cellular DNA content of Mollusca. *Comparative Biochemistry and Physiology* **47A**, 447-460.
- Hirano, T., Nakane, S., Mizoshita, K., Yamakuchi, H., Inoue-Murayama, M., Watanabe, T., Barendse, W. & Sugimoto, Y. (1996). Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. *Animal Genetics* **27**, 365-368.
- Houlden, B.A., England, P. & Sherwin, W.B. (1996). Paternity exclusion in koalas using hypervariable microsatellites. *Journal of Heredity* **87**, 149-152.
- Hudson, R.R., Boos, D.D. & Kaplan, N.L. (1992). A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 138-151.
- Hughes, C.R. & Queller, D.C. (1993). Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology* **2**, 131-137.
- Hvilsom, M.M. & Theisen, B.F. (1984). Inheritance of allozyme variations through crossing experiments with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Hereditas* **101**, 1
- Ibarra, A.M., Cruz, P. & Romero, B.A. (1995). Effect of inbreeding on growth and survival of self fertilized catarina scallop larvae, *Argopecten circularis*. *Aquaculture* **134**, 37-47.
- Jacobs, J.J., Brown, D.M., Bunker, R.K., Daly, M.J., Dzau, V.J., Goodman, A. *et al.* (1995). A genetic linkage map for the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nature Genetics* **9**, 63-69.
- James, J.W. (1972). Computation of genetic contributions from pedigrees. *Theoretical and Applied Genetics* **42**, 272-273.
- Jarne, P., Viard, F., Delay, B. & Cuny, G. (1993). Variable microsatellites in the highly selfing snail *Bulinus truncatus* (Basommatophora: Planorbidae). *Molecular Ecology* **2**, 527-528.
- Jarret, R.L., Merrick, L.C., Holms, T., Evans, J. & Aradhya, M.K. (1997). Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). *Genome* **40**, 433-441.
- Jaziri, H. (1985) Biogéographie et polymorphisme enzymatique chez l'huître plate *Ostrea edulis* L. 1758. Mémoire de DEA, USTL.
- Jaziri, H. (1990) Variations génétiques et structuration biogéographique chez un bivalve marin : l'huître plate *Ostrea edulis* (L.). Thèse de Doctorat. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc.
- Jaziri H, Durand P, and Blanc F. (1987) Genetic diversity between and within population of the European oyster, *Ostrea edulis*. World Symposium on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May, 1986. Berlin. pp.177-187.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. & Thein, S.L. (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* **314**, 67-73.
- Johannesson, K., Rodstrom, E.M. & Aase, H. (1989). Low genetic variation in Scandinavian populations of *Ostrea edulis* L. - possible causes and implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **128**, 177-190.

- Jones, A.G. & Avise, J.C. (1997). Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Molecular Ecology* **6**, 203-213.
- Karl, S.A. & Avise, J.C. (1992). Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science* **256**, 100-102.
- Karl, S.A. & Avise, J.C. (1993). PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. *Molecular Biology and Evolution* **10**, 342-361.
- Katksky, S.C., Dahlstrom, W.A. & Warner, R.W. (1969). Observation on survival and growth of the European flat oyster *Ostrea edulis* in California. *California Fish and Game* **55**, 69-74.
- Kawchuk, I.M., Lynch, D.R., Thomas, J., Penner, B., Sillito, D. & Kulcsar, F. (1996). Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *American Potato Journal* **73**, 325-335.
- Kimura, M. (1953). "Stepping-stone" model of population. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet. Japan* **3**, 62-63.
- Kimura, M. (1990). *Théorie neutraliste de l'évolution*. Nouvelle Bibliothèque Scientifique, Flammarion, Cambridge University Press
- Kimura, M. & Crow, J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725-738.
- King, D. (1994). Triple repeat DNA as highly mutable regulatory mechanism. *Science* **263**, 595-596.
- Koehn, R.K., Diehl, W.J. & Scott, T.M. (1988). The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clan, *Mulinia lateralis*. *Genetics* **118**, 121-130.
- Koehn, R.K. & Gaffney, P.M. (1984). Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Marine Biology* **82**, 1-7.
- Koehn, R.K., Milkman, R. & Mitton, J.B. (1976). Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution* **30**, 2-32.
- Kondo, Y., Mori, M., Kuramoto, T., Yamada, J., Beckmann, J.S., Simon-Chazottes, D. et al. (1993). DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. *Mammalian Genome* **4**, 571-576.
- Koorey, D.J., Bishop, G.A. & McCaughan, W. (1993). Allele non-amplification : a source of confusion in linkage studies employing microsatellite polymorphisms. *Human Molecular Genetics* **2**, 289-291.
- Kosambi, D.D. (1944). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenism* **12**, 172-175.
- Kostia, S., Varvio, S.L., Vakkari, P. & Pulkkinen, P. (1995). Microsatellite sequences in a conifer, *Pinus sylvestris*. *Genome* **38**, 1244-1248.
- Krimbas, C.B. & Taskas, S. (1971). The genetics of *Dacus oleae*. V. Changes of esterase polymorphism in a natural population following insecticide control - selection or drift? *Evolution* **25**, 454-460.
- Kühn, R., Anastasiadis, C. & Pirchner, F. (1996). Transfer of bovine microsatellites to the cervine (*Cervus elaphus*). *Animal Genetics* **27**, 199-201.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H. & Andersson, L. (1993). The abundance of various polymorphic motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* **21**, 1111-1115.
- Lamarck, J.B.P. (1801). *Système des animaux sans vertèbres*. Crapelet Paris, pp. 1-432.
- Lande, R. (1980). Genetic variation and phenotypic evolution during allopatric speciation. *American Naturalist* **116**, 463-479.

- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. & Newburg, L. (1987). MAPMAKER : an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-181.
- Lannan, J.E. (1980). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. I. Genetic variation in survival in the larval rearing system. *Aquaculture* **21**, 323-336.
- Le Pennec, M., Moraga, D., Blanc, F., Pichot, P. & Thiriou-Quievreux, C. (1985). Recherches de différences morphogénétiques, biochimiques et cytogénétiques entre *Ostrea edulis* sensu stricto et *Ostrea edulis* "pied de cheval". *Vie Marine* **7**, 29-39.
- Leberg, P. (1992). Effects of populations bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* **46**, 477-494.
- Leborgne, Y. & Le Pennec, M. (1983). Elevage expérimental de l'huître asiatique *Ostrea densalamellosa* (Lischke). *Vie Marine* **5**, 23-28.
- Ledig, F.T., Guries, R.P. & Bonefield, B.A. (1983). The relation of growth to heterozygosity in pitch pine. *Evolution* **37**, 1127-1138.
- Lee, W.J. & Kocher, T.D. (1996). Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* **49**, 169-171.
- Lehmann, T., Besansky, N.J., Hawley, W.A., Fahey, T.G., Kamau, L. & Collins, F.H. (1997). Microgeographic structure of *Anopheles gambiae* in western Kenya based on mtDNA and microsatellite loci. *Molecular Ecology* **6**, 243-253.
- Levinson, G. & Gutman, G.A. (1987). Slipped-strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 203-221.
- Lewontin, (1965). Selection for colonizing ability. In *The genetics of colonizing species* (H. Baker, ed.), Academic Press, New York,
- Linné, C. (1758). *Systema naturae, Editio Decima Reformato*. pp. 696-700.
- Litt, M. & Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* **44**, 397-401.
- Liu, Z., Crooijmans, R.P.M.A., van der Poel, J.J. & Groenen, M.A.M. (1996). Use of chicken microsatellite markers in turkey : a pessimistic view. *Animal Genetics* **27**, 191-193.
- Liu, Z.W., Biyashev, R.M. & Saghai Maroof, M.A. (1996). Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 869-876.
- Logie, R.R., Drinnan, R.E. & Henderson, E.B. (1961). Rehabilitation of disease-depleted oyster populations in eastern Canada. *Proceedings of the Gulf Caribbean Fisheries Institute* **13**, 103-113.
- Love, J.M., Knight, A.M., McAleer, M.A. & Todd, J.A. (1990). Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic Acids Research* **18**, 4123-4130.
- Lumdsen, J.M., Lord, E.A. & Montgomery, G.W. (1996). Characterization and linkage mapping of ten sheep microsatellite markers derived from a sheep x hamster cell hybrid. *Animal Genetics* **27**, 203-206.
- Lynch, M. (1988). Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution* **5**, 584-599.
- Ma, Z.Q., Röder, M. & Sorrells, M.E. (1996). Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* **39**, 123-130.
- Macaranas, J.M., Ablan, C.A., Pante, M.J.R., Benzie, J.A.H. & Williams, S.T. (1992). Genetic structure of the giant clam (*Tridacna derasa*) populations from reefs in the Indo-Pacific. *Marine Biology* **113**, 231-238.
- Magennis, B.A., Gosling, E. & Wilkins, N.P. (1983). Irish oyster populations : a historical and genetic study. *Proceedings of the Royal Irish Academy* **83B**, 291-299.

- Mallet, A.L., Zouros, E., Gartner-Kepkay, K.E. & Freeman, K.R. (1986). Genetics of growth in the blue mussels: family and growth-heterozygosity effects. *Marine Biology* **92**, 475-482.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.
- Marteil, L. (1976). La conchyliculture française. deuxième partie : biologie de l'huître et de la moule. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **207-312**.
- Martin, A.G., Gérard, A., Cochennec, N. & Langlade A. (1993). Selecting flat oyster, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae* : assessment of the resistance of a first selected generation. In *Production, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture '92* (Spécial Publication of the European Aquaculture Society, Ghent Belgium, n°18, pp 547-554).
- Martinell, J. & Marquina, M.J. (1981). Malacofauna pliocenica de St Vicenç dels horts (baix Llobregat, Barcelona). *Iberus* **1**, 9-22.
- Mathieu, E., Autem, M., Roux, M. & Bonhomme, F. (1990). Epreuves de validation dans l'analyse de structures génétiques multivariées : comment tester l'équilibre panmictique? *Revue de Statistique Appliquée* **38**, 47-66.
- McArdle, J.F., McKiernan, F., Foley, H. & Jones, D.H. (1991). The current status of *Bonamia* disease in Ireland. *Aquaculture* **93**, 273-278.
- McConnell, S.K., O'Reilly, P., Hamilton, L., Wright, J.M. & Bentzen, P. (1995). Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): American and European populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**, 1863-1872.
- McDonald, J.H., Verrelli, B.C. & Geyer, L.B. (1996). Lack of geographic variation in anonymous nuclear polymorphisms in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Molecular Biology and Evolution* **13**, 1114-1118.
- McGoldrick DJ. (1997) An experimental investigation of the genetic basis of heterosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thurnberg). Ph.D. Dissertation, Genetics. University of California, Davis.
- McGoldrick, D.J. & Hedgecock, D. (1996a). Microsatellite development in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thurnberg). *Journal of Shellfish Research* **15**, 512
- McGoldrick, D.J. & Hedgecock, D. (1996b). Fixation, segregation and linkage of allozyme loci in inbred families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thurnberg) : implications for the cause of inbreeding depression. *Genetics* **146**, 321-334.
- Menotti-Raymond, M.A. & O'Brien, S.J. (1995). Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. *Journal of Heredity* **86**, 319-322.
- Meuriot, E & Grizel, H. (1985). Note sur l'impact économique des maladies de l'huître en Bretagne. Rapport Technique ISTPM.
- Mialhe, E., Bachère, E., Chagot, D. & Grizel, H. (1988). Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae*, a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). Application to parasite resistant oyster selection. *Aquaculture* **71**, 83-87.
- Miller, L.M. & Kapuscinski, A.R. (1996). Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in northern pike. *Transactions of the American Fisheries Society* **125**, 971-977.
- Mitton, J.B. & Grant, M.C. (1984). Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**, 479-499.
- Moore, S.S., Sargeant, L.L., King, T.J., Mattick, J.S., Georges, M. & Hetzel, D.J.S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* **10**, 654-660.
- Moran, C. (1993). Microsatellite repeats in pig (*Sus scrofa*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *Journal of Heredity* **84**, 274-280.

- Mörchen, M., Cuguen, J., Michaelis, G., Häani, C. & Saumitou-Laprade, P. (1996). Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics* **92**, 326-333.
- Morgante, M. & Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* **3**, 175-182.
- Morgante, M., Rafalski, A., Biddle, P. & Tingey, S. (1994). Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat. *Genome* **37**, 763-769.
- Morris, D.B., Richard, K.R. & Wright, J.M. (1996). Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 120-126.
- Morton, N.E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics* **7**, 277-318.
- Moxon, E., Rainey, P., Nowak, M. & Lenski, R. (1994). Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology* **4**, 24-33.
- Naciri, Y., Vigouroux, Y., Dallas, J., Desmarais, E., Delsert, C. & Bonhomme, F. (1995). Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **4**, 83-89.
- Naciri-Graven, Y., Martin, A.G., Baud, J.P., Renault, T. & Gérard, A. (1997). Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (in press).
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E. & White, R. (1987). Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* **235**, 1616-1622.
- Nassif, N.T. & Mackinlay, A.G. (1996). Detection and characterization of two novel hypervariable microsatellite repeat regions within intron 2 of the α -globin gene of the bivalve mollusc *Anadara trapezia*. *Gene* **183**, 225-230.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **70**, 3321-3323.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Nei, M. & Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **76**, 5269-5273.
- Nei, M. & Tajima, F. (1981). Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics* **98**, 625-640.
- Nei, M., Maruyama, T. & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- Newkirk, G.F. (1986). Controlled mating of the European oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **57**, 111-116.
- Newkirk, G.F. & Haley, L.E. (1982). Progress in selection of growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Ecology - Progress Series* **10**, 77-79.
- Newkirk, G.F. & Haley, L.E. (1983). Selection for growth rate in the European oyster, *Ostrea edulis*: response of second generation groups. *Aquaculture* **33**, 149-155.
- Nicolas, J.L., Comps, M. & Cochenec, N. (1992). Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **12**, 11-13.
- Nielsen, J.L., Gan, C.A., Wright, J.M., Morris, D.B. & Thomas, W.K. (1994). Biogeographic distributions of mitochondrial and nuclear markers for southern steelhead. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**, 281-293.
- O'Reilly, P.T., Hamilton, L.C., McConnell, S.K. & Wright, J.M. (1996). Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and

- tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 2292-2298.
- Ohta, T. & Kimura, M. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research* **22**, 201-204.
- Ostrander, E.A., Mapa, F.A., Yee, M. & Rine, J. (1995). One hundred and one new simple sequence repeat-based markers for the canine genome. *Mammalian Genome* **6**, 192-195.
- Otsen, M., Den Bieman, M., Winer, E.S., Jacob, H.J., Szpirer, J., Szpirer, C., Bender, C. & Van Zutphen, L.F.M. (1995). Use of simple sequence length polymorphisms for genetic characterization of rat inbred strains. *Mammalian Genome* **6**, 595-601.
- Ovenden, J.R. (1990). Mitochondrial DNA and marine stock assessment : a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* **41**, 835-853.
- Paetkau, D. & Strobeck, C. (1994). Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* **3**, 489-495.
- Paetkau, D. & Strobeck, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology* **4**, 519-520.
- Panaud, O., Chen, X. & McCouch, S.R. (1995). Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* **38**, 1170-1176.
- Panaud, O., Chen, X. & McCouch, S.R. (1996). Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* **252**, 597-607.
- Pardue, M.L., Lowenhaupt, K., Rich, A. & Nordheim, A. (1987). (dC-dA)_n-(dG-dT)_n sequences have evolutionary conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. *The EMBO Journal* **6**, 1781-1789.
- Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J. & Britton-Davidian, J. (1989). *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Coll. Tech & Doc, Ed. Lavoisier Paris,
- Pemberton, J.M., Slate, J., Bancroft, D.R. & Barrett, J.A. (1995). Non-amplifying alleles at microsatellite loci : a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology* **4**, 249-252.
- Perraudin, C. (1983). La maladie hémocytaire de l'huître plate à *Bonamia ostreae*. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- Pépin, L., Amigues, Y., Lépingle, A., Berthier, J.L., Bensaid, A. & Vaiman, D. (1995). Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Example of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* **74**, 53-61.
- Pérez-Lezaun, A., Calafell, F., Mateu, E., Comas, D., Ruiz-Pacheco, R. & Bertranpetit, J. (1997). Microsatellite variation and the differentiation of modern humans. *Human Genetics* **99**, 1-7.
- Pfeiffer, A., Olivieri, A.M. & Morgante, M. (1997). Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* **40**, 411-419.
- Pichot, Y., Comps, M., Tigé, G., Grizel, H. & Rabouin, M.A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis*. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **43**, 131-140.
- Piertney, S.B. & Dallas, J.F. (1997). Isolation and characterization of hypervariable microsatellites in the red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Molecular Ecology* **6**, 93-95.
- Pogson, G.H. (1991). Expression of overdominance for specific activity at the phosphoglucosyltransferase-2 locus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Genetics* **129**, 134-141.
- Pogson, G.H., Mesa, K.A. & Boutilier, R.G. (1995). Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus morhua* : a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics* **139**, 375-385.
- Pogson, G.H. & Zouros, E. (1994). Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus* : a test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics* **137**, 221-231.

- Polanco, E., Montes, J., Outon, M.J. & Meledez, M.I. (1984). Situation pathologique du stock d'huîtres plates en Galice (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. *Haliotis* **14**, 91-95.
- Pollack, E. (1983). A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. *Genetics* **104**, 531-548.
- Presa, P. & Guyomard, R. (1996). Conservation of microsatellite in three species of salmonids. *Journal of Fish Biology* **49**, 1326-1329.
- Presa, P., Krieg, F., Estoup, A. & Guyomard, R. (1994). Diversité et gestion génétique de la truite commune : apport de l'étude du polymorphisme des locus protéiques et microsatellites. *Genetics, Selection, Evolution* **26(Suppl.1)**, 183s-202s.
- Pritchard, A., Laping, J., Seilhamer, J. & Cummings, D. (1983). Inter-species sequence diversity in the replication initiation region of *Paramecium* mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology* **64**, 1-15.
- Ranson, G. (1948). Ecologie et répartition géographique des Ostréidés vivants. *Revue de Science* **86**, 469-473.
- Ranson, G. (1967). Les espèces d'huîtres vivant actuellement dans le monde définies par les coquilles larvaires ou prodissoconques. Etude de quelques uns des grands musées d'Histoire Naturelle. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **31**, 127-199.
- Rassman, K., Schlötterer, C. & Tautz, D. (1991). Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* **12**, 113-118.
- Reeb, C.A. & Avise, J.C. (1990). A genetic discontinuity in a continuously distributed species : mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* **124**, 397-406.
- Renault, T. (1996). Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Revue scientifique et technique de l'Office international des Epizooties* **15**, 551-561.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.-M. & Chollet, B. (1994a). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **14**,
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Cochenec, N. & Maffart, P. (1994b). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France - Comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire* **145**, 735-742.
- Reynolds, J., Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient : a basis for a short-term genetic distance. *Genetics* **105**, 767-779.
- Rhyu, M.G., Park, W.S. & Meltzer, S.J. (1994). Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* **9**, 29-32.
- Rice, W. (1989). Analysis table of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Robert, R., Borel, M., Pichot, P. & Trut, G. (1991). Elevage de l'huître plate à Arcachon: pas de miracle immédiat. *Aqua Revue* **39**, 19-28.
- Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Borner, A., Sorrells, M.E., Tanskley, S.D. & Ganai, M.W. (1995). Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics* **246**, 327-333.
- Rodhouse, P.G. & Gaffney, P.M. (1984). Effect of heterozygosity on metabolism during starvation on the american oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* **80**, 179-187.
- Rodhouse, P.G., McDonald, J.H., Newell, R.I.E. & Koehn, R.K. (1986). Gametic production, somatic growth and multiple-locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis*. *Marine Biology* **90**, 209-214.
- Roff, D.A. & Bentzen, P. (1989). The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms : χ^2 and the problem of small samples. *Molecular Biology and Evolution* **6**, 539-545.
- Rogan, E., Culloty, S.C., Cross, T.F. & Mulcahy, M.F. (1991). The detection of *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980) in frozen oysters (*Ostrea edulis* L.) and the effect of the parasite on condition. *Aquaculture* **97**, 311-315.

- Ron, M., Blanc, Y., Band, M., Ezra, E. & Weller, J.I. (1996). Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implication for genetic improvement. *Journal of Dairy Science* **79**, 676-681.
- Rongwen, J., Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Lavi, U. & Crega, P.B. (1995). The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics* **90**, 43-48.
- Rothuizen, J., Wolfswinkel, J., Lenstra, J.A. & Frants, R.R. (1994). The incidence of mini- and micro-satellite repetitive DNA in the canine genome. *Theoretical and Applied Genetics* **89**, 403-406.
- Rousset, F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Ruzzante, D.E. (1998). A comparison of several measure of genetic distance and population structure with microsatellite data : bias and sampling variance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55** (in press).
- Ruzzante, D.E., Taggart, C.T., Cook, D. & Goddard, S. (1996). Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua*) off Newfoundland: microsatellite DNA variation near antifreeze level. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 634-645.
- Saavedra, C. & Guerra, A. (1996). Allozyme heterozygosity, founder effect and fitness traits in a cultivated population of the European oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **139**, 203-224.
- Saavedra, C., Zapata, C., Guerra, A. & Alvarez, G. (1987). Genetic structure of populations of flat oyster (*Ostrea edulis* [Linneo, 1758]) from the NW of the Iberian Peninsula. *Investigation pesq* **51**, 225-241.
- Saavedra, C., Zapata, C., Guerra, A. & Alvarez, G. (1993). Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* **115**, 85-95.
- Saavedra, C., Zapata, C. & Alvarez, G. (1995). Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* **122**, 95-104.
- Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. & Allard, R.W. (1994). Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **91**, 5466-5470.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saitou, N. & Nei, M. (1997). The Neighbor-Joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sambrook, J.J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New-York.
- Sanchez, J.A., Clabby, C., Ramos, D., Blanco, G., Flavin, F., Vasquez, E. & Powell, R. (1996). Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon). *Heredity* **77**, 423-432.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **77**, 5463-5467.
- Sarver, S.K., Katoh, M. & Foltz, D.W. (1992). Apparent overdominance of enzyme specific activity in two marine bivalves. *Genetica* **85**, 231-239.
- Sbordoni, V., De Matthaeis, E., Cobolli Sbordoni, M., La Rosa, G. & Mattoccia, M. (1986). Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquaculture* **57**, 239-251.
- Schlötterer, C. & Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**, 211-215.
- Schlötterer, C., Amos, B. & Tautz, D. (1991). Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* **354**, 63-65.

- Scribner, K.T., Gust, J.R. & Fields, R.L. (1996). Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 833-841.
- Senior, M.L. & Heun, M. (1993). Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* **36**, 884-889.
- Shriver, M.D., Jin, L., Chakraborty, R. & Boerwinkle, E. (1993). VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model - a computer simulation approach. *Genetics* **134**, 983-993.
- Shull, G.H. (1948). What is "heterosis". *Genetics* **33**, 439-446.
- Singer-Sam, J., Tanguay, R.L. & Riggs, A.D. (1997). Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications : A Forum for PCR Users* **3**, 11
- Singh, S.M. (1982). Enzyme heterozygosity associated with growth at different developmental stage in oysters. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **24**, 451-458.
- Skibinski, D.O.F., Beardmore, J.A. & Cross, T.F. (1983). Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society of London* **19**, 137-183.
- Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* **39**, 53-65.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* **47**, 264-279.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**, 457-462.
- Slatkin, M. & Barton, N.H. (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average level of gene flow. *Evolution* **43**, 1349-1368.
- Slatkin, M. & Maddison, W.P. (1989). A cladistic measure of gene flow from the phylogenies of alleles. *Genetics* **123**, 603-613.
- Slettan, A., Olsaker, I. & Lie, Ø. (1993). Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genetics* **24**, 195-197.
- Smouse, P.E. (1986). The fitness consequences of multiple-locus heterozygosity under the multiplicative overdominance and inbreeding depression models. *Evolution* **40**, 946-957.
- Sneath, P.A. & Rohlf, F.J. (1973). *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman San Francisco.
- Sokal, R.R. & Rohlf F.J., 1995. *Biometry : the principles and practice of statistics in biological research*. Third Edition. Freeman and Company, New-York, USA.
- S-PLUS. Guide to Statistical and Mathematical Analysis, Statistical Sciences, Version 3.3, Seattle : StatSci, a division of MathSoft, Inc, 1995
- Stallings, R.L., Ford, A.F., Nelson, D., Torney, D.C., Hildebrand, C.E. & Moyzis, R.K. (1991). Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* **10**, 807-815.
- Staub, J., Bacher, J. & Poetter, K. (1996). Sources of potential errors in the application of random amplified polymorphic DNAs in cucumber. *HortScience* **31**, 262-266.
- Staub, J.E., Serquen, F.C. & Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* **31**, 729-741.
- Stenzel, H.B. (1971). Oysters. In *Treatise on invertebrate paleontology* (K.C. Moore, ed.), Geological Society of America Inc. and the University of Kansas, Boulder, Colorado,
- Strand, M., Prolla, T., Liskay, R. & Petes, T. (1994). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**, 274-276.

- Strassman, J.E., Barefield, K., Solis, C.R., Hughes, C.R. & Queller, D.C. (1997). Trinucleotide microsatellite loci for a social wasp, *Polistes*. *Molecular Ecology* 6, 97-100.
- Szewc-McFadden, A.K., Kresovitch, S., Blick, S.M., Mitchell, S.E. & McFerson, J.R. (1996). Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 534-538.
- Tajima, F. & Nei, M. (1984). Note on genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics* 106, 569-574.
- Tam, Y.K. & Kornfield, I. (1996). Characterization of microsatellite markers in *Homarus* (Crustacea, Decapoda). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5, 230-238.
- Taramino, G. & Tingey, S. (1996). Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39, 277-287.
- Taylor, A.C., Sherwin, W.B. & Wayne, R.K. (1994). Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorninus krefftii*. *Molecular Ecology* 3, 277-290.
- Tessier, N., Bernatchez, L. & Wright, J.M. (1997). Population structure and impact of supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Molecular Ecology* 6, 735-750.
- Thiriou-Quievreux, C. (1986). Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica* 70, 225-231.
- Thomas, S. & Scott, N.S. (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics* 86, 985-990.
- Thorén, P.A., Paxton, R.J. & Estoup, A. (1995). Unusually high frequency of (CT)_n and (GT)_n microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespa rufa* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). *Insect Molecular Biology* 4, 141-148.
- Thunell, R. & Belyea, P. (1982). Neogene planktonic foraminiferal biogeography of the Atlantic ocean. *Micropaleontology* 28, 381-398.
- Tigé, G., Grizel, H., Martin, A.G., Langlade, A. & Rabouin, M.A. (1981). Situation épidémiologique consécutive à la présence du parasite *Bonamia ostreae* en Bretagne. Evolution au cours de l'année 1980. *Science et Pêche. Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes* 315, 13-20.
- Tigé, G., Grizel, H., Rabouin, M.A., Cochenec, N., Audic, G. & Langlade, A. (1982). *Bonamia ostreae*. Evolution de la situation épidémiologique en Bretagne au cours de l'année 1981. *Science et Pêche. Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes* 328, 3-13.
- Toro, J.E. & Newkirk, G.F. (1990). Divergent selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*: response to selection and estimation of genetic parameters. *Marine Ecology - Progress Series* 62, 219-227.
- Toro, J.E., Vergara, A.M. & Gallegillos, R. (1996). Multiple-locus heterozygosity, physiology and growth at two different stages in the life cycle of the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Marine Ecology - Progress Series* 134, 151-158.
- Trochon, P. (1976). Taxonomie et anatomie des huîtres. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 40, 161-179.
- Urbanek, M., Goldman, D. & Long, J.C. (1996). The apportionment of dinucleotide repeat diversity in native Americans and Europeans: a new approach to measuring gene identity reveals asymmetric patterns of divergence. *Molecular Biology and Evolution* 13, 943-953.
- Valdes, A.M., Slatkin, M. & Freimer, N.B. (1993). Allelic frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133, 737-749.
- Van Banning P. (1985). Control of *Bonamia* in Dutch oyster culture. A.E. Ellis, ed. Plymouth Academic Press. London. pp.393-396.
- Van Banning, P. (1990). The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 84, 189-192.

- Van Banning, P. (1991). Observation of bonamiosis in the stock of the European flat oyster *Ostrea edulis*, in the Netherlands with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* **93**, 205-211.
- Van Donk, J. (1976). O¹⁸ record of the Atlantic ocean for the end Pleistocen epoch. *Geol. Soc. Amer. Mem.* **145**, 147-163.
- Van Lith, H.A. & Van Zutphen, L.F.M. (1996). Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. *Animal Genetics* **27**, 387-395.
- van Rijckevorsel, J. (1987). *The application of fuzzy coding and horseshoes in multiple correspondance analysis*. DSWO Press Leiden.
- Vega-Pla, J.L., Garrido, J.J., Dorado, G. & de Andrès-Cara, D.F. (1996). Three new polymorphic equine microsatellites: HML2, HML3, HML5. *Animal Genetics* **27**, 215
- Viard, F., Bremond, P., Labbo, R., Justy, F., Delay, B. & Jarne, P. (1996). Microsatellites and the genetics of highly selfing populations in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Genetics* **142**, 1237-1247.
- Vigouroux Y. (1994). Relation hétérozygotie-croissance chez l'huître plate *Ostrea edulis*(L.) - Marqueurs protéiques et microsatellites. *Rapport de DEA Evolution et Ecologie*.
- Vu Tien Khang, J. (1983). Méthodes d'analyse des données démographiques et généalogiques dans les populations d'animaux domestiques. *Genetics, Selection, Evolution* **15**, 263-298.
- Wada, K.T. (1975). Electrophoretic variants of leucine aminopeptidase of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). *Bulletin of the National Pearl Research Laboratory of Japan* **19**, 2152
- Wahlund, S. (1928). Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* **11**, 65-106.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R. (1992). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* **10**, 506-513.
- Waples, R.S. (1989). A generalized approach of estimating effective population size from temporal changes in allelic frequency. *Genetics* **121**, 379-391.
- Weber, J.L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**, 524-530.
- Weber, J.L. & May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* **44**, 388-396.
- Weinberg, W. (1908). Über des Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte D. Ver. f. vaterländische Naturkunde in Württemberg* **64**, 368-382.
- Weir, B.S. (1990). *Genetic data analysis*. Sinauer Publ. Sunderland, MA, pp. 1-377.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Weising, K., Fung, R.W.M., Keeling, D.J., Atkinson, R.G. & Gardner, R.C. (1996). Characterization of microsatellite from *Actinidia chinensis*. *Molecular Breeding* **2**, 117-131.
- Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, M., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G. & Lathrop, M. (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**, 794-801.
- Wilkins, N.P. & Mathers, N.F. (1973). Enzyme polymorphisms in the European oyster, *Ostrea edulis* L. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics* **4**, 41-47.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Willis, J. & Orr, H.A. (1993). Increased heritable variation following population bottleneck : the role of dominance. *Evolution*, **47**, 949-957.

- Winterø, A.K., Fredholm, M. & Thompsen, P.D. (1992). Variable (dG-dT)_n - (dC-dA)_n in the porcine genome. *Genomics* 12, 281-288.
- Wong, A.K., Yee, A.H., van de Sande, J.H. & Rattner, J.B. (1990). Distribution of CT-rich tract is conserved in vertebrates chromosomes. *Chromosoma* 99, 344-351.
- Workman, P.L. & Niswander, J.D. (1970). Population studies in Southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics* 22, 24-49.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16, 97-159.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28, 139-156.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15, 323-354.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution* 19, 395-420.
- Wu, K.S. & Tanksley, S.D. (1993). Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in rice. *Molecular and General Genetics* 241, 225-235.
- Wytenbach, A., Favre, L. & Hausser, J. (1997). Isolation and characterization of simple sequence repeats in the genome of the common shrew. *Molecular Ecology* 6, 797-800.
- Yonge, C.M. (1960). *Oysters*. Collins London,
- Yu, S., Pritchard, M., Kremer, E., Lynch, M., Nancarrow, J., Baker, E., Holman, K., Mulley, J.C., Warren, S.T., Schlessinger, D., Sutherland, G.R. & Richards, R.I. (1991). Fragile-X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 252, 1179-1181.
- Yu, Y.G., Saghai Maroof, M.A., Buss, G.R., Maughan, P.J. & Tolin, S.A. (1994). RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology* 84, 60-64.
- Zhang, Q., Gao, Y.J., Yang, S.H., Ragab, R., Saghai Maroof, M.A. & Li, Z.B. (1994). A diallel analysis of heterosis in elite hybrid rice based on RFLPs and microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics* 89, 185-192.
- Zhao, X. & Kochert, G. (1993). Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 21, 607-614.
- Zheng, L. (1997). Microsatellite mapping of insect genomes. In *Molecular biology of insect disease vectors : A methods manual* (J.M.B. Crampton, C.B. Beard and C. Louis, eds.), Chapman & Hall, London,
- Zoghbi, H.Y., Chung, M., Banfi, S., Kwiatowski, T.J., Serviado, A., Beudet, A.L., McCall, A.E., Duvick, L.A., Ranum, L.P.W. & Orr, H.T. (1993). Expansion of an unstable trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type-1. *American Journal of Human Genetics* 53, 9
- Zouros, E. (1987). On the relation between heterozygosity and heterosis : an evaluation of the evidence from marine mollusks. *Isozymes* 15, 255-270.
- Zouros, E. & Foltz, D.W. (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia* 25, 583-591.
- Zouros, E. & Foltz, D.W. (1987). The use of allelic isozymes variation for the study of heterosis. In *Isozymes : Current topics in biological and medical research* (M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios and G.S. Whitt, eds.), Alan R. Liss, New-York,
- Zouros, E. & Pogson, G.H. (1994). The present status of the relationship between heterozygosity and heterosis. In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms* (A.R. Beaumont, ed.), Chapman & Hall, London.
- Zouros, E., Singh, S.M. & Miles, H.E. (1980). Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and its possible explanations. *Evolution* 34, 856-867.

ANNEXES

ANNEXE A

Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae.

N. Bierne, S. Launey, Y. Naciri-Graven & F. Bonhomme

Genetics (sous presse)

**EARLY EFFECT OF INBREEDING AS REVEALED BY MICROSATELLITE ANALYSES
ON *OSTREA EDULIS* LARVAE**

Nicolas Bierne^{*,†}, Sophie Launey[†], Yamama Naciri-Graven^{†,1} and François Bonhomme^{*}

^{*}Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université Montpellier II, F-34095 Montpellier, France

[†]Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie, Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer (Ifremer), F-17390 La Tremblade, France

¹Present address : Institut de Zoologie et d'Ecologie Animale (IZEA), Université de Lausanne CH-1015 Lausanne/Dorigny, Switzerland

Running title : Inbreeding depression in oyster larvae.

Keywords: microsatellites, *Ostrea edulis* larvae, inbreeding depression, heterozygosity

Corresponding author : François Bonhomme

Laboratoire Génome et Populations
Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral
1 quai de la Daurade
34200 Sète
France.

Tel: 33 4 67 14 38 87

Fax: 33 4 67 14 45 54

E-mail: bonhomme@crit.univ-montp2.fr

ABSTRACT

This paper reports new experimental evidence on the effect of inbreeding on growth and survival in the early developmental phase of a marine bivalve, the flat oyster *Ostrea edulis*. Two crosses between full-sibs were analyzed using four microsatellite markers. Samples of 96 individuals were taken just after spawning (Day 1), at the end of the larval stage prior to metamorphosis (Day 10) and at the post-larval stage (Day 70). Significant departure from Mendelian expectation was observed at two loci in the first cross and two loci in the second. Departure from 1:1 segregation occurred in one parent of the first cross at three loci and genotypic selection, which resulted in highly significant heterozygote excesses, was recorded at three out of four loci in cross C1 and at two out of three loci in cross C2. Across the four markers, there were similar significant excesses of multilocus heterozygosity (MLH), and significant MLH-growth correlations were recorded for both crosses at all stages. These results suggest that microsatellite markers, often assumed to be neutral, co-segregated with fitness associated genes (FAGs), the number of which is estimated to be between 15 and 38 in the whole genome, and that there is a potentially high genetic load in *O. edulis* genome. This load provides a genetic basis for heterosis in marine bivalves.

INTRODUCTION

Most marine bivalves are characterized by high fecundity, large population sizes, external fertilization with broadcast spawning, and extensive larval dispersal. They should thus illustrate the canonical model of population genetics known as panmixia. Nevertheless, numerous studies of electrophoretic variation in natural populations have revealed a general trend toward heterozygote deficiencies relative to HARDY-WEINBERG equilibrium (HWE, reviewed in ZOUROS and FOLTZ 1984; BLANC and BONHOMME 1986; GAFFNEY *et al.* 1990; BEAUMONT 1991). Just as puzzling is the observation sometimes made in the same species, that multi-locus heterozygosity (MLH) for allozymes is positively correlated with fitness-related traits in juveniles or adults, such as growth, viability or physiological traits (ZOUROS *et al.* 1980; KOEHN and SHUMWAY 1982; KOEHN and GAFFNEY 1984; HAWKINS *et al.* 1989; GAFFNEY *et al.* 1990; ZOUROS and POGSON 1994). Classically, the studies of bivalve genetics are discussing separately the departure from HWE on one side and the MLH / fitness correlation on the other side, trying to reconcile both afterwards. Various combinations of hypotheses have been put forward to account for one or the other of these apparently contradictory trends. These hypotheses refer to very different biological phenomena such as the existence of typing artifacts, null alleles, partial aneuploidy, genomic imprinting, deleterious genes, population sub-structuring or partial inbreeding.

Apart from electrophoretic problems, such as null alleles, (FOLTZ 1986; KATOH and FOLTZ 1988; GAFFNEY 1994), two classes of arguments have been invoked to explain heterozygote deficiencies

and heterozygosity-fitness correlations :

-i) The first class involves selection acting directly on allozyme genotypes. Heterozygote deficiencies could be due to selection against heterozygotes during the larval phase (ZOUROS & FOLTZ 84, MALLET *et al.* 1985, SINGH & GREEN 1984, BLANC and BONHOMME (1986), HAWKINS *et al.* (1989), GAFFNEY (1990)), whereas heterotic effects (MLH / fitness relationship) could be the result of direct overdominance at allozyme loci at the adult stage (KOEHN and SHUMWAY 1982; ZOUROS *et al.* 1983; KOEHN *et al.* 1988; MITTON 1993; ZOUROS and POGSON 1994). These models consider that the metabolism of sessile invertebrates is an important element of their adaptation to the fluctuating external conditions and that the neutral status of allozymes can thus be questioned ;

-ii) On the other hand, the second class of arguments states that allozyme polymorphism is neutral but indirectly reflects variation at fitness loci through genetic correlations promoted by some deviations from HWE. These models therefore put emphasis on the reproductive biology and population dynamics of marine bivalves. Several independent observations have indeed challenged the idea that marine organisms occur in large, homogeneous, randomly mating populations. Large variation in reproductive success leading to effective population sizes several orders of magnitude below census numbers (HEDGECOCK 1994; AVISE 1994) and recruitment variations due either to food availability (PETERMAN and BRADFORD 1987) or to fluctuations in the physical transportation of larvae (ROUGHGARDEN *et al.* 1988) could create the conditions for local genetic differentiation between cohorts (DAVID *et al.* 1997a, b). Heterozygote deficiencies could be directly generated by non-random mating or within-sample structure (WAHLUND effect). Reproductive biology features such as partial inbreeding may also create indirect correlations between heterozygosity and fitness (OHTA 1971; STROBECK 1979, CHARLESWORTH 1991; ZOUROS *et al.* 1980, 1993). These correlations may be of two kinds : (1) Small instantaneous effective population sizes may promote gametic disequilibria between marker loci and overdominant or deleterious recessive alleles. In this case, allozyme loci will reflect variation at dominant or overdominant fitness loci localized in their chromosomal vicinity (local effect). (2) Partial inbreeding may generate variation in overall genomic heterozygosity among individuals, so that homozygosity at any locus will correlate with inbreeding depression (general effects, DAVID *et al.* 1995). Direct overdominance at allozyme loci may of course be considered as a local effect (the chromosomal vicinity being in this case reduced to the locus itself) which is therefore difficult to distinguish from associative overdominance due to gametic disequilibria.

An in-depth review of the above-mentioned studies would reveal two things. First, that data on genetic processes happening during the larval and metamorphic phases (during which most of the developmental processes take place) is conspicuously absent, and second that, although dramatic inbreeding depression has been reported in the laboratory, the extent and distribution of genetic load, two crucial parameters to be tested to assess the pertinence of the "general effect" hypotheses, are still largely unexplored (but see review by DAVID *et al.*, 1995).

Screening the larval stage has not proven easily feasible using allozyme electrophoresis techniques (but see HU *et al.* 1992), while PCR techniques afford a sufficiently sensitive method. Genotyping of mussel larvae (*Mytilus edulis*) was performed by CORTE-REAL *et al.* (1994) on an intron-length polymorphism at a single locus to test the inheritance of this marker. In the same way, HU and FOLTZ (1996) have characterized the inheritance of scnDNA polymorphism in juvenile oysters *Crassostrea virginica*. If allozyme loci are the causative agents of the MLH / fitness correlation ("selection" hypothesis, ZOUROS and POGSON 1994), no relationship should be found for a set of unlinked strictly neutral markers. An opposite trend should however be observed if allozyme loci act as markers of larger portions of the genome ("associative overdominance" hypothesis, OHTA 1971; ZOUROS *et al.* 1980). In the only study implying both type of markers available to date, POGSON and ZOUROS (1994) found a MLH / growth correlation with seven allozyme loci while a set of eight nuclear RFLP loci failed to produce a significant correlation. As concluded by these authors, other analyses have to be performed before a general conclusion can be drawn. In the same study, heterozygote deficiencies were found, although smaller than generally observed, at the anonymous nuclear DNA markers. A similar result was also obtained for some scnDNA loci by FOLTZ and HU (1996) in the American oyster *C. virginica* although this was interpreted as artifactual by HARE *et al.* (1996).

The microsatellite loci (SSRs; WEBER and MAY 1989) recently developed in the flat oyster *Ostrea edulis* (NACIRI *et al.* 1995) has allowed us to carry out in this species a first study on controlled-crosses to address some of the above-mentioned questions. The aim of the present work was to develop a multi-locus analysis on single larvae to check for the existence of early heterozygote deficits and, at the same time, to test the occurrence of MLH / fitness correlation at an early stage of the life cycle. Preliminary assays of inheritance (NACIRI *et al.* 1995) and unpublished data on natural populations of the flat oyster for two microsatellite loci suggested the occurrence of possible artifacts due to PCR techniques and high mutation rates. We analyzed the segregation of these markers before and after settlement of progenies from controlled pair-matings, which eliminates some of the alternative hypotheses set out before. As allozymic data on pair crosses have usually failed to exhibit a MLH / fitness correlation (BEAUMONT *et al.* 1983; BEAUMONT 1991; GAFFNEY and SCOTT 1984; ALVAREZ *et al.* 1989) and especially because the variability at microsatellite loci in natural populations of the flat oyster is such that it is nearly impossible to find multi-homozygous genotypes in progenies of crosses between unrelated wild animals (unpublished data), we analyzed, at four microsatellite loci, the larval progenies of two crosses between full sibs from a preceding wild inter-cross.

Doing so allows us also to address the second gap in the literature concerning genetic load, since inbreeding at the full-sib level is expected to reveal the effect of homozygosity of quite large chromosomal fragments around each marker locus (STRAUSS 1986). Recent work on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (MCGOLDRICK & HEDGECOCK 1997), has shown that fixation and segregation of allozyme markers in adults from inbred lines deviate from neutral expectations, revealing a strong and probably epistatic selection for viability. In the present study, we extend such an analysis to early life

history stages, using presumably neutral DNA markers. By measuring the sizes of larvae and scoring their genotype in samples taken at several time intervals, we test the occurrence of an MLH / growth correlation at this stage of the life cycle. Furthermore, we discuss from our results the intensity of the genetic load and its genomic distribution, and the potential consequences of early larval selection on the observed genotypic distribution in natural populations.

MATERIAL AND METHODS

Pair matings: In March 1995, pair matings were obtained between wild animals of the French Atlantic coast near Quiberon Bay, and animals from inbred lines selected for a resistance to *Bonamia ostreae* at the experimental IFREMER hatchery of La Tremblade (Charente Maritime, France). Since *Ostrea edulis* is a larviparous species, fertilization takes place in the brood chamber of female oysters and larvae are nursed for a whole week before being released in seawater. For this reason, in vitro fertilization is very difficult to achieve. In February 1996, full-sibs from two different pair matings were placed by pair in ten aquariums with a continuous flow of filtered seawater at 18°C, a modified photoperiod (from 8 to 14 hours of light during the experiment duration) and a surplus system to collect larvae in 100 µm sieves. Oysters were induced to spawn by thermal shocks (up to 30°C). Because of this technique, it was impossible to tell apart the male from the female.

Collection and treatment of larvae: For each cross, larvae were transferred to a 30 l classical larval cylindrical growing pond just after spawning. A first sample of 96 larvae was then taken and preserved in pure alcohol (Day 1). A second sample was taken at the end of the larval stage (Day 10), prior to settlement. A last series of samples were obtained at the post larval stage (Day 70). Individual larvae (Day 1 and Day 10) were measured on their largest diameter using a Nikon profile projector, then collected in 15 µl alcohol using a Gilson micro-pipette and transferred to 0.5 ml sterile microfuge tubes. Before being measured, spat (Day 70) were also weighed with a precision scale. Since the shape of spat is usually uneven at this stage, weights were expected to be a better estimator of growth.

DNA extraction, PCR procedures and electrophoresis: Because of the small amounts of tissue that were available, the Chelex extraction method (modified from Singer-Sam et al. 1989) was used. Alcohol was evaporated at room temperature. Then 400 µl of 5% chelating resin (Chelex, Biorad, Richmond, USA) and 5 µl of proteinase K were added to each sample tube. The mixtures were shaken and heated overnight in a stove at 55°C, then vortexed, heated again at 100°C for 15 min, vortexed a second time and centrifuged at 10,000 g for 2 min. The supernatant was stored at -20°C until it was used as template for PCR. The same protocol was used for spat DNA extraction but the supernatant was diluted 10 times in 5% chelex. Five µl of PCR mixture containing 0.5µM of each primer (one labelled with 33P), 2mM MgCl₂, 0.2mM of each dNTP and 0.25 unit of red Goldstar DNA polymerase

Day 10: $\theta = 0.42$, $P = 0.023$; Day 70: $\theta = 0.34$, $P < 10^{-5}$). Note the surprising lower recombination rate for Cross C1 at Day 10, a stage which exhibits Mendelian proportions according to G-tests. Linkage can bias the MLH distribution study because it modifies the expected number of double homozygotes and double heterozygotes. This was not a problem for cross C2 however, as locus *Oedu.J12* exhibits no homozygotes and was not taken into account for the MLH study. For cross C1, the linkage gives rise to an equal excess of double heterozygotes and double homozygotes, so effect on the MLH distribution is not a nuisance. Tests on MLH were also performed for C1 without *Oedu.O9* and without *Oedu.J12*, with similar results.

SEGREGATION ANALYSES:

Cross C1: Segregation analyses are presented in Tables 1a and 1b. Unfortunately, the Day 1 sample was not available so that the earliest results are for Day 10. At this stage, no significant departure from Mendelian expectation was observed at the experiment-wise level ($\alpha = 0.00625$) although *Oedu.T5* showed a significant result at the single test level ($P = 0.0117$, Table 1a). At Day 70, three loci (*Oedu.O9*, *Oedu.B0* and *Oedu.J12*) showed significant departures from Mendelian expectations at the single test level ($\alpha = 0.05$), but only *Oedu.J12* remained significant at the experiment-wise level. No temporal heterogeneity between stages was detected using Gh tests for the four loci ($P > 0.05$). As a result, data were pooled and Gp tests were all significant at the 5% level and two of them remained significant at the experiment-wise level ($\alpha = 0.0125$, *Oedu.O9* and *Oedu.T5*). Gp associated probabilities were combined following FISHER's procedure to test the overall significance of the departure from Mendelian expectation. Since *Oedu.O9* and *Oedu.J12* were shown to be linked, the test was computed on 3 loci excluding the one or the other locus. Both tests were significant at the 0.1% level, indicating that the null hypothesis of HARDY-WEINBERG proportions over stages and loci can be firmly rejected. The large polymorphism of microsatellites allowed us to test for allelic proportions in the two parents for three out of the four loci (Table 1b, *Oedu.O9*, *Oedu.B0* and *Oedu.T5*). For Parent 1 at Day 10, an experiment-wise-significant departure from the 1:1 ratio was observed for *Oedu.T9* ($P = 0.0023$). At Day 70, significant segregation distortions were observed for *Oedu.O9* and *Oedu.B0* ($\alpha = 0.05$) but the distortion remained significant at the experiment-wise level ($\alpha = 0.0167$) for the later locus only. Since no heterogeneity was detected between stages (Gh, $P > 0.05$), data were pooled and the three Gp tests appeared to be significant at the experiment-wise level ($\alpha = 0.0167$). On the opposite, Parent 2 showed no significant departure from a 1:1 ratio ($P > 0.05$ for both G, Gh and Gp tests).

Cross C2: Segregation analyses are presented in Tables 2a and 2b. Unfortunately, *Oedu.J12* was not amplified at Day 1 for technical reasons. No significant departure from HARDY-WEINBERG proportions was detected at Day 1 ($P > 0.05$). At Day 10, *Oedu.O9* and *Oedu.B0* showed significant departures

from HW at the single test level but none of them remained significant at the experiment-wise level ($\alpha = 0.0045$, $P = 0.0153$ and 0.0241 , respectively). At Day 70, the same two loci showed significant departures from HW proportions but only *Oedu.B0* remained significant at the experiment-wise level ($\alpha = 0.0045$, $P = 0.0271$ and $5.5 \cdot 10^{-5}$, respectively). Although some differences were observed between stages for at least two loci, only Gh for *Oedu.B0* was significant ($\alpha = 0.0125$, $P = 0.0006$). Data were pooled for the three other loci and *Oedu.O9* showed an overall and significant departure from Mendelian proportions at the experiment-wise level ($\alpha = 0.0167$, $P = 0.0003$). Alleles segregation was tested in both parents for *Oedu.O9*, *Oedu.T5* and *Oedu.J12* (Table 2b). No significant departure from a 1:1 ratio was detected in both parents except for Parent 2 at Day 10 and *Oedu.J12* locus for which the G-test was significant at the single test level ($P = 0.0433$) but no more significant at the experiment-wise level ($\alpha = 0.00625$). No heterogeneity was found between stages and Gp tests remained non-significant in any case for both parents.

HETEROZYGOTES EXCESSES AND MLH DISTRIBUTIONS:

Cross C1: Heterozygote excesses are present at all loci for Cross C1 since D is always positive (Table 3a). These excesses are not significant at Day 10 according to G-tests but become significant later on at the experiment-wise level ($\alpha = 0.00625$) for loci *Oedu.O9* and *Oedu.J12* and significant at the single test level ($\alpha = 0.05$) for the remaining two loci (*Oedu.T5* and *Oedu.B0*) at Day 70. No temporal heterogeneity between stages was observed (Gh, $P > 0.05$) and data were therefore pooled. On pooled data, heterozygote excesses are significant at the experiment-wise level ($\alpha = 0.0125$) for three loci (*Oedu.O9*, *Oedu.T5* and *Oedu.J12*) and at the single test level for the fourth locus (*Oedu.B0*, $P = 0.0246$). The comparison of observed versus expected MLH distributions corroborates the single-locus observations (Figure 1). An excess of higher multi-heterozygous genotypes is observed, that is not significant at Day 10 (G = 6.213, df = 3, $P = 0.1017$; without *Oedu.J12* : G = 5.987, df = 2, $P = 0.11$; without *Oedu.O9* : G = 3.97, df = 2, $P = 0.26$) but becomes significant at Day 70 (G = 29.206, df = 3, $P = 2 \cdot 10^{-6}$; without *Oedu.J12* : G = 19.68, df = 2, $P = 2 \cdot 10^{-4}$; without *Oedu.O9* : G = 20.4, df = 2, $P = 10^{-5}$). No significant temporal heterogeneity was detected at the single locus level, whereas all loci exhibited an increase of the heterozygote excess D (Table 3a). At the multilocus level however, a significant temporal heterogeneity was found between MLH distributions at Day 10 and Day 70 (Gh = 8.534, df = 3, $P = 0.036$).

Cross C2: No significant heterozygote excess was observed at the youngest stage (Day 1, Table 3b). At Day 10 and Day 70, *Oedu.O9* exhibited significant heterozygote excesses at the experiment-wise level ($\alpha = 0.0056$) whereas D was only significant at the single test level for *Oedu.B0* ($P = 0.0068$ and $P = 0.0246$). No significant temporal heterogeneity was found for *Oedu.O9* (Gh = 2.288, $P > 0.05$) and Gp test exhibited a highly significant heterozygote excess on pooled data (Gp = 16.457, $P = 5.1 \cdot 10^{-5}$). For

Oedu.B0, a significant heterogeneity of heterozygote frequencies across stages was detected ($G_h = 9.903$, $P = 0.0071$). As one may postulate that heterogeneity is due to homozygotes mortality during the larval phase, partial heterogeneity tests were performed to determine which transition accounts for this. A temporal heterogeneity was detected between Day 1 and Day 10 ($G_h = 7.254$, $df = 1$, $P = 0.0071$) but not between Day 10 and Day 70 ($G_h = 0.108$, $df = 1$, $P = 0.7424$). However, Day 10-Day 70 pooled data showed a highly significant heterozygote excess ($G_p = 12.257$, $df = 1$, $P = 0.0005$). Figure 1 shows that excesses of multi-heterozygous genotypes were already present at the end of the larval stage (Day 10: $G = 12.189$; $df = 2$; $P = 0.0023$, $\alpha = 0.0167$) and later (Day 70: $G = 8.159$; $df = 2$; $P = 0.017$, $\alpha = 0.0167$) but were not detected at the beginning of the free larval stage (Day 1) for which no deviation from the expected MLH distribution is observed ($G = 0.85$; $df = 2$; $P = 0.6538$). No temporal heterogeneity was detected ($G_h = 5.148$, $df = 4$, $P = 0.2724$) using the three loci. Removing Oedu.T5, which perhaps behaved as neutral because homozygotes are not autozygotes, we obtained however a significant heterogeneity between Day 1 and Day 10 2-locus MLH distributions ($G_h = 8.888$, $df = 2$, $p = 0.012$) but not between Day 10 and Day 70 ($G_h = 0.718$, $df = 2$, $P = 0.6983$).

HETEROZYGOSITY-GROWTH CORRELATION:

Figure 2 presents the MLH-size relationship. For each cross and at each stage, individuals ranking in higher size-quartiles show higher MLH. Product-moment correlations are all significant and consistent over time in each cross (Cross 1 Day 10: $r = 0.51$, $df = 82$, $P < 0.001$; Day 70: $r = 0.52$, $df = 74$, $P < 0.001$; Cross 2 Day 1: $r = 0.46$, $df = 74$, $P < 0.001$; Day 10: $r = 0.37$, $df = 78$, $P < 0.001$; Day 70: $r = 0.39$, $df = 78$, $P < 0.001$). Results on single-locus comparisons between heterozygotes and homozygotes growth (Tables 4) are more puzzling, because they lacked consistency. Nevertheless d , which corresponds to the mean standardized growth of heterozygotes minus the mean standardized growth of homozygotes, is always positive and significantly different from zero in 4 cases out of 8 in Cross C1, whereas it is positive, except for Oedu.T5 at Day 10, and significantly different from zero in 6 cases out of 9 in cross C2 (Table 4). In both crosses and from Day 1 to Day 70, the Fisher's procedure showed that overall loci, heterozygotes were significantly larger than homozygotes (Cross 1 Day 10: $\chi^2 = 31.5$, $df = 8$, $P = 0.0001$; Day 70: $\chi^2 = 26.9$, $df = 8$, $P = 0.0007$; Cross 2 Day 1: $\chi^2 = 16.1$, $df = 6$, $P = 0.0132$; Day 10: $\chi^2 = 19.6$, $df = 6$, $P = 0.0033$; Day 70: $\chi^2 = 24.8$, $df = 6$, $P = 0.0004$).

At the genotypic level, it is impossible to find any evidence for a significant differences in growth between the various heterozygotes for type 2 segregations (three heterozygous and one homozygous genotypes in the progeny). For type 1 segregations (Oedu.J12 in Cross C1 and Oedu.B0 in Cross C2), it is interesting to compare the two homozygous genotypes (Figure 3). Homozygotes are always smaller than heterozygotes, and one of the two homozygotes is smaller than the other. One-tailed t-tests were performed and pooled between stages using Fisher's method for combining independent test results, showing for Cross C1 that the only significant difference in size is found for 224/230 and 230/230 genotypes (224/230 vs. 230/230: $\chi^2 = 24.02$, $P = 7.910^{-5}$; 224/224 vs. 224/230: $\chi^2 = 8.89$, $P = 0.064$; 224/224 vs. 230/230: $\chi^2 = 8.51$, $P = 0.074$). For Cross C2, all the differences in size are found

significant (098/098 vs. 098/101: $\chi^2 = 10.06$, $P = 0.04$; 098/101 vs. 101/101: $\chi^2 = 15.33$, $P = 0.004$; 098/098 vs. 101/101: $\chi^2 = 12.39$, $P = 0.014$).

ALLELE-SPECIFIC BIASES:

Homozygotes for two different alleles were found for one locus in each cross (*Oedu.J12* for Cross C1 and *Oedu.B0* for Cross C2; Tables 1 and 2). Allele frequencies for these two loci in the natural population are illustrated in Figure 4 (S. Launey, unpublished data). A bias against both types of homozygotes (224/224 and 230/230 for *Oedu.J12* ; 099/099 and 102/102 for *Oedu.B0*) was observed in both cases (see Tables 1a and 2a for viability, and Figure 3 for growth). The bias was stronger and significant for the less common allele (230) for *Oedu.J12*, but it was, on the contrary, stronger for the more common allele (099) for *Oedu.B0*. For *Oedu.T5* and *Oedu.O9* loci, no tendency towards a bias for the allele of the homozygote genotype to be rare in the natural population was observed.

DISCUSSION

Our work is one of the first multilocus analyses performed on single bivalve larvae. HU *et al.* (1992) were the first to have genotyped single *Crassostrea virginica* larvae using an allozymic micro-electrophoretic method. However, only one polymorphic locus (*Pgi*) has been routinely scored in their study. More recently, HU and FOLTZ (1996) have tested, in the same species, the Mendelian inheritance of a set of polymorphic scnDNA markers and FOLTZ and HU (1996) have subsequently used them to genotype natural populations of larvae and post-larvae. ScnDNA polymorphisms are anonymous nuclear sequences amplified by PCR (followed by restriction enzyme digestion) that are supposed to be neutral so that they share some characteristics in common with microsatellites. The method we used in this study is straightforward and gives the possibility of amplifying up to 20 loci per larva as small as 160 μ m. This allowed us to follow genotypic frequencies at different stages of the early life cycle of *Ostrea edulis* and to determine at which stage Mendelian expectations are observed, and hence, to detect when potential selection effects take place.

Absence of early heterozygote deficiencies: For Cross C1, a Mendelian segregation was observed at the end of the larval stage (Day 10). Heterozygote excesses were however detected subsequently (Day 70), especially for *Oedu.J12*. Temporal heterogeneity was not detected at the single locus level but was at the multi-locus level (Figure 1). Hence, selection occurred between these two stages and also possibly before, that is to say during settlement (metamorphosis and very early juvenile stage). For Cross C2, departure from Mendelian expectations was already present at the end of the larval stage (Day 10) when a single test level of significant was considered but not at Day 1. Selective effects thus certainly occurred earlier than in Cross C1, during the free larval stage (see results with locus *Oedu.B0* and the 2-locus MLH distribution analysis of heterogeneity). A strong selection was thus detected in early stage of the life cycle, during the larval stage and through settlement, with a minimal mortality differential expressed as percentage of homozygotes dying for genetical reasons of 25% to 50%, that is to say before juveniles have reached the size where allozymes can be used.

FOLTZ and HU (1996) analyzed 400 wild-caught larvae and post-larvae for five scnDNA markers and observed a tendency toward heterozygote deficiencies already detected at the pre-metamorphic stage, but no up- nor downward trend for the deficiencies between the two stages. In our case however, in no instance did we find heterozygote deficiencies and our sequential results show that - on the contrary- heterozygotes may have an advantage in larval life. This observation, as well as that of HU and FOLTZ (1996) on crosses between unrelated individuals, and that of HEDGECOCK *et al.* (1996) who observed heterosis in hybrid larvae, rules out the "biphasic selection" at non-enzyme loci, a family of hypotheses which envisions a selection in favor of homozygotes during the larval phase followed by selection in favor of heterozygous juveniles.

CORRELATIONS WITH FITNESS-ASSOCIATED GENES (FAGs):

All loci exhibited significant heterozygote excesses on pooled data in C1 (three at the experiment-wise level and one above the single test level, Table 3a), and so did two out of three loci in C2 as early as at Day 10. Under the hypothesis that microsatellite loci are neutral, these results suggest that these markers co-segregate with fitness-associated genes (FAGs), whatever they are, true overdominant loci or deleterious recessives. No such phenomenon has been recorded in pair crosses between unrelated animals in allozyme studies (Beaumont et al. 1983; Beaumont 1991, Gaffney and Scott 1984, Adamkewicz et al. 1984, Foltz and Chatry 1986, Mallet et al. 1986, Alvarez et al. 1989). In sib crosses however, the probability of homozygosity around a marker which is itself in homozygous condition is increased. Strauss (1986) estimated the fraction of the genome marked for identity by descent under selfing in *Pinus attenuata*. He demonstrated that M , the mean chromosome length associated with a marker, is a function of Y , the mean number of chiasmata per bivalent: $M=L[(1/Y)-(e^{-Y/Y})]$, where L is the total length (in map unit) of the average chromosome. In sib-crosses, pieces of chromosomes showing identity by descent come from grand-parents, and two generations have to be taken into account. This doubles the mean number of chiasmata so that: $M=L[(1/2Y)-(e^{-2Y/2Y})]$. Knowing that the haploid chromosome number is 10 in *Ostrea edulis*, the total genome size is $10L$ and then F_{sc} , the fraction of the genome marked by each locus in a sib-cross, is: $F_{sc}=[(1/2Y)-(e^{-2Y/2Y})]/10$. Usually $1 < Y < 2.5$ and then: $2\% < F_{sc} < 4.3\%$ of the total genome.

In Cross C1 whose offspring were analyzed at four microsatellite loci, at least three and probably four of them showed a higher viability of heterozygotes, suggesting that between three and four survival-associated genes lie within 8 to 17% of the genome, that is a total number of such genes comprised between 17 and 38. In Cross C2 where two out of three markers showed the same phenomenon, the estimates drop to 15-33 FAGs, which is still very high. Even though, at this stage, overdominance effects cannot be distinguished from deleterious recessive effects, the above figures point to a potentially high genetic load in *Ostrea edulis*. Alternatively, we may have underestimated the percent of total genome marked by each microsatellite locus. This could be the case if the number of recombinationally effective crossovers per chromosome were smaller than suspected, or if crossovers were primarily concentrated in recombinational hot-spots. Intriguing results supporting the latter have been recently published for the bivalve *Mulinia lateralis* (GUO & ALLEN 1996), in which it appears that one single recombination hot-spot is present in the proximal region of each chromosome arm.

To further discriminate between the hypothesis of high number of independently segregating FAGs and that of segregation of mostly very large chromosomal fragments, we can ask whether or not the observed variance in fitness fits the assumed number of FAGs. This should be weak if many FAGs were implied, and stronger if the genome of the grand-parents were inherited in large blocks. The intensity of the MLH/fitness correlation is a good estimate of this variance. We do find such a correlation for survival, since the better viability of heterozygotes is also confirmed by the MLH distribution biased toward high heterozygosities (Figure 1). We cannot however reason further with

survival, because we are missing the genotypes of larvae that died. This is nevertheless not the case of the correlation of MLH with growth, another fitness-associated trait that we consider next.

HETEROZYGOSITY / GROWTH CORRELATION.

The single locus analysis of growth is somewhat complex. The effects of a single locus on growth are sometimes not consistent from one cross to the other. Locus *Oedu.B0* for instance does not exhibit significant differences in size between heterozygous and homozygous genotypes in Cross C1 whereas it does in Cross C2 at Day 10 and Day 70. Moreover, when heterozygotes are significantly bigger at one stage, the same effect should be observed at older stages. This happened only for *Oedu.O9* and *Oedu.T5* in Cross C1 and for locus *Oedu.B0* in Cross C2. Two hypotheses can be suggested to explain that significant differences do not always persist :

(i) as variance in size increases with age, it is more and more difficult to get a significant difference especially since the number of homozygotes in the successive samples has decreased because of genotypic selection against them. This could explain the results obtained at locus *Oedu.J12* in Cross C1 which is not far from significance at stage Day 70.

(ii) smaller individuals were also those who died between two consecutive stages. This could explain that, at locus *Oedu.O9* in Cross C2, a smaller d was found at Day 70 than at Day 10. The results at locus *Oedu.T5* for cross C2 remain however very puzzling as analysis fails to show a significant d at Day 10 while it does at Day 1 and at Day 70.

Another possibility is that selection occurs at the multilocus level as a result of pleiotropic effects of the above mentioned selective mortality, growth being only one component of survival. Indeed, a significant MLH-growth correlation was observed at each stage for each crosses, confirming the advantage of multi-heterozygous genotypes. Since at a given stage, multi-heterozygotes were larger than multi-homozygotes, significant locus-specific effects may sporadically show up, with no reason why this should be concordant among stages

Nevertheless, MLH at 4 loci in Cross C1 explains on average 17% of the total growth variability whereas MLH at 3 loci in the cross C2 explains on average 10% of it. Assuming no linkage disequilibrium between *Oedu.O9* and *Oedu.J12*, 8% to 17.2% of the genome is marked by our microsatellites in Cross C1 and the three loci of Cross C2 mark 6 - 13%. These very rough estimates are in agreement with each other if the recombinational size of the *Ostrea edulis* genome stands on the low side of our confidence interval for the parameter Y (see above).

The rare-allele paradox. MCGOLDRICK and HEDGECOCK (1997) analyzed the progeny of self-fertilized hermaphrodites of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with 14 allozymes loci. For most loci and families, they observed a bias against homozygotes for the allele of lesser frequency in natural populations. Only two loci showed a bias against homozygotes for the more common allele. This was considered as an argument against the associative overdominance hypothesis since this hypothesis does not explain why recessive fitness mutations should be preferentially in *cis* configuration with rarer

allozyme allele. In our study, contrasting results were obtained since a bias against homozygotes with the less common allele was observed for *Oedu.J12* whereas an opposite trend was recorded for *Oedu.B0*. This results are not similar to that of MCGOLDRICK and HEDGECOCK (1997) since the lower ranked alleles were not necessarily rare in their study. Moreover, direct effects or regulatory epistasis (MCGOLDRICK and HEDGECOCK 1997) cannot be invoked for microsatellites. In this study, fewer loci and families were analyzed but the larger sample sizes (near 80 individuals), offer the opportunity to find significant effects easily, even with the more common alleles (see results with *Oedu.J12*). It can be suggested that the genetic environment of a frequent allele is more easily purged from deleterious recessives because the frequency of the corresponding homozygote genotype is high. In self-fertilization or in full-sib crosses where linkage disequilibrium is high, one or several deleterious alleles may be linked with the neutral marker in much higher probability for rare alleles than for common alleles in a natural population. This would explain why it is easiest to find biases with less common alleles. In other words, when linkage disequilibrium increases as a result of inbreeding, the genetic background of the marked unit has to be taken into account (CHARLESWORTH 1991).

Mutation rate for microsatellite loci is usually very high, so effect of linked FAGs in natural population should be more important than for allozymes. Actually, each microsatellite allele is, on the average, both younger and in a lesser frequency than an allozymic electromorph which may correspond to a whole class of sequences. Allozymes are thus expected to show less linkage disequilibrium with its surrounding than microsatellites. If the associative overdominance hypothesis explains heterotic effects in natural population of marine bivalves, it should therefore occur even with hypervariable neutral loci. This question is however not relevant to what happens in inbred crosses because homozygotes are actually true autozygotes, which always implies maximum linkage with the genetic background. The explanation for the difference between microsatellites and allozymes, and particularly for the behavior of their rare alleles should thus, if confirmed, be sought elsewhere.

CONCLUSION

For each locus where a homozygotes-heterozygotes comparison was possible, we detected before the spat stage an effect on viability and/or growth. This constitutes an experimental proof that microsatellites, considered as neutral by themselves, can be linked with fitness-associated genes (FAGs) and can provide indicators of selection processes at linked loci (SLATKIN, 1995; CHARLESWORTH, 1991). The linkage disequilibrium observed in crosses between full-sibs is of course more important than what it would be for all other reasons (population structure, migration, looser inbreeding relationships,...) and this is a probable reason for such a strong signal. The present results suggest that there is a potentially high genetic load in *Ostrea edulis*. This genetic load is very likely due to FAGs, which seem to be quite well spread out in the genome so that any microsatellite randomly picked-up will have one or several of them in its vicinity. It can be hypothesized that *Ostrea edulis* genome has a small

enough recombinational size so that big pieces of chromosomes are made homozygous at once in inbred crosses. This potential for inbreeding depression has already been shown by numerous studies of performance in sib families, and was observed at the larval stage (LONGWELL and STILES 1973; BEAUMONT and ABDUL-MATIN 1994; IBARRA *et al.* 1995; but LANNAN 1980; MALLEY and HALEY 1983), at the spat stage (MALLEY and HALEY 1983) as well as the adult stage (BEATTIE *et al.* 1987). Unfortunately, studies of inbreeding depression are seldom assisted by marker analysis except by the way of measuring the fixation indices in the consecutive inbred generations. Classically, such studies conducted on naturally outbred species show a slower rate of decrease in heterozygosity than the one predicted under inbreeding theory (RUMBALL *et al.* 1994). FU and RITLAND (1996) introduced this approach to infer QTLs for inbreeding depression (what we call

FAGs here) in self-fertile organisms. It is based upon selfing a parent that is heterozygous for several unlinked codominant markers, then analyzing the fitness of the progeny according to genotypes. Mapping FAGs and estimating their number in various organisms would be of great interest for understanding the basis of inbreeding depression and heterosis in natural populations. Using selfing is easiest because the 1:2:1 ratio is always expected and the two homozygotes are always autozygotes. Using full-sibs is also possible, as we have demonstrated it here, for species where selfing is impossible: Genotyping grandparents and parents is then necessary to control that homozygotes in the progeny are real autozygotes, and obtaining multi-autozygous genotypes can sometimes be difficult.

This study also confirms that biphasic selection (ZOUROS & FOLTZ 84, MALLETT *et al.* 1985, SINGH & GREEN 1984, BLANC and BONHOMME (1986), HAWKINS *et al.* (1989), GAFFNEY (1990)), may be ruled out as a causative explanation of early heterozygote deficiencies, and shows that heterozygote advantage may appear very early on, between Day 1 and Day 10 as in Cross C2.

Our results show moreover, that a strong selection occurs during the larval stage or at settlement. Selection during settlement has already been recognized by FOLTZ et HU (1996), but selection during the free larval stage was never experimentally proven. The evidence for larval selection this study provides may help us understanding the origin of MLH / fitness correlation in natural populations.

Larval selection can first modify genotypic frequencies and complicate genetic analysis. The curious results observed for the linkage of *Oedu.09* and *Oedu.J12* could be an example, since genotypic selection on epistatic interactions might be able to alter or to fake genetic linkage. Moreover, if inbreeding ever occurs in wild populations of marine bivalves, selection against homozygotes during the larval stage may conceal to some extent the homozygote excess and lead to underestimate the inbreeding coefficient when analyses are done at the spat stage : if at a locus all homozygotes due to partial inbreeding die during the larval stage, the heterozygotes deficiency as well as the apparent heterozygotes advantage can be lost.

The magnitude of heterozygote deficiencies in wild populations of marine bivalves make the

inbreeding hypothesis *a priori* not very likely to account for. Other hypotheses, such as null alleles, seem good alternatives, but a small fraction of inbreeding is enough to explain the MLH-fitness correlation if a sufficient genetic load does exist as suggested in the present study. The inbreeding hypothesis, also termed general effect hypothesis (David *et al* 1995), is usually based on a lesser fitness of inbred versus non-inbred individuals. Our study shows that different individual fitnesses may exist among individuals having homogeneous inbreeding coefficient. This results may complicate the general effect model and his expectations.

The authors are very much indebted to D. Hedgecock and P. David for detailed discussions and criticisms during the elaboration of this paper, and to J. Goudet and Ph. Borsa for their comments on the manuscript as well as to anonymous referees for constructive remarks. They also wish to express their thanks to P. Phélipot and C. Ledu for the larval rearing in La Tremblade. This research was funded in part by IFREMER URM 16.

LITERATURE CITED

- ADAMKEWICZ, L. S., R. TAUB, and J. R. WALL, 1984 Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. II. Size and genotype. *Malacologia* 25: 525-533.
- ALVAREZ, G., C. ZAPATA, R. AMARO and A. GUERRA, 1989 Multilocus heterozygosity at protein loci and fitness in the European oyster, *Ostrea edulis* (L.). *Heredity* 63: 395-372.
- AVISE, J. C., 1994 *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York.
- BEATTIE J. H., J. PERDUE, W. HERSHBERGER, K. CHEW, 1987 Effect of inbreeding on growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: *J. Shell. Research* 6: 25-28.
- BEAUMONT, A. R., 1991 Genetic studies of laboratory reared mussels, *Mytilus edulis*: heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biol. J. Linn. Soc.* 44: 273-285.
- BEAUMONT, A. R. and A. K. M. ABDUL-MATIN, 1994 Differences in morphology, survival and size between self and cross fertilized larvae of *Mytilus galloprovincialis*: *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 74: 445-448.
- BEAUMONT, A. R., C. M. BEVERIDGE and M. D. BUDD, 1983 Selection and heterozygosity within single families of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Mar. Biol.* 4: 151-161.
- BLANC, F. and F. BONHOMME, 1986 A genetic bases of species improvements in aquaculture: polymorphisme génétique des populations naturelles de mollusques d'intérêt aquicole, pp. 59-78 in *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, Vol I. H. Heenemann GmbH and Co., Berlin.
- CHARLESWORTH, D., 1991 The apparent selection on neutral marker loci in partially inbreeding populations. *Genet. Res.* 57: 159-175.
- CORTE-REAL, H. B. S. M., P. H. W. HOLLAND and D. R. DIXON, 1994 Inheritance of a nuclear DNA polymorphism assayed in single bivalve larvae. *Mar. Biol.* 120: 415-420.
- DAVID, P., B. DELAY, P. BERTHOU and P. JARNE, 1995 Alternative Models for Allozyme-Associated Heterosis in the Marine Bivalve *Spisula ovalis* *Genetics* 139: 1719-1726.
- DAVID, P., P. BERTHOU, P. NOEL and P. JARNE, 1997a Spatially structured recruitment and population dynamics in a marine bivalve: *Spisula ovalis*. *Oecologia*, in press.
- DAVID, P., M.-A. PERDIEU, A.-F. PERNOD and P. JARNE, 1997b Fined grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution*, in press.
- FOLTZ, D. W., 1986 Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution* 40: 869-70.
- FOLTZ, D. W. and M. CHATRY, 1986 Genetic heterozygosity and growth rate in the Louisiana oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture* 33: 157-165.

- FOLTZ D. W. and Y. P. HU, 1996 Genetics of scnDNA polymorphism in juvenile oysters (*Crassostrea virginica*). Part II: Heterozygote deficiency and gametic disequilibrium in natural population samples. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **5**(2): 130-137.
- FU, Y. B. and K. RITLAND, 1996 Marker-based inferences about epistasis for genes influencing inbreeding depression. *Genetics* **144**(1): 339-348.
- GAFFNEY, P. M., 1990 Enzyme heterozygosity, growth rate and viability in *Mytilus edulis*: Another look. *Evolution* **44**(1): 204-210.
- GAFFNEY, P. M., 1994 Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: More light? pp. 146-153 in *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, edited By A.R. BEAUMONT. Chapman & Hall, London.
- GAFFNEY, P. M. and T. M. SCOTT, 1984 Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery populations of bivalves. *Aquaculture* **57**: 261-269.
- GAFFNEY, P. M., T. M. SCOTT, R. K. KOEHN and W. J. DIEHL, 1990 Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* **124**: 687-699.
- GUO, X. and S. K. ALLEN Jr, 1996 Complete interference and nonrandom distribution of meiotic crossover in a mollusc, *Mulinia lateralis* (Say). *Biol. Bull.* **191**: 145-148.
- HARE, M. P., S. A. KARL and J. C. AVISE, 1996 Anonymous nuclear DNA markers in the American oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 334-345.
- HAWKINS, A. J. S., B. L. BAYNE, A. J. DAY, J. RUSIN and C. M. WORRAL, 1989 Genotype-dependant interrelations between energy metabolism, protein metabolism and fitness, pp. 283-292 in *Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms*, edited by J.S. RYLAND and P.A. TYLER, Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark.
- HEDGECOCK, D., 1994 Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? Pp. 122-134 in *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, edited By A.R. BEAUMONT. Chapman & Hall, London.
- HEDGECOCK, D., D. J. MCGOLDRICK, D. T. ANAHAN, J. VAVRA, N. APPELMANS *et al.*, 1996. Quantitative and molecular genetic analysis of heterosis in bivalve molluscs, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **203**: 49-59.
- HU, Y.-P. and D. W. FOLTZ, 1996 Genetics of scnDNA polymorphisms in juvenile oysters, *Crassostrea virginica*: characterizing the inheritance of polymorphisms in controlled crosses. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**(2): 123-129.

- HU, Y.-P., R. A. LUTZ and R. C. VRIJENHOEK, 1992 Electrophoretic identification and genetic analysis of bivalve larvae. *Mar. Biol.* **113**: 227-230
- IBARRA, A. M., P. CRUZ and B. A. ROMERO, 1995 Effect of inbreeding on growth and survival of self fertilized catarina scallop larvae, *Argopecten circularis*. *Aquaculture* **134**: 37-47.
- KATOH, M. and D. W. FOLTZ, 1988 Determination of null allele frequency at an allozyme locus in a natural oyster population. *J. Shellfish. Res.* **7**: 203.
- KOEHN, R. K. and P. M. GAFFNEY, 1984 Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **82**: 1-7.
- KOEHN, R. K. and S. E. SHUMWAY, 1982 A genetic/physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Mar. Biol. Letters* **3**: 35-42
- KOEHN, R. K., W. J. DIEHL and T. M. SCOTT, 1988 The differential contribution by individual loci of glycolysis and protein metabolism to the relationship between heterozygosity and growth in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* **118**: 121-130.
- LONGWELL, A. C. and S. S. STILES, 1973 Gamete cross incompatibility and inbreeding in the commercial American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Cytologia* **38**: 521-533.
- LANNAN, J. E., 1980 Broodstock management of *Crassostrea gigas*. IV. Inbreeding and larval survival. *Aquaculture* **21**: 353-356.
- MALLET A. L. and L. E. HALEY, 1983 Effect of inbreeding on larval and spat performance in the American oyster. *Aquaculture* **33**: 229-235.
- MALLET, A. L., E. ZOUROS, K. E. GARTNER-KEPKAY, K. R. FREEMAN and L. M. DICKLE, 1985 Larval viability and heterozygote deficiency in populations of marine bivalves: evidence from pair matings of mussels. *Mar. Biol.* **87**: 165-172.
- MALLET, A. L., E. ZOUROS, K. E. GARTNER-KEPKAY and K. R. FREEMAN, 1986 Genetics of growth in blue mussels: family and enzyme-heterozygosity effects. *Mar. Biol.* **92**: 475-482.
- MCGOLDRICK, D.J. and D. HEDGECOCK, 1997. Fixation, segregation and linkage of allozyme loci in inbred families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): implication for the causes of inbreeding depression. *Genetics* **146**: 321-334.
- MITTON, J. B., 1993 Theory and data pertinent to the relationship between heterozygosity and fitness pp. 17-41 in *The natural history of inbreeding and outbreeding - theoretical and empirical perspectives*, edited by N.W. THORNHILL, University of Chicago Press, Chicago.
- NACIRI, Y., Y. VIGOUROUX, J. DALLAS, E. DESMARAIS, C. DELSERT *et al.*, 1995 Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) *Mol.*

- Mar. Biol. Biotechnol. 4(1): 83-89.
- OHTA, T., 1971 Associative overdominance caused by linked detrimental mutations. Genet. Res. **18**: 277-286.
- PETERMAN, R. M. and M. J. BRADFORD, 1987 Wind speed and mortality rate of a marine fish, the northern anchovy (*Engraulis mordax*). Science **235**: 354-356.
- POGSON, G. H. and E. ZOUROS, 1994 Allozyme and RFLP Heterozygosities as correlates of growth rate in the Scallop *Placopecten magellanicus*: A test of the Associative Overdominance Hypothesis. Genetics **137**: 221-231.
- ROUGHGARDEN, J., S. GAINES and H. POSSINGHAM, 1988 Recruitment Dynamics in complex Life Cycles. Science **241**: 1460-1466.
- RUMBALL, W., I. R. FRANKLIN, R. FRANKHAM and B. L. SHELDON, 1994 Decline in heterozygosity under full-sib and double first-cousin inbreeding in *Drosophila melanogaster*. Genetics **136**(3): 1039-1049.
- SINGER-SAM, J., R. L. TANGUAY and A. D. RIGGS, 1989 Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. Amplifications: a Forum for PCR Users. Issue 3 (September): 11.
- SINGH, S. M. and R. H. GREEN, 1984 Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. Malacologia **25**: 569-581.
- SOKAL, R. R. and F. J. ROHLF, 1996. Biometry (Third edition). Freeman and Co, New-York. 850 pp.
- SLATKIN, M., 1995 Hitchhiking and associative overdominance at a microsatellite locus. Mol. Biol. Evol. **12**(3): 473-480.
- STRAUSS, S. H., 1986 Heterosis at allozyme loci under inbreeding and crossbreeding in *Pinus Attenuata*. Genetics **113**: 115-134.
- STROBECK, C., 1979 Partial selfing and linkage: the effect of a heterotic locus on a neutral locus. Genetics **92**: 305-315.
- WEBER, J. L. and P. E. MAY, 1989 Abundant class of human DNA polymorphisms which can typed using the polymerase chain reaction. Am. Nat. **104**: 355-365.
- ZOUROS, E., 1993 Associative overdominance: evaluating the effects of inbreeding and linkage disequilibrium. Genetica **89**: 35-46.
- ZOUROS, E. and D. W. FOLTZ, 1984 Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. Malacologia **25**(2): 583-591.
- ZOUROS, E. and G.H. POGSON, 1994 Heterozygosity, heterosis and adaptation. Pp. 135-146 in *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, Edited By A.R. BEAUMONT, Chapman & Hall, London.

- ZOUROS, E., S.M. SINGH and H.E. MILES, 1980 Growth rate in oysters: an overdominant phenotype and his possible explanations. *Evolution* **42**: 1332-1334.
- ZOUROS, E., S.M. SINGH, D.W. FOLTZ and A.L. MALLET, 1983 Post settlement viability in the American oyster (*Crassostrea virginica*): an overdominant phenotype. *Genet. Res. Camb.* **41**: 259-270.

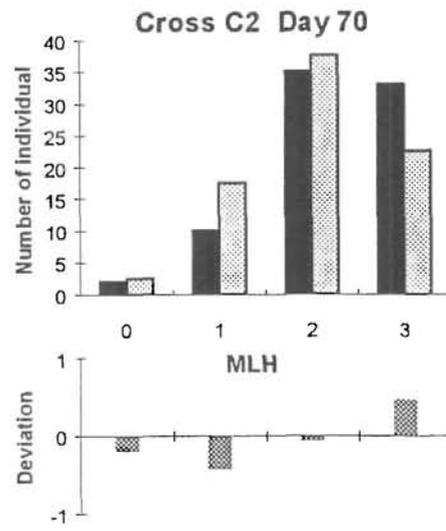
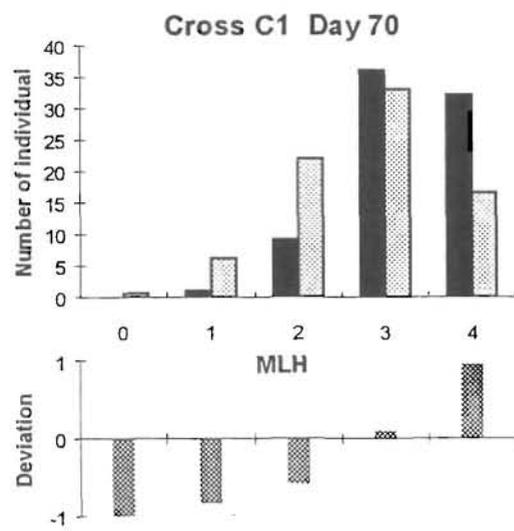
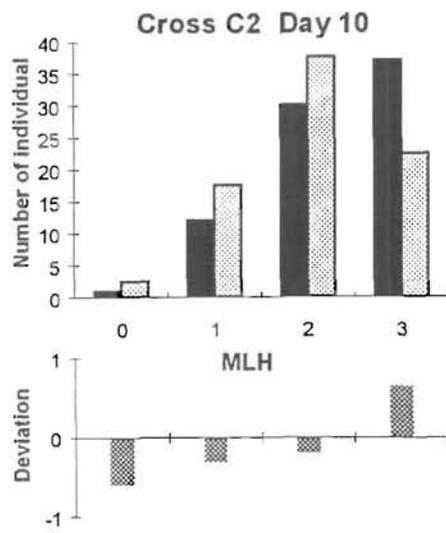
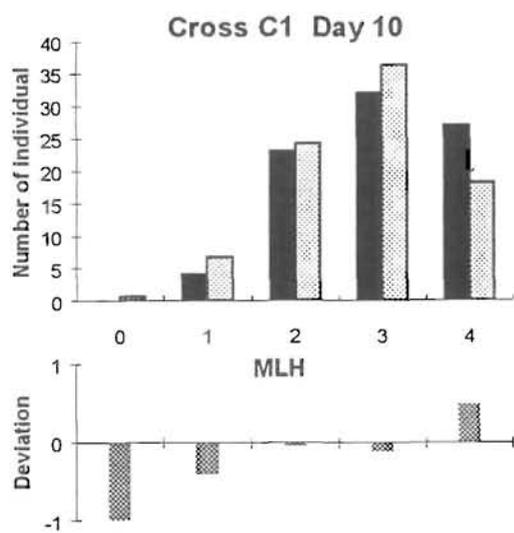
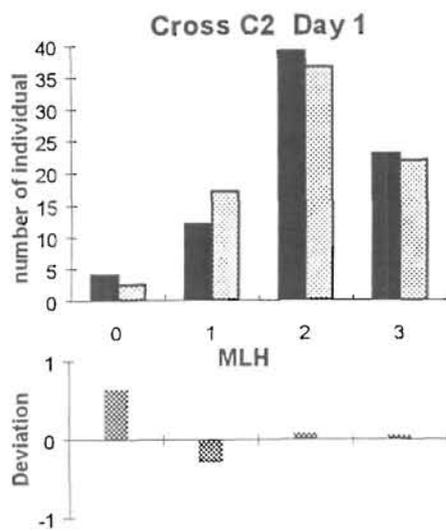
FIGURE LEGENDS

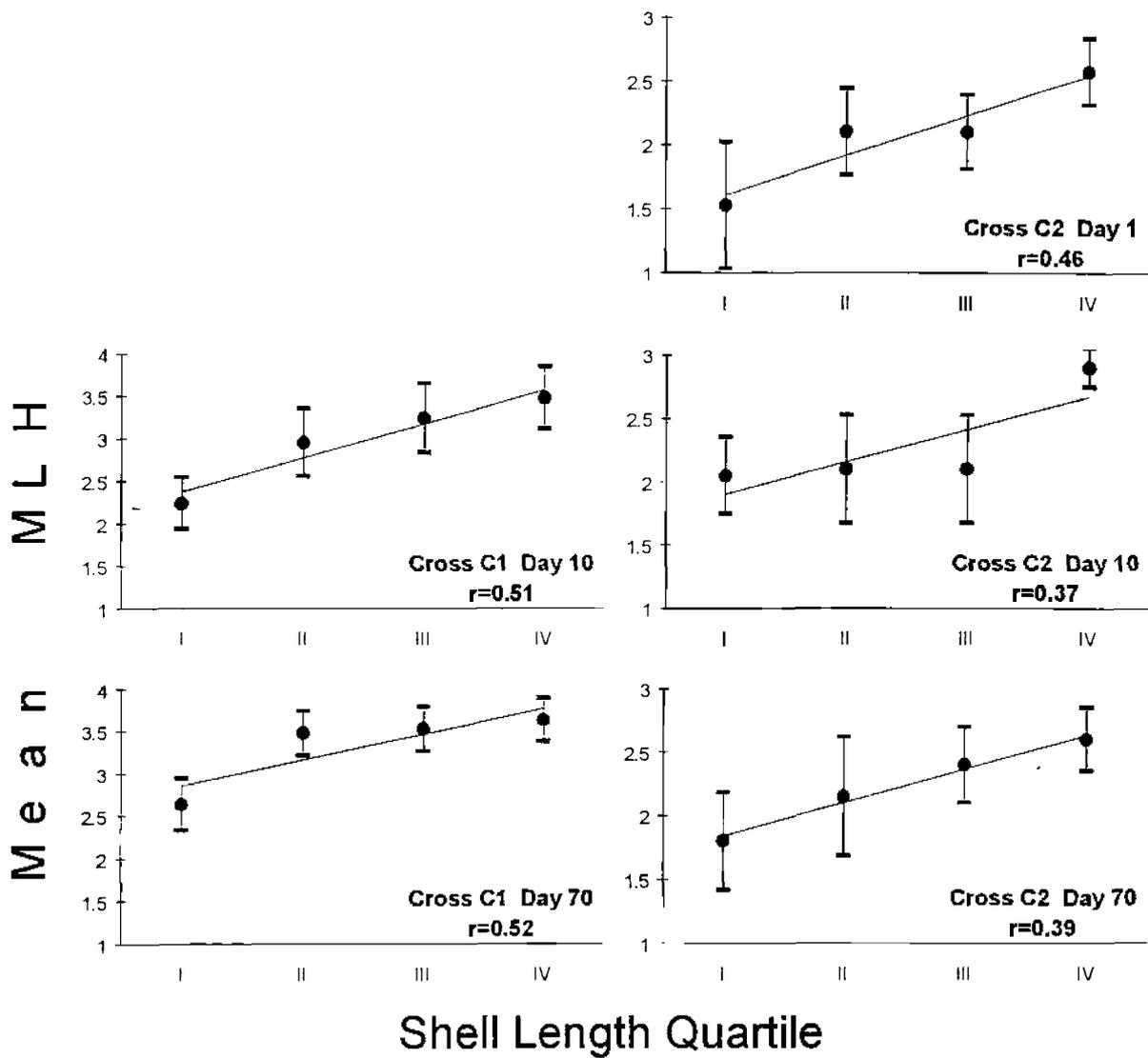
Figure 1: *Ostrea edulis*. Observed (in dark) and expected (in light) multi-locus heterozygosity distributions (MLH = number of heterozygous loci per individual) for Cross C1 and C2 at Day 1, Day 10 and Day 70 after spawning. Deviations, corresponding to $(\text{observed heterozygosity} - \text{expected heterozygosity}) / \text{expected heterozygosity}$, are presented under each distribution.

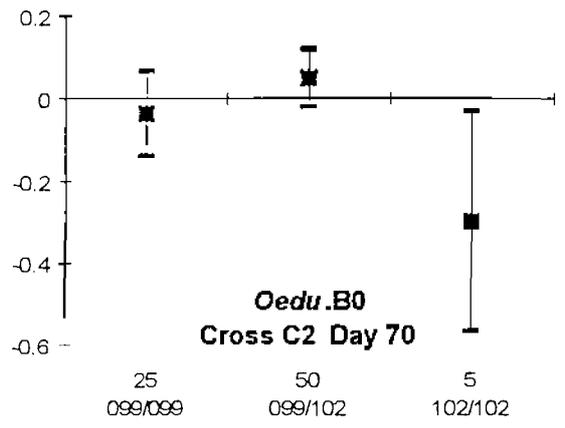
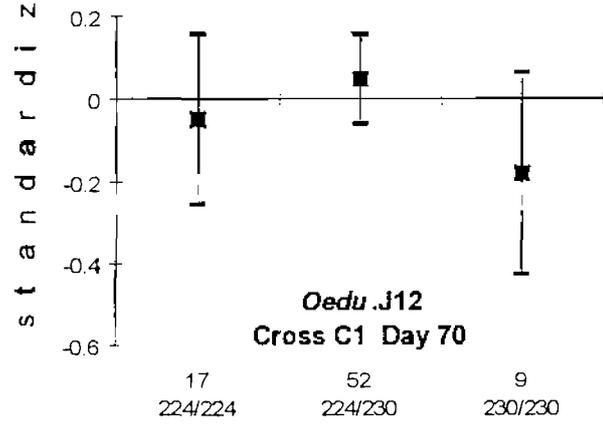
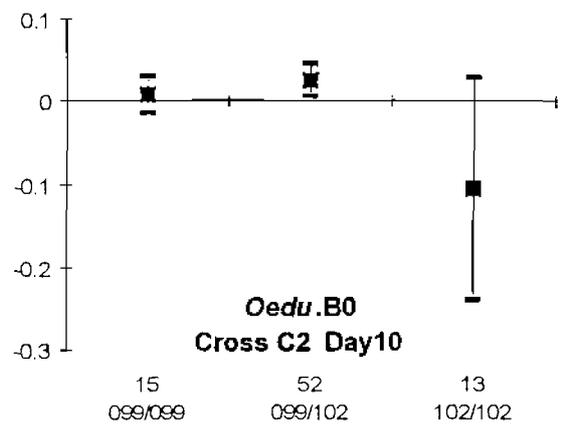
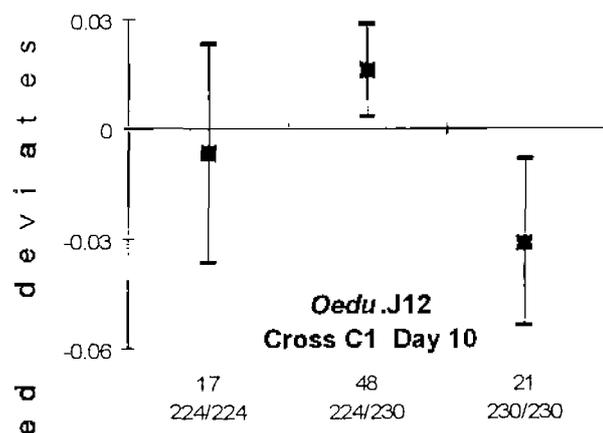
Figure 2: *Ostrea edulis*. Mean heterozygosity (number of loci heterozygous, 95% C.I.), in size quartiles for Cross C1 and C2 at Day 1, Day 10 and Day 70 after spawning. Linear tendency curves are plotted on data and r values are moment-product correlations. NS $P > 0.05$, * $0.01 < P < 0.05$, ** $0.001 < P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3: *Ostrea edulis*. Standardized deviates (95% C.I.) for type 1 segregation (one heterozygous and two homozygous genotypes in the progeny) for Cross C1 and C2 at Day 10 and Day 70, using *Oedu.B0* or *Oedu.J12* microsatellite markers. The genotypes and the number of individuals per genotype are indicated at the bottom of each graph.

Figure 4: Allele frequencies for *Oedu.B0* and *Oedu.J12* in a natural population of *Ostrea edulis* from the Quiberon Bay (Brittany Atlantic coast, France).







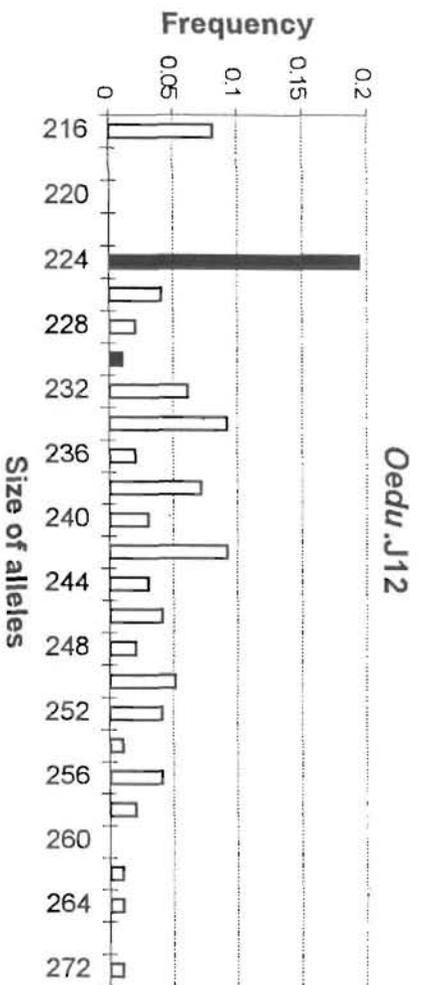
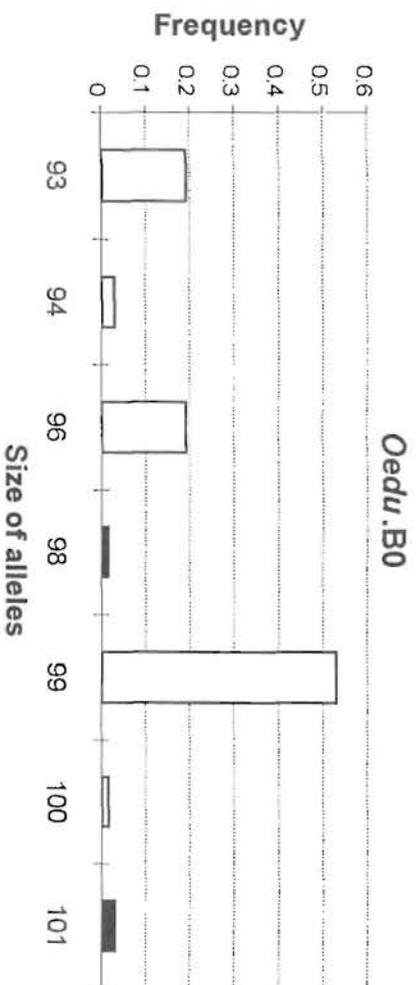


TABLE 1 : Segregation statistics for cross C1

TABLE 1a : Analysis of genotypic proportions.

Loci	Progeny genotypes	Day 10 (N=86)		Day 70 (N=78)		Global analyses	
		Genotype frequencies	G test	Genotype frequencies	G test	Temporal heterogeneity	Pooled test
<i>Oedu.O9</i>	<i>158/158</i>	0.198		0.115			
	<i>158/160</i>	0.221	G=3.122	0.256	G=10.468	Gh=2.16	Gp=11.43
	<i>168/158</i>	0.325	NS	0.359	P=0.015	NS	P=0.0096
	<i>168/160</i>	0.256		0.270			
<i>Oedu.B0</i>	<i>098/098</i>	0.198		0.154			
	<i>098/101</i>	0.244	G=1.671	0.192	G=7.859	Gh=1.584	Gp=7.946
	<i>096/098</i>	0.267	NS	0.321	P=0.049	NS	P=0.0471
	<i>096/101</i>	0.291		0.333			
<i>Oedu.T5</i>	<i>124/124</i>	0.198		0.128			
	<i>124/128</i>	0.139	G=11.013	0.308	G=7.316	Gh=7.35	Gp=10.979
	<i>106/124</i>	0.372	P=0.0117	0.295	NS	NS	P=0.0118
	<i>106/128</i>	0.291		0.269			
<i>Oedu.J12</i>	<i>224/224</i>	0.198	G=1.587	0.218	G=11.337	Gh=4.707	Gp=8.217
	<i>230/230</i>	0.244	NS	0.115	P=0.0034	NS	P=0.0164
	<i>224/230</i>	0.558		0.667			

N: number of individuals analyzed; G: G-Test for goodness-of-fit; Gh: heterogeneity G-test; Gp: pooled G-test; P: probability to accept the null hypothesis (type-error I); NS: not significant at $\alpha = 0.05$; probabilities in bold are significant at the experiment-wise level $\alpha = 0.00625$ for genotype frequencies at Day 10 and Day 70 and $\alpha = 0.0125$ for global analyses.

TABLE 1b : Analysis of allelic proportions for type 2 crosses

Loci	Parent P1				Parent P2			
	Day 10 (N=86)	Day 70 (N=78)	Temporal heterogeneity	Pooled test	Day 10 (N=86)	Day 70 (N=78)	Temporal heterogeneity	Pooled test
<i>Oedu.O9</i>	<i>158/168</i>				<i>158/160</i>			
	0.16	0.26	Gh=0.375	Gp=7.1	0.05	0.05	Gh=0.391	Gp=0
	G=2.289 NS	G=5.186 P=0.0228	NS	P=0.0077	G=0.186 NS	G=0.205 NS	NS	NS
<i>Oedu.B0</i>	<i>096/098</i>				<i>098/101</i>			
	0.12	0.31	Gh=1.571	Gp=7.1	0.07	0.05	Gh=0.624	Gp=0.610
	G=1.165 NS	G=7.506 P=0.0062	NS	P=0.0077	G=0.419 NS	G=0.205 NS	NS	NS
<i>Oedu.T5</i>	<i>106/124</i>				<i>124/128</i>			
	0.33	0.13	Gh=1.689	Gp=8.885	0.14	0.15	Gh=3.534	Gp=0
	G=9.285 P=0.0023	G=1.289 NS	NS	P=0.0029	G=1.68 NS	G=1.854 NS	NS	NS

N: number of individuals analyzed; G: G-Test for goodness-of-fit; Gh: heterogeneity G-test; Gp: pooled G-test; P: probability to accept the null hypothesis (type-error I); NS: not significant at $\alpha = 5\%$; probabilities in bold are significant at the experiment-wise level of $\alpha = 0.0083$ for genotype frequencies at Day 10 and Day 70 and $\alpha = 0.0167$ for global analyses.

TABLE 2 : Segregation statistics for cross C2

TABLE 2a : Analysis of genotypic proportions.

Loci	Progeny genotypes	Day 1 (N=78)		Day 10 (N=80)		Day 70 (N=80)		Global analyse	
		Genotype frequencies	G test	Genotype frequencies	G test	Genotype frequencies	G test	Temporal heterogeneity	Pooled test
<i>Oedu.O9</i>	168/168	0.192		0.112		0.125			
	168/158	0.295	G=2.149	0.325	G=10.427	0.275	G=9.173	Gh=2.946	G=18.803
	150/168	0.282	NS	0.313	p=0.0153	0.350	p=0.0271	NS	p=0.0003
	150/158	0.231		0.250		0.250			
<i>Oedu.B0</i>	098/098	0.295	G=1.876	0.187	G=7.455	0.312	G=19.609	Gh=19.445	
	101/101	0.282	NS	0.163	p=0.0241	0.063	p=5.510 ⁻⁵	p=0.0006	--
	098/101	0.423		0.65		0.625			
<i>Oedu.T5</i>	124/124	0.192		0.250		0.262			
	124/128	0.282	G=2.149	0.313	G=2.067	0.188	G=2.627	Gh=6.388	G=0.455
	106/124	0.231	NS	0.237	NS	0.313	NS	NS	NS
	106/128	0.295		0.200		0.237			
<i>Oedu.J12</i>	224/230			0.350		0.275			
	224/246	-	-	0.225	G=5.898	0.212	G=2.685	Gh=2.283	G=3.3
	232/230			0.262	NS	0.200	NS	NS	NS
	232/246			0.163		0.313			

N: number of individuals analyzed; G: G-Test for goodness-of-fit; Gh: heterogeneity G-test; Gp: pooled G-test; probability to accept the null hypothesis (type-error I); NS: not significant at $\alpha = 5\%$; probabilities in bold are significant at the experiment-wise level of $\alpha = 0.00045$ for genotype frequencies at Day 1, Day 10 and Day 70 and $\alpha = 0.0125$ for heterogeneity tests and $\alpha = 0.0167$ for global tests; - non available data; -- test not possible.

TABLE 2b : Analyses of allelic proportions for type 2 crosses.

Loci	Parent P1					Parent P2				
	Day 1 (N=78)	Day 10 (N=80)	Day 70 (N=80)	Temporal heterogeneity	Pooled test	Day 1 (N=78)	Day 10 (N=80)	Day 70 (N=80)	Temporal heterogeneity	Pooled test
<i>Oedu.O9</i>	<i>168/150</i>					<i>168/158</i>				
	0.02	0.12	0.2	Gh=1.224	Gp=3.302	0.05	0.15	0.05	Gh=0.529	Gp=1.683
	G=0.051 NS	G=1.253 NS	G=3.222 NS	NS	NS	G=0.205 NS	G=1.807 NS	G=0.2 NS	NS	NS
<i>Oedu.T5</i>	<i>124/106</i>					<i>124/128</i>				
	0.05	0.12	0.1	Gh=2.242	Gp=0.017	0.15	0.02	0.15	Gh=3.694	Gp=0.017
	G=0.205 NS	G=1.253 NS	G=0.801 NS	NS	NS	G=1.854 NS	G=0.05 NS	G=1.807 NS	NS	NS
<i>Oedu.J12</i>	<i>224/232</i>					<i>230/246</i>				
	-	0.15	0.02	Gh=1.232	Gp=0.625	-	0.23	0.05	Gh=3.058	Gp=1.227
	-	G=1.807 NS	G=0.05 NS	NS	NS	-	G=4.085 p=0.0433	G=0.2 NS	NS	NS

N: number of individuals analyzed; G: G-Test for goodness-of-fit; Gh: heterogeneity G-test; Gp: pooled G-test; probability to accept the null hypothesis (type-error I); NS: not significant at $\alpha = 5\%$; probabilities in bold are significant at the experiment-wise level of $\alpha = 0.00625$ for genotype frequencies at Day 1, Day 10 and Day 70 and $\alpha = 0.0167$ for global tests; - non available data.

TABLE 3 : Homozygotes versus heterozygotes.

TABLE 3a : Analysis of single locus heterozygotes proportions for cross C1.

Loci	Day 10 (N=86)	Day 70 (N=78)	Temporal heterogeneity	Pooled test
<i>Oedu.O9</i>	D=0.07 G=1.322 NS	D=0.179 G=8.864 p=0.0029	Gh=2.112 NS	Gp=8.074 p=0.0045
<i>Oedu.B0</i>	D=0.07 G=1.322 NS	D=0.128 G=4.271 p=0.0388	Gh=0.543 NS	Gp=5.05 p=0.0246
<i>Oedu.T5</i>	D=0.07 G=1.322 NS	D=0.162 G=7.109 p=0.0077	Gh=1.452 NS	Gp=6.979 p=0.0082
<i>Oedu.J12</i>	D=0.116 G=1.165 NS	D=0.333 G=8.835 p=0.003	Gh=2.033 NS	Gp=7.967 p=0.0048

N: number of individuals analyzed; D: (number of observed heterozygotes)/(number of expected heterozygotes) - 1; G: G-Test for goodness-of-fit; Gh: heterogeneity G-test; Gp: pooled G-test; probability to accept the null hypothesis (type-error I); NS: not significant at $\alpha = 5\%$; probabilities in bold are significant at the experiment-wise level of $\alpha = 0.00625$ for genotype frequencies at Day 10 and Day 70 and $\alpha = 0.0125$ for global tests; - non available data.

TABLE 3b : Analysis of single locus heterozygotes proportions for cross C2.

Loci	Day 1 (N=78)	Day 10 (N=80)	Day 70 (N=80)	Temporal heterogeneity	Pooled test
<i>Oedu.O9</i>	D=0.077	D=0.183	D=0.167	Gh=2.288 NS	Gp=16.427 p=5.1 10-5
	G=1.467	G=9.530	G=7.718		
	NS	p=0.002	p=0.0055		
<i>Oedu.B0</i>	D=-0.154	D=0.3	D=0.25	Gh=9.903 p=0.0071	--
	G=1.854	G=7.312	G=5.053		
	NS	p=0.0068	p=0.0246		
<i>Oedu.T5</i>	D=0.077	D=0	D=-0.017	Gh=1.255 NS	Gp=0.278 NS
	G=1.4667	G=0	G=0.066		
	NS	NS	NS		

N: number of individuals analyzed; D: (number of observed heterozygotes)/(number of expected heterozygotes) - 1; G: G-Test for goodness-of-fit; Gh: heterogeneity G-test; Gp: pooled G-test; probability to accept the null hypothesis (type-error I); NS: not significant at $\alpha = 5\%$; probabilities in bold are significant at the experiment-wise level of $\alpha = 0.00556$ for genotype frequencies at Day 1, Day 10 and Day 70 and $\alpha = 0.0167$ for global tests; - -test not possible.

TABLE 4 : Growth comparison between single locus heterozygotes and homozygotes.

Loci	Day 1	Day 10	Day 70
Cross 1	-	N = 86	N = 78
<i>Oedu.O9</i>	-	d=0.090 ^{NS}	d=0.358 ^{**}
<i>Oedu.B0</i>	-	d=0.022 ^{NS}	d=0.017 ^{NS}
<i>Oedu.T5</i>	-	d=0.034 ^{**}	d=0.309 ^{**}
<i>Oedu.J12</i>	-	d=0.036 ^{***}	d=0.143 ^{NS}
Cross 2	N = 78	N = 80	N = 80
<i>Oedu.O9</i>	d=0.027 [*]	d=0.099 ^{**}	d=0.028 ^{NS}
<i>Oedu.B0</i>	d=0.006 ^{NS}	d=0.07 ^{**}	d=0.129 [*]
<i>Oedu.T5</i>	d=0.026 [*]	d=-0.003 ^{NS}	d=0.186 ^{***}

N: number of individuals analyzed; d: mean standardized growth of heterozygotes - mean standardized growth of homozygotes; significance of Fisher-statistics of analysis of variance: ^{NS}: not significant at $\alpha = 0.05$, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$.

ANNEXE B

Variable microsatellites in the European flat oyster *Ostrea edulis* and their use in other flat oyster species

S. Launey; C. Ledu & C. Delsert

Soumis à Molecular Ecology

Variable microsatellites in the European flat oyster *Ostrea edulis* (Linné) and their use in other flat oyster species

S. LAUNEY¹, C. LEDU¹ and C. DELSERT^{1,2}

¹Laboratoire Génétique et Pathologie, IFREMER, BP 133, 17390 La Tremblade, France

²Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, IFREMER URM 16, Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral, 1 Quai de la Dorade, 34200 Sète, France

Keywords : Flat oyster, *Ostrea edulis*, microsatellites, population genetics

Corresponding author : Sophie Launey
IFREMER, Laboratoire Génétique et Pathologie
BP 133
17390 LA TREMBLADE
FRANCE

Fax number : (+33) 5 46 36 37 51

e-mail : slauney@ifremer.fr

The European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) is the native oyster of the European Atlantic and the Mediterranean coasts where it has been cultivated for a long time. Its production has known a massive decline since 1970 because of two successive parasitic diseases (*Marteilia refringens* and *Bonamia ostreae*, Grizel *et al.*, 1974; Pichot *et al.*, 1979). As a result, IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) initiated a selection program for resistance to bonamiosis in 1985 (Naciri-Graven *et al.*, 1997). A search for microsatellite markers was simultaneously initiated with the aim to first, start a linkage map of *O. edulis* genome, second, test for parentage in the selected populations, and third obtain a tool for population genetic studies. Primers for three microsatellite loci were found and published so far (Naciri *et al.*, 1995) but there was still a need for further markers.

Two sub-genomic libraries were constructed from an adult oyster. For the first library, genomic DNA was digested to completion with *AluI*, *RsaI* and *HaeIII* and fragments were size-selected by agarose gel electrophoresis. The purified 400-800bp long fragments were then ligated into the *SmaI*-linearized pBluescript II KS plasmid (Stratagene). For the second library, genomic DNA was digested with *Sau3A*, size-selected as above and partially filled in with dATP and dGTP using Klenow fragment. Fragments were then ligated into *XhoI*-linearized pBluescript II KS after partial fill in of the extremities with dCTP and dTTP. This protocol was meant to reduce self-complementarity of DNA genomic fragments that would lead to chimeric inserts and to prevent self-ligating of vector termini. Recombinants were then transformed into competent DH5 α *E.Coli* cells. Approximately 7800 recombinant clones were screened for microsatellites with [α -³³P]-dATP-labelled d(AC)_n and d(AG)_n probes (Pharmacia). Plasmid DNA from positive clones was obtained by the alkaline-lysis miniprep method (Sambrook *et al.*, 1989) and double-stranded DNA was sequenced in both directions with the Pharmacia T7 Sequencing Kit according to manufacturer's recommendations.

Forty-nine positive clones were obtained, 29 of which contained at least one microsatellite repeat (2 clones contained 2 different repeats). Two of these repeats were identical although they were found on different plates. Four clones were unsuitable for PCR primer design due to insufficient flanking sequence length in the cloned fragment. Primers were designed for 7 loci using PRIMER software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) as shown in Table 1.

Allele number and heterozygosities for *Ostrea edulis* were estimated on a sample of 77 individuals (except loci *OeduG9* : 53 individuals, and *OeduT18* : 44 individuals) from a wild population of the Quiberon Bay (France).

Cross-species amplification was assayed on three other flat oyster species, *Ostrea stentina* (Payraudau), a congeneric species in the Mediterranean basin and the Europe Atlantic coast, *Ostrea densalamellosa* (Liscke), from Asian Pacific coasts and *Tiostrea chilensis* (Philippi), from Chile and also found in New Zealand under the name *T. lutaria*, (Buroker *et al.*, 1983).

DNA was extracted from a fragment of ethanol-preserved gill-tissue using Chelex® (Biorad) resin as described in Estoup *et al.* (1996). PCR reactions were performed in a 10 µl reaction mix containing 5 µl template DNA, 1.5 µM MgCl₂, 75 µM each dNTP, 0.25 µM $\gamma^{33}\text{P}$ -labelled forward primer, 0.4 µM reverse primer, 0.35 units of Goldstar Licensed Polymerase (Eurogentec) and 1X polymerase buffer (supplied by the manufacturer). Amplifications were run in a PTC-100 Thermocycler (MJ-Research) according to the following program: pre-denaturation (94°C-2 minutes) followed by 30 cycles of denaturation-annealing-polymerisation (94°C-1 min, Ta-1 min, 72°C-1 min 15 s) and a final elongation step (72°C-5 min). Ta is the primer's optimal annealing temperature and is given in Table 1. PCR products were analyzed on 7M Urea, 6% polyacrylamide gel using the product of amplification of the original clone as a size marker.

These 7 microsatellite loci revealed a high genetic variability in the wild population of *Ostrea edulis* (see Table 1), with the number of allele ranging from 14 (*OeduH15*) to 29 (*OeduU2* and *OeduG9*). The mean expected heterozygosity was also very high with a mean value of 0.928 ± 0.038 . This high level of polymorphism confirms the importance of microsatellite loci as a tool for selective breeding programs in *Ostrea edulis*, for parentage assessment or individual identification of selected progenitors. We hope to assess precise genealogies of families under selection with a limited number of loci. Since *Ostrea edulis* genome contains $2N=20$ chromosomes, we expect to find linkage groups even with a limited number of loci. These markers are currently being used in population genetic studies, particularly for investigating the early phases of the life cycle, when animals are too small to be analyzed with traditional genetic markers such as allozymes (Bierne *et al.*, in press).

Cross-species amplifications results are given in Table 2. They were successful only in *T. chilensis* for three sets of primers. Two of them, namely *OeduT5* and *OeduT18*, showed slightly higher allele length for *T. chilensis* than for *O. edulis*. For *OeduJ12*, the alleles in *T. chilensis* have a one-bp shift when compared to *O. edulis*. This may be due to mutations in the flanking sequences but will need further allele sequencing to be elucidated. Amplifications were unsuccessful in both *O. stentina* and *O. densalamellosa*.

In addition, our data show that some of these markers could be useful for studying *Tiostrea chilensis*, another flat oyster of commercial interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank A. Gérard and F. Bonhomme for scientific and material supervision, A.G. Martin and P. Boudry for helping in the collection of samples and Y. Naciri-Graven for helpful comments on the manuscript. This work has been supported by a fund of Poitou-Charentes Region to S.L. and financial support from IFREMER-URM 16.

REFERENCES

- Bierne N, Launey S, Naciri-Graven Y, Bonhomme F (1998). Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, in press.
- Buroker NE, Chanley P, Cranfield HJ, Dinamani P (1983). Systematic status of two oyster populations from New Zealand and Chile. *Marine Biology*, 77, 191-200.
- Estoup A, Largiader CD, Perrot E, Chourrout D (1996). Rapid one-tube extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5, 295-598
- Grizel H, Comps M, Bonami JR, Cousserans F, Duthoit JL, Le Pennec MA (1974). Recherches sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Science et Pêches*, 240, 7-30.
- Naciri Y, Vigouroux Y, Dallas J, Desmarais E, Delsert C, Bonhomme F (1995). Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4, 83-89.
- Naciri-Graven Y, Martin AG, Baud JP, Renault T, Gérard A (1997). Selecting flat oyster *Ostrea edulis* for survival against the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, in press.
- Pichot Y, Comps M, Tigé G, Grizel H, Rabouin MA, 1979. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n. sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis*. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 43, 131-140.
- Sambrook JJ, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New-York.

Table 1 Microsatellite loci in the European flat oyster *Ostrea edulis*. T_a is the optimal annealing temperature, H_e is the expected heterozygosity. Sample size is 77 for all loci except for locus *OeduG9* (53) and *OeduT18* (44)

Locus	Repeat motif	Size range of PCR product	T _a (°C)	Alleles Number	H _e	Primer sequences ²
<i>OeduG9</i>	(AT) ₄ (GT) ₃₅	197-279	50°C	29	0.943	
<i>OeduH15</i>	(ATCT) _n ¹	165-225	50°C	14	0.883	
<i>OeduJ12</i>	(GT) ₁₄	216-272	50°C	24	0.931	
<i>OeduO9</i>	(GA) ₃₆	140-176	53°C	18	0.916	
<i>OeduU2</i>	(AC) ₂₁ (AG) ₇	146-206	50°C	29	0.930	
<i>OeduT5</i>	(CA) ₁₅	106-166	55°C	23	0.893	
<i>OeduT18</i>	(CT) ₂₁	109-149	42°C	19	0.928	

¹Full sequence of the repeat : (ATCT)₄ATGT(ATCT)₂ATGTATCTATATATCTATGT(ATCT)₅A(TACC)₄AATTTTCT(ATCT)₃

²EMBL Data bank accession number :

Table 2 Cross species amplifications results for different flat oyster species : sample size and origin, number and size range of alleles.

Species	Geographical origin	Sample size	Number of alleles (size range)						
			<i>OeduH15</i>	<i>OeduG9</i>	<i>OeduJ12</i>	<i>OeduO9</i>	<i>OeduU2</i>	<i>OeduT5</i>	<i>OeduT18</i>
<i>Ostrea stentina</i>	Morocco	10	*	*	*	*	*	*	*
	South Korea	1	*	*	*	*	*	*	*
<i>Ostrea densalamellosa</i>	New Zealand	12	*	*	11 (213-251)	*	*	11 (132-174)	14 (121-161)
<i>Tiostrea chilensis</i>									

* no amplification observed

ANNEXE C

**Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates. Relations
"reproduction" et "génétique"**

**A. Gérard, Y. Naciri-Graven, P. Boudry, S. Launey, S. Heurtebise, C. Ledu
et P. Phelipot**

**In: Devauchelle N., Barret J. et Salaun G., coord., 1997. Groupe de travail sur la
reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France,
Nantes (France), IFREMER, Rapport interne DRV 97-11
RA/RST/BREST : 217 pages.**

CONTROLE DE LA GAMETOGENESE DES HUITRES CREUSES ET PLATES. RELATIONS "REPRODUCTION" ET "GENETIQUE".

A. GERARD, Y. NACIRI-GRAVEN, P. BOUDRY, S. LAUNEY, S. HEURTEBISE, C. LEDU ET P. PHELIPOT.

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie, Unité de Recherche en Génétique IFREMER, BP133 - 17390 La Tremblade. (F).

Résumé : *A la fin des années 1980, après deux décennies d'acquis zootechniques sur les mollusques, l'IFREMER engage les premières recherches dans le domaine de la génétique. Très rapidement, ces nouvelles études font ressortir les limites des connaissances zootechniques, notamment en matière de contrôle de la reproduction des huîtres. Cet exposé tente de faire une synthèse dans ce domaine.*

En particulier, il est souligné que la maîtrise zootechnique des années 80 se situait à l'échelle d'une population de reproducteurs et que la génétique réclame désormais une nouvelle zootechnie, permettant non plus de travailler sur des populations mais sur des individus préalablement identifiés. Cette maîtrise individuelle du contrôle de la reproduction chez les huîtres, pose des questions totalement nouvelles auxquelles ne répondent pas les protocoles existants en matière de contrôle du sexe, de maturation individuelle, de synchronisme des pontes, d'échanges chimiques entre géniteurs...

Un inventaire des potentialités aquacoles de diverses espèces de mollusques bivalves a été réalisé dans les années 70 à 90. Ce travail a été conduit à partir d'un matériel sauvage sur lequel les connaissances de base étaient rudimentaires. A la fin des années 1980, fort de ces acquis zootechniques, l'IFREMER a engagé les premières recherches disciplinaires dans divers domaines, dont la génétique des mollusques.

Ce document, illustré par des exemples empruntés aux expérimentations génétiques, tente de faire ressortir les limites de nos connaissances en matière de contrôle de la reproduction des huîtres. Il décrit les stratégies mises en place par l'équipe de génétique pour compenser ces carences, et, énonce nos besoins en matière de recherche sur la physiologie de la reproduction.

1. LES ACQUIS ZOOTECHNIQUES

C'est à partir d'élevages, réalisés souvent de façon empirique, que durant les années 70 et 80, les bases zootechniques de la reproduction artificielle des bivalves marins ont été établies. Ces travaux ont permis de maîtriser, plus ou moins complètement, certaines phases du développement du mollusque (maturation en toute saison, induction de la ponte, élevages larvaire et post-larvaire, métamorphose et prégrossissement) et son alimentation à base d'algues phytoplanctoniques. Ces productions de masse, réalisées principalement sur la palourde du pacifique *Ruditapes philippinarum* et sur la coquille St-Jacques *Pecten maximus*, présentaient une variabilité importante en termes de croissance et de survie. Ces études ont néanmoins entraîné un essor d'écloseries et de nurseries privées sur la palourde.

A la fin des années 1980, suite à la maladie de l'anneau brun et aux problèmes économiques liés au développement de la palourde du Pacifique dans le milieu naturel, la filière éclosion s'est reconvertie dans la production d'huîtres. A la même période, les premiers travaux de génétique

ont fait ressortir les limites de nos connaissances en matière de contrôle de la reproduction des huîtres. Nous avons rencontré les mêmes difficultés zootechniques que les éclosiers privés dans la conduite de nos élevages (blocage de la croissance larvaire avant le stade umboné), auxquelles se sont ajoutés des problèmes plus spécifiques liés à la problématique génétique. Contrairement au mandat défini dans les cahiers d'objectifs du département Ressources Aquacoles, l'équipe de génétique s'est retrouvée dans l'obligation de mener une recherche zootechnique d'accompagnement aux programmes et de soutien à la profession.

Trois raisons principales peuvent expliquer cette situation :

- il n'y avait en réalité que peu d'acquis au niveau de l'Institut dans le domaine de l'élevage contrôlé des huîtres, les rares travaux en matière d'élevage contrôlé que l'on puisse citer, sont ceux de His et Robert (1987), Robert *et al.* (1989) sur *Crassostrea gigas*;
- nos acquis zootechniques en matière de maîtrise de la reproduction se situent à l'échelle d'une population de reproducteurs. Pour une éclosierie de production, la ponte en masse de géniteurs est suffisante pour assurer la production de naissain. Les besoins de la recherche sont tout autres, la génétique impose un travail sur des individus préalablement identifiés, ce qui suppose une maîtrise de la reproduction à l'échelle de l'individu;
- le choix dans les années 80, d'un modèle biologique (*Pecten maximus*) qui a absorbé l'essentiel des efforts de recherche en matière de physiologie de la reproduction et de la nutrition pendant une dizaine d'années. Pourtant la grande diversité des sexualités et des stratégies de reproduction rencontrée chez les mollusques bivalves, aurait dû fort logiquement aller à l'encontre d'un tel choix exclusif.

2. SEXUALITE ET DETERMINISME DU SEXE

2.1. Etat des connaissances

Les bivalves n'ont pas de chromosomes sexuels, ils possèdent potentiellement les deux sexes. Cette bipotentialité se traduit par l'existence d'un hermaphrodisme juvénile, certaines espèces s'orientent ensuite vers un gonochorisme (Mytilidés, Vénéridés, Cardidés, Solénidés), et d'autres, comme les huîtres, présentent diverses formes d'hermaphrodisme (Lubet, 1991).

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Ostréidé ovipare) présente un **hermaphrodisme asynchrone**, correspondant à des maturations déphasées des lignées mâle et femelle, et une **sexualité alternative** (gonochorisme apparent masquant un hermaphrodisme alternatif) entraînant un possible changement de sexe chaque année. L'huître plate *Ostrea edulis* (Ostréidé larvipare) présente également un **hermaphrodisme asynchrone** mais avec une **sexualité consécutive rythmique**, plusieurs inversions sexuelles pouvant se dérouler au cours d'une même saison de reproduction (Marteil, 1976). La tendance à la protandrie est de règle chez les deux espèces au début de leur activité sexuelle.

Les mécanismes physiologiques contrôlant le déterminisme des changements de sexe sont encore mal connus, comme le sont les facteurs externes pouvant les déclencher (température, nutrition). On ne connaît pas l'évolution du sexe des individus d'une même population élevée en milieu contrôlé et en milieu ouvert. Il n'existe actuellement pas de techniques de maturation permettant d'orienter les lignées germinales vers un sexe donné.

2.2. Stratégies mises en place

En l'absence de données précises sur le contrôle du sexe, diverses méthodologies ont été adoptées ou mises au point par l'équipe de génétique afin de pouvoir réaliser ses programmes.

2.2.1. Programmes nécessitant une maîtrise à l'échelle de la population

Comme nous le détaillerons plus loin, pour les *Crassostrea*, nous avons très vite abandonné les chocs thermiques pour induire les pontes, au profit d'une technique développée outre-Atlantique, le "stripping" (Allen *et al.*, 1989). Un des avantages de cette technique est de pouvoir sexer et trier les huîtres par observation des gamètes au microscope avant d'entamer les expérimentations. En cas de déficit en huîtres mâles, une recherche systématique est effectuée parmi les plus petits individus (protandrie). En cas de déficit en femelles (100% de mâles dans une population de *Crassostrea rivularis* par exemple cette année), il n'y a actuellement pas de solution.

Pour *Ostrea edulis*, il n'y a actuellement pas de réelle possibilité de sexage, les pontes sont généralement réalisées en masse dans le bac de maturation, sans contrôle effectif des individus qui participent à la ponte. L'emploi de la sérotonine comme inducteur de ponte, permet en partie de contourner cette difficulté, mais seuls les mâles répondent à cette stimulation.

2.2.2. Programmes nécessitant une maîtrise à l'échelle de l'individu

Le sexage peut être réalisé pendant la période de maturation par anesthésie au chlorure de magnésium et biopsie de la gonade chez *Crassostrea gigas*, mais il n'y a pas de solution en cas de déséquilibre de la sex-ratio puisqu'il n'existe pas de technique permettant d'orienter les lignées germinales vers un sexe donné.

Chez *Ostrea edulis*, dans le cadre du programme de sélection de souches résistantes ou tolérantes à la bonamiose, les croisements sont réalisés sur des huîtres préalablement identifiées. Pour contourner les difficultés liées à l'espèce (larvipare, sexage difficile car les lignées mâles et femelles coexistent généralement à l'intérieur de la gonade, induction individuelle de la ponte non maîtrisée), un dispositif de maturation dénommé HLM ("Habitation à Logettes de Maturation") a été mis au point.

Ce dispositif, qui comprend 100 aquariums de 20 litres et un nombre identique de tamis pour récupérer les larves, repose sur un principe simple : en associant deux huîtres dans un aquarium, on a théoriquement une chance sur deux d'avoir un couple mâle-femelle. Plus de cent croisements, issus de parents bien identifiés, ont ainsi été obtenus en 1995. Un résultat particulièrement intéressant a par ailleurs été noté. Si l'on excepte les croisements qui n'ont pas abouti pour cause de mortalité d'une des deux huîtres, 153 types de croisements biparentaux ont été tentés qui auraient dû théoriquement fournir entre 75 et 80 familles de plein-frères. Nous en avons obtenu 112, soit un succès proche de 75%, très éloigné des 50% théoriques. Ce résultat qui demande à être confirmé en 1996, soulève une question fondamentale pour le déterminisme du sexe : existe-t-il chez cette espèce des substances chimiques capables d'orienter le sexe du partenaire ?

3. Conditionnement des reproducteurs

Parmi les nombreux facteurs externes ou internes, reconnus comme pouvant influencer le déroulement de la gamétogenèse, il faut distinguer les facteurs **déclenchant** et les facteurs de **contrôle** de la gamétogenèse.

3.1. Les facteurs déclenchant la gamétogenèse

L'huître plate *Ostrea edulis* présente une réelle phase de repos sexuel entre les mois de novembre et février. La reprise de l'activité génitale débute pour la majorité des auteurs (Lubet, 1991) aux environ de 10°C, Mann (1979) trouve par calcul une température de 6.75°C. A contrario, les maturations hivernales conduites depuis plusieurs années à La Tremblade, semblent montrer que le facteur déclenchant est indépendant du facteur température. La photopériode joue-t-elle un rôle chez *Ostrea edulis* comme chez *Pecten maximus* (Devauchelle et Mingant, 1991) ? Nous avons en effet remarqué que le naissain d'huître plate est très sensible aux variations lumineuses.

Chez *Crassostrea gigas*, il n'y a pas de véritable phase de repos sexuel, la gamétogenèse se déroule à un rythme très lent pendant la période hivernale (mitoses goniales), ce qui permet en éclosérie de la réactiver par conditionnement thermique (Lubet, 1991). Dans le bassin de Marennes-Oléron, Héral (1989) a montré une corrélation négative entre les températures automnales et la reprise de l'activité génitale, et, une quasi indépendance vis à vis des températures hivernales. Le début de la phase active de la gamétogenèse coïncide avec les plus basses températures hivernales.

3.2. Les facteurs contrôlant la gamétogenèse

Parmi les facteurs qui contrôlent le déroulement de la gamétogenèse, on distingue habituellement, les **facteurs externes** (influence de l'environnement) et les **facteurs intrinsèques**, bien que ces facteurs soient étroitement liés.

3.2.1. Les facteurs intrinsèques

Parmi les facteurs intrinsèques il faut citer d'une part, les facteurs neuroendocriniens dont les modalités d'action sont encore trop mal connues pour espérer une application à court terme au sein des écloséries, et, d'autre part l'état général de l'individu : l'âge, la taille, le niveau des réserves glucidiques. Ce dernier point est important car l'énergie accumulée pendant l'hiver chez les huîtres soutient l'effort de reproduction (Deslous-Paoli et Héral, 1988). **Il est essentiel de savoir dans quel état de réserve doivent se trouver les géniteurs pour mener à bien leur conditionnement en éclosérie.**

3.2.2. Les facteurs externes

Les facteurs externes les plus couramment décrits dans la littérature sont la température, la nourriture, la salinité et la photopériode. Un facteur est souvent omis, la zootechnie. Ces facteurs doivent être hiérarchisés en fonction de leur degré d'incidence sur la gamétogenèse.

La **température** semble être le paramètre le plus important. Elle a fait l'objet de nombreuses études dans le milieu naturel et dans les écloséries. Dans le bassin de Marennes-Oléron, il a été montré qu'il existait chez *Crassostrea gigas*, une corrélation positive entre les températures printanières et la cinétique de la gamétogenèse (Héral, 1989). Le conditionnement des géniteurs est, selon les écloséries, effectué entre 20 et 25°C, l'optimum se situant à 22°C. Sa durée est d'autant plus courte que les géniteurs utilisés sont proches de la maturité sexuelle. A

une température de 22°C, il faut 30 à 45 jours en période hivernale pour obtenir des huîtres aptes à émettre leurs gamètes, il faut 15 à 20 jours aux mois d'avril-mai à la même température. A côté de ces considérations purement zootechniques, il ne faut pas oublier les relations entre température et problèmes pathologiques. Les données récentes concernant le facteur température dans l'expression de l'Herpès virus (Le Deuff *et al.*, sous presse), sont susceptibles d'entraîner des modifications dans les techniques de conditionnement.

Le conditionnement d'*Ostrea edulis* est généralement réalisé à une température de 20°C. En fonction de facteurs déclenchants restant à déterminer, la durée du conditionnement hivernal peut varier selon les années, de 20 à 70 jours. Cette durée est beaucoup plus réduite lors du deuxième cycle de maturation, en 1995 elle a été en moyenne de 22 jours dans les HLM, certaines huîtres étant capables d'émettre de nouveaux gamètes en moins de 10 jours.

La **nutrition** exerce un rôle considérable dans la reproduction des mollusques. Pour les huîtres, ce rôle est tout aussi important pendant la phase hivernale de stockage de réserves énergétiques qui sont mobilisées au printemps pour la fabrication des gamètes, que pendant tout le déroulement de la gamétogenèse (Deslous-Paoli *et al.*, 1981). La nutrition conditionne la fécondité et le recrutement. En écloserie, seul un régime à base d'algues phytoplanctoniques est actuellement fourni, pourtant dans le milieu naturel ces microalgues ne représentent qu'une part des éléments particuliers et nous savons par ailleurs que les éléments dissous et les bactéries sont également une source essentielle de nourriture (Héral, 1989). L'absence de contrôle des éléments dissous dans les essais de conditionnement en circuit fermé, peuvent expliquer les faibles fécondités obtenues.

A La Tremblade, le conditionnement est réalisé en circuit ouvert, l'eau de mer est renouvelée à raison de 4 à 5 litres/heure/géniteur et enrichie par une double injection de phytoplancton (du *Skeletonema costatum* produit en grande quantité à l'extérieur du bâtiment et un mélange de trois espèces d'algues produites à l'intérieur). Des comptages systématiques de ces apports quotidiens ont été réalisés en 1994; ils montrent que malgré cette double injection, l'apport nutritionnel provenant du milieu naturel ("Divers 300m³" dans la légende des figures 1 et 2) est loin d'être négligeable puisqu'il représente en moyenne 30 à 50% des algues proposées aux géniteurs auxquels il faut ajouter la part des matières organiques dissoutes.

L'action de la **salinité** sur la gamétogenèse est toujours discutée, il semble toutefois admis que, pour les bivalves vivant dans une large gamme de salinités, la reproduction se déroule normalement à l'intérieur des limites létales spécifiques (Lubet, 1991). Dans le milieu naturel, sur *Crassostrea gigas*, Héral (1989) a montré qu'une forte corrélation existait entre température et salinité pour prédire les bonnes reproductions. Chez *Ostrea edulis*, nous avons observé des problèmes de reprise de la gamétogenèse pour des salinités proche de 20‰. Comme pour beaucoup d'autres paramètres, il nous manque pour le conditionnement des huîtres en écloserie, les limites réelles de salinité à l'intérieur desquelles la gamétogenèse ne s'effectue pas.

La **photopériode** est un paramètre qui n'a pas fait l'objet d'étude chez les huîtres, de façon empirique, une photopériode croissante est réalisée dans la salle de maturation pendant le conditionnement hivernal des huîtres plates.

Les paramètres **zootechniques** sont rarement cités comme facteurs externes dans les études concernant le conditionnement des géniteurs, bien qu'ils aient une grande influence sur le déroulement de la gamétogenèse. A titre d'exemple, rappelons que le conditionnement de *Pecten maximus* est actuellement réalisé dans des bacs avec fond de sédiment faisant office de filtre biologique. Cette technique, mise au point par l'équipe de l'écloserie du Tinduff (Bretagne) au début des années 80 (Gérard, non publié), a été déterminante pour le

conditionnement de la coquille St Jacques en se montrant nettement plus performante que la technique utilisant des bacs à fond nu. Des paramètres tels que la taille du bac de conditionnement, le volume d'eau de mer disponible par géniteur, le débit d'eau de mer, le type de renouvellement (circuit ouvert ou fermé), le rythme des nettoyages... sont de nature à modifier le déroulement de la gamétogenèse.

4. INDUCTION DE LA PONTE

4.1. Huître creuse

Le procédé le plus classiquement utilisé en éclosérie industrielle est le choc thermique parfois associé à une addition de produits sexuels d'animaux sacrifiés. Ces techniques de stimulation donnent des résultats variables tant au niveau de la qualité des gamètes que du synchronisme de la ponte.

L'efficacité des traitements d'induction de la triploïdie chez *Crassostrea gigas* étant basée en partie sur le synchronisme embryonnaire, une autre méthode d'obtention des gamètes est employée à La Tremblade : le "stripping". Cette technique qui consiste à récupérer les gamètes par scarification de la gonade (Allen *et al.*, 1989), présente l'avantage de supprimer toute fécondation incontrôlée, d'obtenir des gamètes à un même stade de développement, de pouvoir contrôler leur qualité au microscope et de programmer à la minute près le début d'une expérience. L'inconvénient majeur d'une telle technique réside dans le sacrifice des géniteurs et dans le risque de ne pas recueillir des gamètes à l'optimum de leur pouvoir fécondant. Les huîtres creuses sont les rares bivalves dont les produits génitaux sont fonctionnels après un tel traitement, les croissances et survies larvaires n'en sont pas affectées.

4.2. Huître plate

Le procédé habituellement utilisé dans les écloséries de production, consiste à placer des géniteurs dans un bac qui sert à la fois pour la maturation, la ponte et l'émission des larves. Ces dernières sont recueillies dans un tamis au fur et à mesure de leur émission, il n'y a aucun contrôle du moment de la ponte.

En 1991, pour mettre au point les techniques d'induction de la triploïdie chez *Ostrea edulis*, nos besoins étaient tout autres. Des pontes individuelles synchrones étaient nécessaires. Elles ont été obtenues en faisant murer des lots d'une cinquantaine d'huîtres, placées individuellement dans des récipients de 5 litres. Malgré le sacrifice régulier de quelques individus pour apprécier leur état de maturité, plusieurs échecs ont été enregistrés lors de l'induction de la ponte par choc thermique. Si des émissions de sperme étaient régulièrement obtenues, les émissions d'ovocytes étaient plus rares. *Le synchronisme requis dans ce type de programme se situe à l'échelle d'une population de géniteurs, la ponte doit être synchronisée, la fécondation entièrement contrôlée.*

Dans le cadre du programme de sélection de souches résistantes, le niveau de maîtrise est encore différent. *Le synchronisme requis se situe à l'échelle des deux parents identifiés, le moment de la ponte est indifférent, la fécondation n'a pas besoin d'être contrôlée si les deux partenaires sont isolés.* En attendant les résultats d'une recherche permettant d'accroître la maîtrise individuelle de la maturation, le dispositif HLM (§ 2.2.2) permettant de recueillir des

larves issues de deux huîtres sélectionnées, répond à ces critères. Toutefois ce dispositif est "chronophage", tant au niveau de l'entretien de la structure qu'au niveau du temps nécessaire à l'obtention des croisements, il a fallu cinq mois pour obtenir 112 croisements biparentaux en 1995. En 1994, des tentatives de maturation individuelle dans le même dispositif s'étaient soldées par de nombreux échecs au moment de l'application des chocs thermiques. Des inductions de la ponte par un neurotransmetteur, la sérotonine, n'avaient abouti qu'à des émissions de sperme. Pendant la phase de maturation, plusieurs autofécondations avaient également été observées.

5. FECONDATION

La fécondation est externe chez les mollusques, elle se déroule dans le milieu extérieur pour les huîtres creuses et dans la cavité palléale pour l'huître plate. Le contrôle quantitatif et qualitatif de la fécondation s'effectue par l'analyse des taux de fécondation et par l'étude du développement embryonnaire précoce en microscopie à épifluorescence. Une technique de comptage des spermatozoïdes et des ovocytes par imagerie numérique a été mise au point.

5.1. Huître creuse

Afin d'améliorer le synchronisme embryonnaire dans les expériences d'induction de la triploïdie et de la tétraploïdie, l'étude du développement embryonnaire précoce en microscopie à épifluorescence a été d'une grande utilité. Grâce à cette technique, la chronologie entre la fécondation et le stade 4 cellules est très bien connue (figure 3) et un ratio optimal de spermatozoïdes par ovocyte (100 sp/ov) tenant compte d'un taux de polyspermie limité à 10% (figure 4) a été déterminé. Elle a aussi permis de standardiser le temps entre le prélèvement des ovocytes et la fécondation. Les ovocytes sont récupérés par stripping au stade prophase I de la méiose. En l'absence de toute fécondation, ils évoluent dans l'eau de mer jusqu'au stade métaphase I en passant par différents stades : rupture de la vésicule germinative, condensation des chromosomes et regroupement sur le plan équatorial. Chez *Crassostrea gigas* il faut environ 20 à 30 mn à 25°C pour atteindre ce stade, et toutes les expériences d'induction de la polyplôidie débutent désormais à T₀-30mn.

5.2. Huître plate

En raison de son mode de reproduction (larvipare), nos connaissances en matière de qualité des gamètes et de fécondation sont encore plus limitées que pour l'huître creuse. Toutefois, les expériences d'élevage *in vitro* réalisées dans le cadre de l'induction de la triploïdie ont permis d'acquérir des données sur le développement embryonnaire précoce qui est beaucoup plus lent que chez *Crassostrea gigas*. Une autre particularité réside dans l'émission des spermatozoïdes qui se fait sous forme de balles de sperme. Il est préférable de réaliser les fécondations avec du sperme de ce type plutôt qu'avec du sperme déjà individualisé.

6. QUALITE DES GAMETES ET QUALITE DES ELEVAGES LARVAIRES.

En l'absence de tests de qualité des gamètes, fiables et rapides, une forte variabilité dans les performances des élevages larvaires est souvent enregistrée. Cette variabilité est surtout sensible chez *Crassostrea gigas*.

6.1. Huître creuse

Hormis les observations microscopiques classiques (motilité du sperme, présence d'une vésicule germinative chez les ovules) nous n'avons que peu d'éléments pour juger de la qualité des gamètes. Une expérience réalisée en 1995 pour le futur programme européen GENEPHYS illustre fort bien la variabilité qui existe au sein d'une même population de géniteurs. A partir d'un plan factoriel de croisement, comprenant 10 mâles et 10 femelles, les 100 croisements obtenus ont été analysés en microscopie à épifluorescence 3 heures après fécondation. Sur chaque croisement, 100 produits ont été comptabilisés (ovules non fécondés, ovules fécondés mais bloqués à un stade précoce, embryons à développement normal). En cumulant le nombre d'embryons normaux obtenu par mâle ou par femelle avec les 10 autres congénères (soit un maximum de 1000 descendants), il est possible de faire ressortir la variabilité de qualité des gamètes (figure 5 et 6). Une analyse de variance montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les mâles, par contre elle est hautement significative entre les femelles. *Ces résultats indiquent qu'en matière de recherche sur la qualité des gamètes, priorité doit être donnée aux travaux sur les gamètes femelles.*

Les relations entre d'une part, la qualité des gamètes, les caractéristiques des embryons et des larves D, et d'autre part, la qualité des élevages larvaires, sont à établir. Selon les élevages, une proportion plus ou moins importante de larves ne passe pas le stade umboné (100µm), ce qui se traduit par des taux assez faibles de larves atteignant le stade pédivéligère (entre 20 et 50%). Ces blocages de croissance, liés à des carences en certains éléments essentiels, trouvent sûrement leur origine dans les conditions de maturation. Le passage du stade umboné (8 à 10 jours) semble être une étape décisive permettant de vérifier l'aptitude des gamètes et embryons à fournir des larves de qualité.

6.2. Huître plate

L'huître plate étant une espèce larvipare, les larves se développent pendant 8 jours environ dans la cavité palléale. Elles sont expulsées à une taille de 180µm en moyenne. Si l'on excepte les élevages *in vitro* conduits dans le cadre des recherches sur la polyploïdisation, les croissances larvaires sont en règle générale plus rapides et plus harmonieuses que celles de l'huître creuse, et, une forte proportion des larves atteint le stade pédivéligère (60 à 90%).

6.3. Conservation des gamètes ou des embryons

Les techniques de cryoconservation des gamètes ou des embryons dans le domaine aquacole sont très faiblement développées. Il est pourtant essentiel pour les recherches en génétique (autofécondation, hybridations, sélection sur descendance...) de pouvoir maîtriser ces techniques. Chez les huîtres, on peut citer les travaux de Lannan (1971) sur la conservation du sperme de *Crassostrea gigas*, travaux repris par Bougrier et Rabenomanana (1986), et, les recherches récentes de Chao *et al.* (1994) sur la cryoconservation des embryons.

CONCLUSION

De réels progrès ont été réalisés ces dernières années dans la connaissance des mécanismes de contrôle de la gamétogenèse, de la ponte et de la fécondation, mais sur une seule espèce

Pecten maximus, et à l'échelle d'une population de géniteurs. Ce document, qui fait le parallèle entre les programmes "reproduction" et "génétique", souligne les lacunes restant à combler chez les huîtres, notamment dans le domaine de la maîtrise de la gamétogenèse à **une échelle individuelle**.

Il est bien entendu que les généticiens ne sont et ne doivent pas être les seuls bénéficiaires des recherches dans le domaine de la maîtrise de la fertilité. Toutefois nos demandes rejoignent en grande partie les préoccupations actuelles des éclosiers de production, même si le niveau d'étude ne réclame pas la même finesse : maîtrise au niveau de l'individu pour la recherche et au niveau de la population pour la production.

Les sujets d'étude évoqués dans cette courte synthèse sont nombreux, ils peuvent être regroupés en plusieurs rubriques d'inégale importance selon l'espèce :

- choix des géniteurs (concerne surtout l'huître creuse) :
 - origine géographique,
 - relations âge et taille du reproducteur, et, quantité et qualité des gamètes,
 - importance des réserves glucidiques,
 - en fonction de critères pathologiques (herpès virus) ;
- déterminisme du sexe (toutes les huîtres mais priorité à la plate) :
 - mécanismes physiologiques contrôlant les changements de sexe,
 - influence de l'âge et de la taille sur le déterminisme du sexe,
 - recherche de substances susceptibles d'orienter le sexe des huîtres environnantes,
 - orientation artificielle des lignées germinales,
 - méthodes de sexage ;
- maturation (toutes les huîtres mais priorité à la creuse) :
 - nature et rôle des facteurs déclenchant la gamétogenèse (huître plate),
 - étude des facteurs exogènes et endogènes contrôlant la gamétogenèse, et étude de leurs effets synergiques,
 - qualité et quantité de l'alimentation des reproducteurs, rôle des éléments dissous, diversification des espèces et des souches d'algues phytoplanctoniques,
 - désaisonnalisation des gamétogenèses ;
- induction de la ponte (toutes les huîtres mais priorité à la plate) :
 - synchronisation des pontes,
 - induction individuelle ;
- qualité des gamètes (toutes les huîtres mais priorité à la creuse) :
 - définir des critères de qualité des gamètes, avec une priorité aux gamètes femelles,
 - établir les relations entre qualité des gamètes, qualité des embryons et qualité des élevages larvaires,
 - cryoconservation des gamètes ou des embryons ;
- fécondation (concerne surtout l'huître creuse) :
 - optimisation des procédures de fécondation,
 - ratio sperme/ovocyte (bien connu mais à affiner en fonction de la qualité des gamètes),
 - synchronisation du développement embryonnaire précoce (sujet déjà bien maîtrisé dans le cadre des programmes cytogénétiques).

La multiplicité des études à aborder sous-entend la mise en place de moyens humains et financiers. Ceux-ci étant de plus en plus limités, il convient de bien définir les axes prioritaires, de rechercher les collaborations en interne (actions conjointes sur certains sujets des groupes

reproduction, nutrition, zootechnie, génétique) et de bien cibler les coopérations externes.

Références

- Allen S.K., S.L. Downing and K.K. Chew, 1989. Hatchery manual for producing triploid oysters. Distributed by University of Washington Press, Seattle, Washington. 27 p.
- Bougrier S. and L.D. Rabenomanana, 1986. Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 58 : 277-280.
- Chao N. H., C.P. Chiang, H.W. Hsu, C.T. Tsai and T.T. Lin, 1994 . Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquat. Living Resour.*, 7 : 99-104
- Deslous-Paoli J.M., M. Héral, J.P. Berthome, D. Razet et J. Garnier, 1982. Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thurnberg dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. *Rev.Trav. Inst. Pêches marit.*, 45 : 319-327.
- Deslous-Paoli J.M. and M. Héral, 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Liv. Resour.*, 1 : 239-249.
- Devauchelle N. and C. Mingant, 1991. Review of reproductive physiology of scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.*, 4 : 41-51.
- Héral M., 1989. L'ostréiculture traditionnelle. In : Aquaculture - G. Barnabé coordonateur, Lavoisier (Tec. Doc.) Ed., Paris : 348-397.
- Héral M. et J.M. Deslous-Paoli, 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesures microcalorimétriques et par dosages biochimiques. *Oceanol. Acta*, 1983, 6(2) : 193-199.
- His E. et R. Robert, 1987. Impact des facteurs anthropiques sur le recrutement de l'huître : l'exemple du bassin d'Arcachon. *Océanis*, 13(3) : 317-335
- Lannan J.E., 1971. Experimental self-fertilisation of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* , utilising cryopreserved sperm. *Genetics*, 68 : 599-601.
- Le Deuff R.M., T. Renault, A. Gérard and Y. Naciri, (sous presse). Thermal effects on Herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*.
- Lubet P., 1991. Reproduction des mollusques. In : Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture - G. Barnabé Coordonateur, Lavoisier (Tec. Doc.) Ed., Paris : 166-210.
- Mann R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 59 : 95-110.
- Marteil L., 1976. La conchyliculture Française. (2ème partie). Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. Trav. Inst. Pêches Mar.*, 40 (2) : 149-346.
- Robert R., T. Noël and R. Galois, 1989. The food value of five unicellular diatoms to the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg. EAS, Spec. Publ. 10 : 215-216.

ANNEXE D

PROTOCOLES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

RECHERCHE DE MARQUEURS MICROSATELLITES PAR CONSTRUCTION ET CRIBLAGE D'UNE BANQUE GENOMIQUE PARTIELLE CHEZ *O. EDULIS*

Extraction d'ADN

- Broyage dans l'azote liquide des tissus d'un individu après élimination de la glande digestive (Branchies + manteau + muscle)
- Récupération dans 50 ml de tampon d'extraction
- + 1 ml NaCl 5M, + 0.5 ml protéinase K (10 mg/ml)
- Incubation 55°C toute la nuit
- + ½ volume de phénol, agitation douce, + ½ volume de chloroforme
- Centrifugation 2000 tr/min pendant 5 minutes, prélèvement du surnageant
- Précipitation de l'ADN à l'isopropanol (1 volume) à -20°C (2 heures)
- Centrifugation 9000 tr/min pendant 30 minutes
- Lavage du culot à l'éthanol 70, reprise dans 100 ml d'H₂O distillée puis dosage au spectrophotomètre.

Tampon d'extraction : Tris 50 mM
 EDTA 125 mM
 SDS 0.1%

Digestion "quantitative" de l'ADN

- ADN 25 µg
- Enzyme de restriction : 10 U / Mg d'ADN
- Tampon 1 X
- H₂O q.s.p. 200 µl
- 37°C (ou 65°C selon l'enzyme utilisée) pendant 1 heure

Digestion du plasmide pBKs2

- Plasmide 10 µg
- Enzyme de restriction 25 U
- Tampon 1 X
- H₂O q.s.p. 30 µl
- 37°C pendant 1 heure

Récupération des fragments d'ADN entre 400 et 800 pb

- Migration de l'ADN digéré sur gel préparatif (agarose 1.5 %) à 10 V toute une nuit
- Sur table U.V. découper le gel pour garder les bandes entre 400 et 800 pb
- Intercaler cette bande dans un gel propre à 1.5% et intercaler une bande de papier X
- Couvrir à peine de tampon et faire migrer
- Récupérer le papier dans un tube Eppendorf percé, éliminer le TBE par centrifugation

- Eluer l'ADN en ajoutant 300 μ l puis 150 μ l de tampon d'élution
- + 1 volume Phénol, + 1 μ l glycogène, + 1 volume chloroforme, mélanger, centrifuger rapidement
- Prélever le surnageant, + 1 volume chloroforme, mélanger, centrifuger rapidement
- Prélever le surnageant, précipiter par 0.6 volumes isopropanol à -20°C
- Lavage à l'éthanol 70, séchage et reprise dans 50 μ l H_2O

Tampon d'élution : LiCl 1M
 Tris 10 mM
 EDTA 1mM
 EtOH 20%

Ligation

- ADN digéré 100 ng
- Plasmide digéré 50 ng
- T4 ligase 1 μ l
- Tampon ligase 1 X
- H_2O q.s.p. 20 μ l
- Toute la nuit dans le bas du frigo

Préparation des bactéries compétentes et transformation

- Mettre en culture 1 colonie d'E. coli DH5 α une nuit dans 3 ml de LB sans ampicilline
- Repiquer 100 μ l dans 10 ml de LB sans ampicilline pendant 30 à 60 minutes (D.O. à 590 nm entre 0.4 et 0.8).
- Centrifuger à 3600 tr/min pendant 10 minutes, éliminer le LB
- Reprendre dans 5 à 10 ml de CaCl_2 0.1M à 4°C , laisser sur glace au moins 30 minutes
- Centrifuger à 3600 tr/min pendant 10 minutes, reprendre le culot dans 500-600 μ l de CaCl_2 0.1M
- Dans un Eppendorf : 150 μ l de cette suspension + 10 μ l de plasmide/inserts, mélanger doucement, remettre sur glace $\frac{1}{4}$ h minimum
- Choc thermique : 37°C pendant 30 secondes, glace pendant 30 secondes (4 à 5 fois), remettre sur glace 30 minutes minimum (des heures possibles)
- Ajouter 150 μ l de LB, mettre à pousser 15-30 minutes, étaler sur une ou deux boites de 2XYT-agar + ampicilline (50 μ g/ml) + Xgal + IPTG, incuber à 37°C toute une nuit
- Les colonies blanches contiennent un plasmide avec un insert

LB Bactotryptène 10g
 Bactoyeast 5g
 NaCl 10g
 (Agar 15g)
 H_2O q.s.p. 1 litre

Extraction d'ADN des clones positifs (miniprep)

- Repiquer au cure-dent les clones positifs dans 2 ml de LB liquide + ampicilline, mettre en culture à 37°C toute une nuit
- Centrifuger à 3600 tr/min pendant 5 minutes, éliminer le LB
- Reprendre le culot dans 100 µl de TE + 20µg/ml RNAase A
- + 100 µl d'un mélange extemporané NaOH 0.2N/SDS 1%, agiter doucement, laisser 5 minutes à température ambiante
- + 100 µl AcK 3M, mélanger doucement, laisser 10-15 minutes sur la glace
- Centrifuger 5 minutes à 10000 g, récupérer le surnageant
- Précipiter l'ADN avec 1 ml d'éthanol absolu à -20°C
- Centrifuger, rincer le culot à l'éthanol 70 et reprendre l'ADN dans 50 µl d'H₂O

Séquençage des clones positifs

- Dénaturation de l'ADN:
 - 45 µl ADN + 5 µl NaOH 2M, laisser 10-15 minutes à température ambiante
 - + 6 µl AcK 3M
 - + 3 volumes éthanol absolu, précipiter à -20 °C
 - Centrifuger, rincer à l'éthanol 70, reprendre le culot dans 20 µl d'H₂O
- Séquençage (T7 Sequencing Kit, Pharmacia)
 - Préparation de l'ADN : 10 µl ADN + 2 µl amorce + 2 µl annealing buffer
65 °C pendant 5 minutes, 37 °C pendant 10 minutes
température ambiante pendant 5 minutes, centri rapide
 - Mix de marquage : 14 µl ADN
3 µl Labelling mix
1 µl α³³P dATP
2 µl T7 DNA polymérase (diluée au 1/5ème)
température ambiante pendant 5 minutes
 - Dans 4 tubes (A, C, G, T) mettre 2.5 µl de chaque N-mix, 37°C pendant 1 minute au moins
 - Ajouter 4.5 µl du mix de marquage dans chaque tube, 37°C pendant 5 minutes
 - Ajouter 5 µl de solution stop dans chaque tube
- Migration et révélation
 - Couler un gel de polyacrylamide 6 % (Acrylamide:bisacrylamide 19:1) et Urée 7M
 - Faire migrer les séquences à 60 W pendant 2h à 5h selon la longueur de séquence souhaitée
 - Après séchage, mettre à exposer pour la nuit avec un film autoradio; après développement, la séquence se lit de bas en haut.

EXTRACTION D'ADN

Au phénol-chloroforme

Les tissus sont prélevés dans un Eppendorf 2 ml auquel on ajoute 0.5 ml de tampon d'extraction (1% SDS, 0.1M Tris, 0.01M EDTA) et 25µl de Protéinase K (10 µg/µl) puis incubés au bain-marie (55°C) pendant une nuit.

- Ajouter 0.5 ml de phénol, mélanger
- Centrifuger à 14000 g pendant 5 minutes, récupérer le surnageant
- + 400 µl chloroforme:alcool isoamylique 24:1, mélanger
- Centrifuger à 14000 g 5 minutes, récupérer le surnageant
- Précipiter les acides nucléiques à l'éthanol 100 à -20°C
- Centrifuger 5 minutes, vider le surnageant
- Rincer à l'éthanol 70, centrifuger, éliminer toute trace d'alcool
- Reprendre le culot dans 100 µl de TE 1X ou d'eau ultra-pure

TE 100 X Tris 1M
 EDTA 100 mM

Au Chelex®

- Tout petit bout de tissu + 400 µl Chelex® 5%
 + 30 µl TE 1X
 + 10 µl Protéinase K (10 µg/µl)
- Bain-marie à 55 °c pendant une nuit
- Bain-marie bouillant (ca. 100°C) pendant 15-20 minutes
- Vortexer 30-60 secondes
- Centrifuger 8000 tr/minutes pendant 5 minutes
- Prélever le surnageant et stocker à -20°C

Couper une bande de 6 cm de large et mettre du marqueur de migration.
 Aligner les individus sur la grande bande qui reste et remettre la petite.
 Mettre le gel sur les électrodes, tremper les éponges et replier le Cellophane sur elles.
 Mettre en route le générateur à 10 W jusqu'à disparition du bleu.

- Récupération du gel après migration:

Couper le gel dans un angle pour connaître le sens.
 Mettre le gel sur une plaque, couper le gel.
 Mettre la tranche ainsi coupée dans un bac en plastique avec de l'eau
 Colorer ensuite cette tranche à 37°C pendant 30' dans la plupart des cas.

Coloration des protéines

PGM: Tris HCl 0.2M pH=8: 5ml
 MgCl₂ 0.5M: 1ml
 Glucose 1 Phosphate: 300mg (Sigma)
 NAD 1%: 1ml
 NADP 1%: 0.5ml

juste avant la coloration:

Glucose6Phosphodeshydrogénase: 6µl
 PMS 0.5ml
 NBT 1ml
 MTT 0.5ml
 ajouter 5 ml d'agarose et verser sur le gel

PGI: Tris HCl 0.2M pH=8: 5ml
 MgCl₂ 0.5M: 1ml
 Fructose 6 Phosphate: 10mg (Sigma)
 NAD 1%: 1ml
 NADP 1%: 0.5ml

juste avant la coloration:

Glucose6Phosphodeshydrogénase: 6µl
 PMS 0.5ml
 NBT 1ml
 MTT 0.5ml

ajouter 5 ml d'agarose et verser sur le gel

MDH: Tris HCl 0.2M pH=8: 30ml
 MgCl₂ 0.5M: 0.5ml
 Acide malique 2M: 5ml
 NAD 1%: 1ml
 NADP 1%: 0.5ml

juste avant la coloration:

PMS 0.5ml
 NBT 1ml
 MTT 1ml

IDH: Tris HCl 0.2M pH=8: 5ml
 MgCl₂ 0.5M: 1ml
 Acide isocitrique 0.1M: 1ml
 NAD 1%: 1ml

NADP 1%:	0.5ml
juste avant la coloration:	
PMS	0.5ml
NBT	0.5ml
MTT	0.5ml

ajouter 5 ml d'agarose et verser sur le gel

EST:

Acétate de sodium 0.05M pH=6.0: 30ml
4 Methyl Umberifénil acétate dans acétone 0.5%

Résultat à voir au UV

ETUDE DU POLYMORPHISME DES LOCUS MICROSATELLITES

Amplification par PCR

- Marquage radioactif d'une amorce :

	volume (μ l)
H ₂ O	1.5
Am. (10 μ M)	2
Tp Kinase	1
ATP g-33P	5
T4Kinase	0.5
Vol. total	10

- Mélange réactionnel pour la PCR :

Produit	Volume (μ l) pour 1 ind.	Mix en μ l pour 90 ind.	[C] finale ou quantité	[C] de la sol. mère
Nb réactions	1	90		
H ₂ O	2.45	220.5		
Tampon	1	90	1 X	10 X
MgCl ₂	0.6	54	1.5 mM	25 mM
dNTP	0.37	33.3	0.074 mM	2 mM
Am1 (33P)	0.11	9.9	0.022 μ M	2 μ M
Am2	0.4	36	0.4 μ M	10 μ M
BSA	0	0	0 μ g/ml	1000 μ g/ml
Polymérase	0.07	6.3	0.35 unités	5 unités/ μ l
ADN	5			
Vol. Réact.	10			

- Programme d'amplification :

94°	2 minutes	
94°	1 minute	30 cycles
T° appariement	1 minute	
72°	1 minute 15 sec	
72°	5 minutes	

Migration et visualisation

- Après PCR, ajouter 5 μ l de Bleu de charge et dénaturer pendant 5 minutes à 95°C
- Couler un gel de polyacrylamide 6 % (Acrylamide:bisacrylamide 19:1) et Urée 7M de 0.4 mm d'épaisseur
- Faire migrer dans du TBE 0.5X à 55W pendant 1h30 à 3h selon la taille du fragment amplifié
- Après séchage du gel, l'exposer toute une nuit avec un film autoradiographique

TBE 10 X : Tris 162g
Acide borique 27.5g
EDTA 0.5M 50ml
H₂O q.s.p. 1 litre

ANNEXE E

FREQUENCES ALLELIQUES AUX LOCUS MICROSATELLITES
DANS LES POPULATIONS DU PROGRAMME DE SELECTION

Locus	Allèles	P85-G2	X	Y	P89i-G1	P89ni-G1	Témoin	
<i>OeduJ12</i>	216	0.1444	0.0833	0.1923	0.0676		0.0816	
	218	0.0111						
	224	0.0556	0.1250	0.1923	0.2973		0.1939	
	226						0.0408	
	228	0.0111					0.0204	
	230					0.3529	0.0102	
	232	0.0444	0.0833			0.1471	0.0612	
	234	0.0778			0.0135		0.0918	
	236				0.0135		0.0204	
	238	0.0667		0.3077	0.0541		0.0714	
	240	0.1667	0.2083				0.0306	
	242	0.0444	0.0417		0.0541	0.1176	0.0918	
	244	0.0222	0.2083		0.2838		0.0306	
	246	0.2444	0.2083	0.2308			0.0408	
	248	0.0333		0.0769	0.2027		0.0204	
	250	0.0556	0.0417			0.1765	0.0510	
	252						0.0408	
	254	0.0222			0.0135		0.0102	
	256						0.0408	
	258					0.2059	0.0204	
	262						0.0102	
	264						0.0102	
	272						0.0102	
	<i>OeduU2</i>	146				0.2237	0.0200	
		148				0.0132		
		152						0.0104
		154	0.0638	0.0833				
156		0.2234	0.2917	0.1923			0.1667	
158		0.2021	0.1250	0.1923			0.1042	
160		0.0106			0.0263		0.0417	
162		0.0106			0.1053	0.1000	0.0313	
164			0.0417			0.2200	0.0521	
166							0.0104	
168					0.1184		0.0417	
170							0.0521	
172			0.0417				0.0417	
174		0.0745			0.0395		0.0625	
176						0.1600	0.0417	
178		0.2128	0.2083	0.5769			0.0625	
180		0.0957		0.0385			0.0729	
182					0.0395	0.2100	0.0208	
184							0.0104	
186					0.0132		0.0313	
188							0.0313	
190			0.0417		0.0132		0.0208	
192		0.0213						
196		0.0745	0.1667				0.0417	
198		0.0106					0.0104	
200							0.0104	
204					0.1974			
206					0.2900	0.0104		
210						0.0104		
212				0.2105				
222						0.0104		

Locus	Allèles	P85-G2	X	Y	P89i-G1	P89ni-G1	Témoin
<i>OeduH15</i>	165						0.0116
	173	0.2889	0.3750	0.2308	0.3889	0.2115	0.2674
	177						0.0233
	181	0.1667	0.0833	0.0385	0.0417		
	185		0.0417				0.0581
	189				0.2083	0.0962	0.0930
	193					0.2019	0.0233
	197						0.0465
	201	0.0444	0.0833		0.0139	0.1827	0.1163
	205	0.0556					0.0698
	209		0.0833				0.0465
	213	0.2000	0.2500	0.3077	0.1528	0.3077	0.0698
	217	0.1333	0.0417	0.3462	0.0139		0.0349
	221	0.1000	0.0417	0.0385	0.1111		0.1047
	225	0.0111		0.0385	0.0417		0.0349
	229				0.0278		
	<i>OeduO9</i>	140	0.0111		0.0769		
142							0.0102
144							0.0204
146		0.0222	0.1250				
148							0.0306
150		0.1111	0.1250	0.1538			0.0408
152		0.0111			0.0676		0.0714
154		0.0778	0.0417	0.0385	0.2973		0.0408
156		0.0556	0.0417		0.3378		0.0816
158							0.0612
160		0.1222	0.2083		0.0676	0.3529	0.1020
162		0.1222	0.1250		0.1216	0.1373	0.1327
164		0.3778	0.2083	0.7308	0.0135		0.1633
166					0.0135	0.0490	0.0714
168		0.0444	0.1250		0.0135	0.2647	0.0714
170		0.0444			0.0676		0.0204
172							0.0204
174					0.1961	0.0408	
176						0.0102	
<i>OeduT5</i>	106	0.2979	0.3000	0.6154	0.2368	0.2941	0.2128
	112	0.0106					
	118	0.0426	0.0500		0.0132		0.1489
	120				0.0132		
	122				0.0789		
	124	0.0319	0.1500		0.2632	0.0980	0.1064
	126						0.0106
	128	0.0106	0.0500			0.1765	0.0851
	130	0.0106		0.0385			0.0213
	132	0.0106			0.2105		0.0745
	134	0.0851	0.0500		0.0132	0.2059	0.1064
	136	0.0532		0.1154			0.0213
	138	0.1277	0.0500	0.1154			0.0532
	140	0.2553	0.1500	0.0769	0.1579		0.0106
	142	0.0106	0.1500			0.0784	0.0106
	144						0.0106
	146					0.1471	
	148						0.0213
	150	0.0213			0.0132		0.0213
152	0.0213		0.0385			0.0319	
154	0.0106	0.0500				0.0213	
158						0.0106	
162						0.0106	
166						0.0106	

ANNEXE F

FREQUENCES ALLELIQUES AUX LOCUS MICROSATELLITES
DANS LES POPULATIONS NATURELLES D'*OSTREA EDULIS*

	OSL	PBA	IRN	IRS	QUI	NOR	ROC	GAL	POR	THA	RHO	CRO	VEN
130			0.0104		0.0128		0.0122		0.0357	0.0104		0.0213	
146		0.0556			0.0128				0.0357			0.0106	
148													
150													
152			0.0104	0.0167	0.0104			0.0588			0.01		
154	0.0326	0.0185	0.0104	0.0167				0.0147		0.0208	0.02	0.0106	
156	0.0978	0.0741	0.0417	0.1333	0.1667	0.0256	0.0976	0.0588		0.0313	0.03	0.0426	0.0217
158	0.0543	0.0185	0.1146	0.1	0.1042	0.1026		0.1912		0.0833	0.05	0.0106	0.0217
160	0.0543	0.0741	0.0313	0.0833	0.0417	0.0513	0.1341	0.0588		0.0833	0.05	0.0213	0.0217
162	0.0978	0.1852	0.0313	0.1	0.0313	0.0256	0.1098	0.0294	0.0714	0.0833	0.15	0.0426	0.0217
164	0.0109	0.037	0.0625	0.0521	0.0313	0.0385	0.0244		0.1071	0.0729	0.09	0.0426	
166	0.0435		0.0729	0.05	0.0521	0.0256	0.061	0.0147	0.0357	0.0313	0.03	0.0426	0.0652
168	0.0652	0.0741	0.0521	0.0333	0.0417	0.0256	0.0244	0.0147	0.0714	0.0208	0.02	0.0319	0.1087
170		0.0556	0.0417	0.0833	0.0521	0.0385	0.0244	0.1471	0.1429	0.0625	0.09	0.0426	0.0217
172	0.0217	0.0185	0.0521	0.0667	0.0417	0.0256	0.061	0.1471	0.0357	0.0313	0.02	0.0638	0.0435
174	0.0217	0.1111	0.1146	0.0833	0.0625	0.1282	0.0366	0.0147	0.0714	0.0313	0.07	0.0426	0.1304
176	0.0326	0.0185	0.0625	0.0167	0.0417	0.0513	0.0976	0.0882	0.0714	0.0521	0.07	0.0319	0.087
178	0.0435	0.0741	0.0625	0.0167	0.0625	0.0513	0.0244	0.0441	0.0714	0.0417	0.05	0.0638	0.0652
180	0.0217	0.037	0.0521	0.0167	0.0729	0.0385	0.0732	0.0147	0.0714	0.0208	0.03	0.0745	0.0217
182	0.0435		0.0208	0.0333	0.0208	0.0385	0.0122		0.0714	0.0313	0.06	0.0426	0.0435
184	0.0217	0.037	0.0104	0.0167	0.0104	0.0641	0.0366		0.0714	0.0938	0.05	0.0319	0.0652
186	0.1087	0.0185	0.0208	0.0167	0.0313	0.0513	0.061	0.0294	0.0357	0.0208	0.02	0.0426	0.0435
188	0.0109	0.0185	0.0104	0.0167	0.0313	0.0256	0.0122		0.0357	0.0313	0.02	0.0532	0.087
190	0.1196		0.0208	0.0167	0.0208	0.0128	0.0244	0.0294	0.0357	0.0104	0.03	0.0106	0.0435
192	0.0435	0.0185			0.0256	0.0256	0.0122	0.0294	0.0357	0.0104	0.03	0.0319	0.0217
194			0.0417	0.0167		0.0122	0.0122		0.0357	0.0208	0.01		
196	0.0217	0.0185			0.0417	0.0385	0.0122			0.0313	0.01		
198			0.0104	0.0333	0.0104	0.0385	0.0122	0.0147		0.0104	0.01	0.0106	
200		0.0185	0.0104	0.0167	0.0104	0.0256	0.0122						
202	0.0217		0.0208				0.0122		0.0357	0.0208		0.0213	0.0217
204	0.0109		0.0104							0.0104		0.0319	
206		0.0185			0.0104						0.01		
208							0.0122						0.0217
210					0.0104		0.0122					0.0319	0.0217
216												0.0426	0.0217
220												0.0106	
222													
246					0.0104		0.0122			0.0104			
										0.0104			

OeduH15

	OSL	PBA	IRN	IRS	QUI	NOR	ROC	GAL	POR	THA	RHO	CRO	VEN
165					0.0116							0.0106	0.0278
169					0.0132		0.0114			0.0111	0.0306		
173	0.1912	0.2407	0.1277	0.2813	0.2674	0.25	0.3409	0.2794	0.1538	0.1556	0.1735	0.0213	0.0278
177		0.0556	0.0106	0.0156	0.0233	0.0395	0.0227	0.0294		0.0556	0.0102	0.0532	0.3889
181	0.0588		0.0319	0.0938		0.0263	0.0114		0.0385	0.0444	0.0408	0.0426	
185		0.0185			0.0581	0.0395	0.0455	0.0882	0.0385	0.0333	0.0408	0.1064	0.0278
189	0.0294	0.1296	0.0957	0.0469	0.093	0.0395	0.0682	0.0147	0.0769	0.0556	0.0204	0.0426	
193			0.0957	0.0781	0.0233	0.0526	0.0568		0.0385	0.0333	0.0204	0.0319	0.0278
197	0.0441	0.037	0.0106	0.0781	0.0465	0.0395	0.0341	0.0147	0.0385		0.0408	0.0213	0.0556
201	0.0735	0.1111	0.0532	0.0469	0.1163	0.1316	0.0455	0.0147		0.0444	0.051	0.0213	0.0556
205	0.0735	0.0926	0.0532		0.0698	0.0132	0.0909	0.0294			0.0204	0.0106	0.0278
209	0.0735	0.0185	0.0213		0.0465	0.0263	0.0114	0.0147	0.0769	0.1444	0.1327	0.0957	0.0278
213	0.1176	0.1111	0.1702	0.1406	0.0698	0.0921	0.0795	0.1912	0.2308	0.2	0.1837	0.3511	0.0278
217		0.037	0.1383	0.0313	0.0349	0.0395	0.0568	0.1765	0.1154	0.0889	0.1224	0.0532	0.0556
221	0.2206	0.1481	0.1915	0.1563	0.1047	0.1316	0.0909	0.0882	0.1538	0.0889	0.0714	0.0638	
225	0.1176			0.0313	0.0349	0.0526	0.0227					0.0319	0.1389
229					0.0132	0.0132	0.0114			0.0222	0.0408	0.0319	0.0833
233								0.0588	0.0385	0.0222		0.0106	0.0278

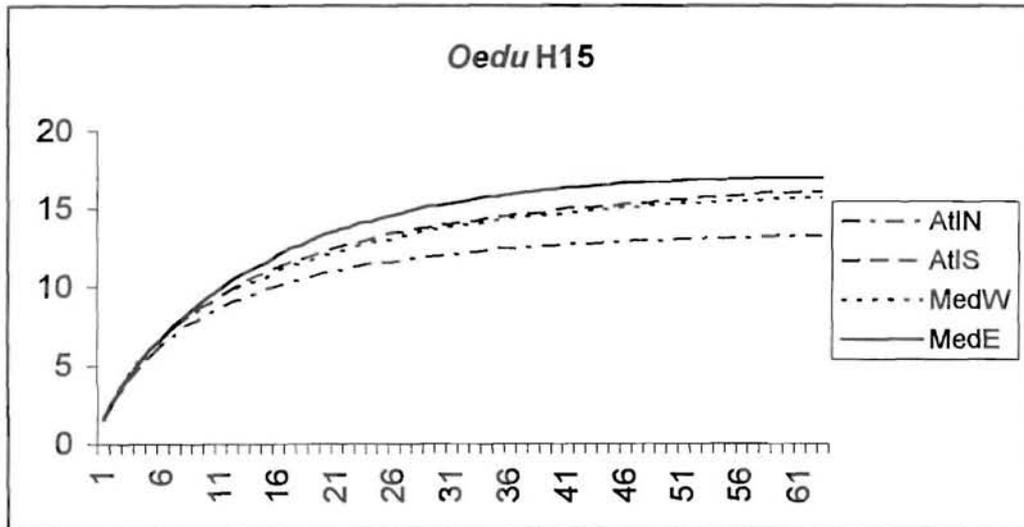
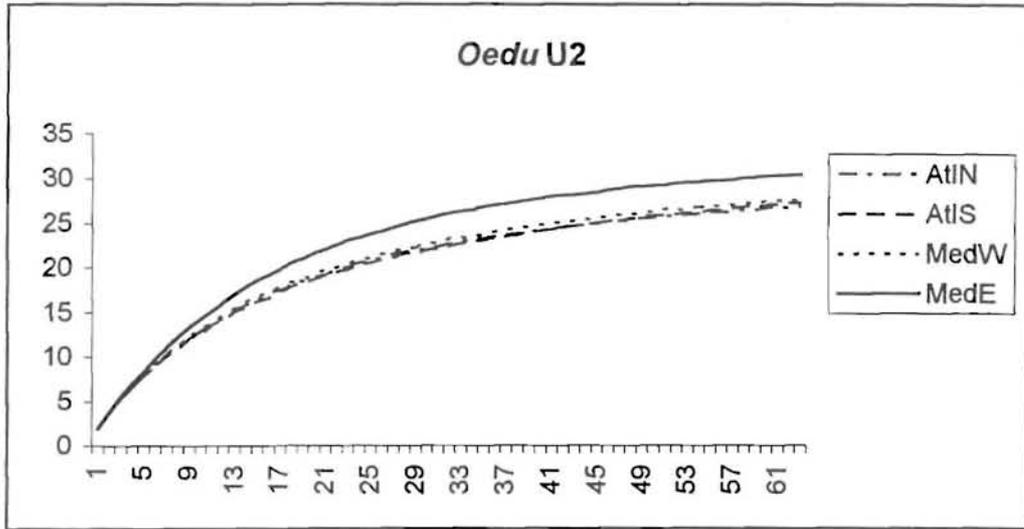
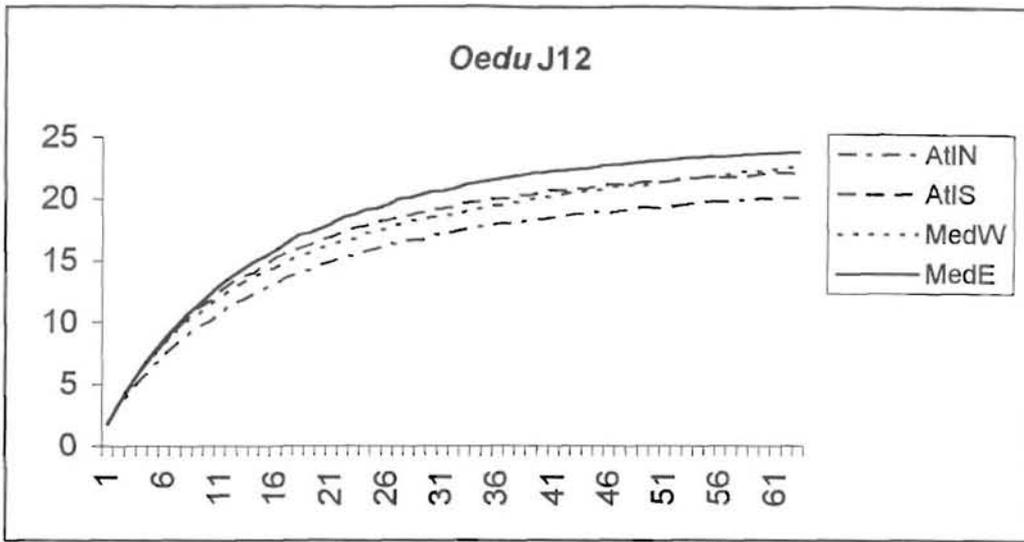
Oedu09

	OSL	PBA	IRN	IRS	QUI	NOR	ROC	GAL	POR	THA	RHO	CRO	VEN
128								0.0294				0.02	
134					0.0102	0.0139				0.0104			
136					0.0102								
140					0.0204	0.0278				0.0417	0.0426	0.01	0.0227
142		0.0185					0.0114						
144			0.0532						0.0833	0.0208	0.0106	0.01	0.0227
146			0.0532	0.0161				0.0147		0.0313	0.0106	0.03	0.0682
148	0.0109	0.0185	0.0532		0.0306	0.0417	0.0341	0.0147		0.0104	0.0213	0.09	0.0227
150			0.0745	0.1452	0.0408	0.1111	0.0455	0.1324	0.0588	0.0104	0.0532	0.1	0.0682
152			0.0426	0.0323	0.0714	0.0694	0.1136	0.0588		0.0417	0.0106	0.07	0.0455
154	0.0761	0.0741	0.0532	0.0484	0.0408	0.0417	0.0341	0.0882	0.125	0.0625	0.0319	0.05	0.0682
156	0.1304	0.0926	0.0851	0.129	0.0816	0.125	0.0568	0.1176	0.0833	0.0417	0.0532	0.07	0.0909
158	0.0326	0.0741	0.117	0.2097	0.0612	0.0833	0.0909	0.1176	0.0833	0.1042	0.0426	0.11	0.0227
160	0.0543	0.0926	0.1277	0.1452	0.102	0.0833	0.125	0.1176	0.2083	0.2188	0.3191	0.05	0.1364
162	0.3043	0.2407	0.117	0.0268	0.1327	0.125	0.1136	0.25		0.0938	0.0319	0.06	0.0682
164	0.1522	0.1111	0.1489	0.0161	0.1633	0.0556	0.1364	0.0588	0.125	0.1042	0.0213	0.1	0.0227
166	0.1196	0.1111	0.0426	0.0645	0.0714	0.0833	0.0568		0.0417	0.0313	0.0957	0.06	0.1364
168	0.0326	0.037	0.0532	0.0323	0.0714	0.0417	0.0795	0.0294	0.0833	0.0313	0.0213	0.03	0.0455
170	0.0435	0.0185		0.0323	0.0204	0.0694	0.0227	0.0588	0.0417	0.0208	0.0213	0.03	0.0455
172		0.0556	0.0106	0.0161	0.0204	0.0278	0.0227	0.0147	0.0417	0.0938	0.1064	0.03	
174	0.0109	0.0185	0.0213		0.0408		0.0455			0.0208	0.0319	0.04	0.0455
176					0.0102				0.0417	0.0104	0.0106	0.01	0.0455
178		0.0185		0.0161			0.0114			0.0104	0.0213	0.01	
180								0.0294			0.0213		
182										0.0104	0.0213		
184	0.0109											0.01	
186	0.0109											0.01	
188										0.0104		0.01	
196											0.0106		0.01

ANNEXE G

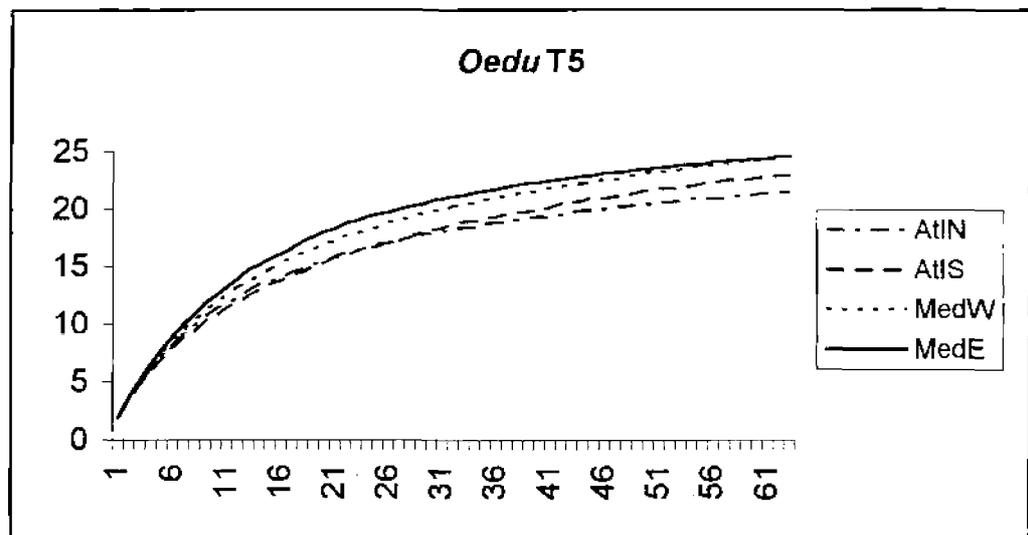
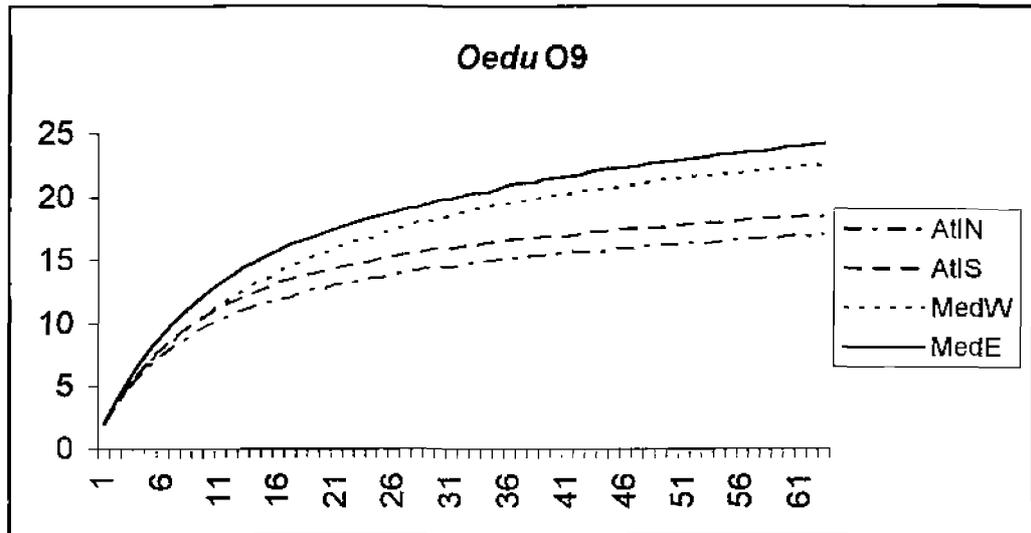
TEST PAR BOOTSTRAP DES DIFFERENCES DE RICHESSE ALLELIQUE ENTRE LES
DIFFERENTES ZONES GEOGRAPHIQUES

Chaque courbe représente l'évolution du nombre d'allèles en fonction de la taille
de l'échantillon



Nombre d'individus

Nombre d'individus



Nombre d'individus