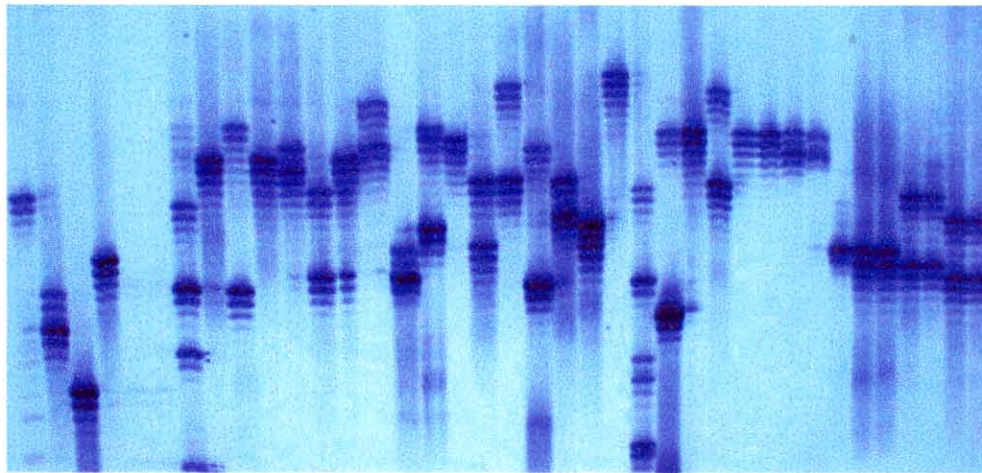


DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES
DE BIOLOGIE DES POPULATIONS, GENETIQUE ET ECO-ETHOLOGIE

Option A: Analyse et contrôle de l'évolution des populations
Faculté des Sciences et Techniques de TOURS

Arnaud HUVET

**Différenciation Génétique de deux Huîtres Creuses
Crassostrea gigas et *Crassostrea angulata* :
Apport des Marqueurs Microsatellites**



Janvier - Septembre 1997

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de recherche en Génétique
17390 La Tremblade

Responsables de stage : André GERARD
Pierre BOUDRY



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 00092

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie de la station *JFREMER* de Ronce-les-Bains.

Je tiens tout d'abord à remercier *André Gérard* et *Jean-Pierre Flassch* de m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Sincères remerciements à *André* pour avoir soutenu mon éventuelle poursuite en thèse.

Je remercie également *Pierre Boudry*, mon responsable de stage, pour l'encadrement scientifique dont j'ai bénéficié au cours de ces huit mois.

Merci à tous ceux qui par leurs conseils m'ont permis d'avancer dans mes recherches. Merci à *Bertrand* et *Christophe* pour m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire. Merci à *Sophie* (Mlle microsatellite) pour toutes ses explications et les relectures fastidieuses.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel du laboratoire pour son accueil et sa gentillesse. *Pascal*, je te souhaite bonne route.

Enfin, remerciements sincères à ceux qui ont su, par leur présence et leur amitié, transformer les moments difficiles en souvenirs lointains : *Hélène*, *Isabelle*, *Christophe*, *Xavier*, *Nicolas*, *Cécile* et merci à toute la « stagiaire bande » pour les moments « rigolades ».

- SOMMAIRE -

I/ INTRODUCTION	1
II/ MATERIEL ET METHODES	5
II-1/ MATERIEL :	5
II-1-1/ Matériel biologique	5
II-1-1-1/ Modèles biologiques : les huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> et <i>C. angulata</i>	5
II-1-1-2/ Populations échantillonnées.....	5
II-1-2/ L'outil moléculaire : les microsatellites.....	7
II-2/ METHODES :	8
II-2-1/ Extraction d'ADN.....	9
II-2-2/ Polymerase Chain Reaction (PCR)	10
II-2-2-1/ Principe et réalisation.....	10
II-2-2-2/ Mise au point.....	10
II-2-3/ Migration et lecture des autoradiographies	11
II-2-4/ Traitement des données	11
III/ RESULTATS	12
III-1/ DONNEES MICROSATELLITES :	12
III-2/ VARIBILITE INTRA-POPULATION :	13
III-3/ VARIABILITE INTER-POPULATIONS :	15
III-4/ DIFFERENCIATION <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> - <i>CRASSOSTREA ANGULATA</i> :	16
IV/ DISCUSSION	17
IV-1/ VARIABILITE INTRA-POPULATION :	17
IV-2/ VARIABILITE INTER-POPULATIONS :	20
IV-3/ DIFFERENCIATION <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> - <i>CRASSOSTREA ANGULATA</i> :	23
V/ CONCLUSION	24

I/ INTRODUCTION

Au sein de la complexité et diversité du monde animal, les invertébrés s'affirment comme majoritaires en terme de nombre d'espèces. De nombreuses études concourent à élever le niveau des connaissances aussi bien chez les insectes que chez les mollusques, embranchement étudié du fait d'une importance économique majeure de certaines espèces. Le groupe des bivalves marins représente un attrait scientifique de part ses caractéristiques particulières et sa biodiversité. Toutes ces qualités soulignent l'originalité du modèle d'étude : les huîtres creuses. Elles se divisent en deux genres : *Crassostrea* présent à l'échelle mondiale et *Saccostrea* dont la répartition est centrée en Australie et Nouvelle-Zélande. A l'intérieur du genre *Crassostrea*, une vingtaine d'espèces ont été décrites parmi lesquelles *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*.

L'histoire de l'ostréiculture française est émaillée de succession de phases de développement, de surexploitation ou de maladies nécessitant une meilleure compréhension et connaissance des phénomènes impliqués. L'huître creuse *Crassostrea angulata* a dominé sur le littoral français depuis l'année 1868 (date de son introduction sur les côtes françaises, à partir d'individus portugais) jusqu'en 1971 où elle a été décimée par une maladie virale (agent pathogène de type iridovirus). Pour faire face à cette disparition, l'huître japonaise *Crassostrea gigas* a été introduite en France (les stocks importés proviennent du Japon et du Canada (Grizel et Héral, 1991)). Son expansion a été très importante, aidée par l'absence de compétiteur pour les ressources trophiques, l'huître portugaise étant restreinte au sud de l'Europe au moment de l'importation massive, ajoutée à la régression de l'huître plate *Ostrea edulis*.

De nombreux programmes de recherche en particulier sur des espèces dont l'enjeu économique est important (*C. gigas*, *C. virginica*,...) sont en cours dans les domaines génétique et physiologique. Une étude comparative des stocks des principaux pays producteurs et des populations naturelles, basée sur des marqueurs génétiques, représente un élément essentiel pour la gestion des ressources génétiques et la compréhension des relations entre espèces, indispensables pour assurer une protection des stocks existants et développer des programmes de transplantation et de sélection. Cette approche permet d'appréhender plusieurs notions :

- les ressources génétiques à l'échelle mondiale,
- des moyens de distinction entre espèces proches,
- la différenciation génétique interspécifique,
- la structuration génétique des populations au niveau intraspécifique et les flux géniques.

Il faut noter que ce modèle comporte quelques caractéristiques importantes à prendre en compte en génétique des populations. L'aspect commercial façonne une nouvelle base de travail. L'intervention humaine depuis plusieurs siècles modifie la notion de populations naturelles. Les nombreuses transplantations et importations, l'introduction volontaire ou accidentelle (exemple : *Crassostrea gigas* en Nouvelle-Zélande (Smith et al., 1986)) modifie voire efface l'impact des processus migratoires naturels. Le terme de population naturalisée conviendrait mieux dans bien des cas à celui de population naturelle, seulement pertinent pour des échantillonnages issus de populations indemnes de l'activité humaine. Il faut aussi nuancer la notion de structuration des populations, difficile à interpréter du fait des caractéristiques données précédemment, et entrevoir plus précisément dans ce sujet un aspect de différenciation génétique.

Les études génétiques progressent en ampleur et en résolution depuis plusieurs années. Les techniques comme les allozymes et les RFLP aussi bien sur l'ADN mitochondrial que nucléaire sont de plus en plus complétées et même devancées par les microsatellites. L'utilisation de tels marqueurs est indispensable dans les études où peu, voire aucun polymorphisme aux autres marqueurs n'est détecté. C'est le cas de populations présentant des réductions de variabilité (goulots d'étranglement), une homogénéité génétique due à de très forts flux géniques ou encore dans l'étude de taxons très proches. En conclusion, ils sont nécessaires dès que l'on soupçonne de très faibles niveaux de variabilité. Ce polymorphisme est considéré comme neutre c'est-à-dire a priori non directement impliqué dans la valeur sélective et l'adaptation des populations. Il est souvent très élevé du fait d'un fort taux de mutation.

La question posée dans ce stage est l'apport des microsatellites (en comparaison avec les autres marqueurs utilisés) dans l'étude de la différenciation génétique existant entre deux huîtres creuses du genre *Crassostrea* : l'huître japonaise *Crassostrea gigas* et l'huître portugaise *Crassostrea angulata*. Les connaissances actuelles ne permettent pas de se prononcer avec certitude sur l'existence de deux espèces ou seulement d'une seule (pour des raisons strictement taxonomistes et également pratiques, elles seront mentionnées comme 2 taxons tout au moins dans l'introduction de ce rapport). *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* ont été décrites respectivement par Thunberg en 1793 et Lamarck en 1819. La définition en deux espèces s'est faite surtout sur la grande distinction de leur répartition géographique. En effet, le fort isolement géographique avec une répartition complètement opposée de *C. gigas* et *C. angulata* est en faveur d'une hypothèse à deux taxons émis graduellement par ces deux auteurs. Historiquement, *C. gigas* se limitait à l'Asie mais ses qualités reconnues ont conduit à son introduction dans de nombreuses régions du monde. Elle représente aujourd'hui 86% de la production mondiale d'huîtres (Données FAO, 1995). Sa distribution en Asie est mal connue mais sa présence est supposée remonter à plusieurs milliers d'années avec un éventuel ancêtre *Crassostrea gryphoides* (Menzel, 1974).

C. angulata a aujourd'hui une aire de répartition plus réduite et centrée sur l'Europe du sud (Espagne, Portugal).

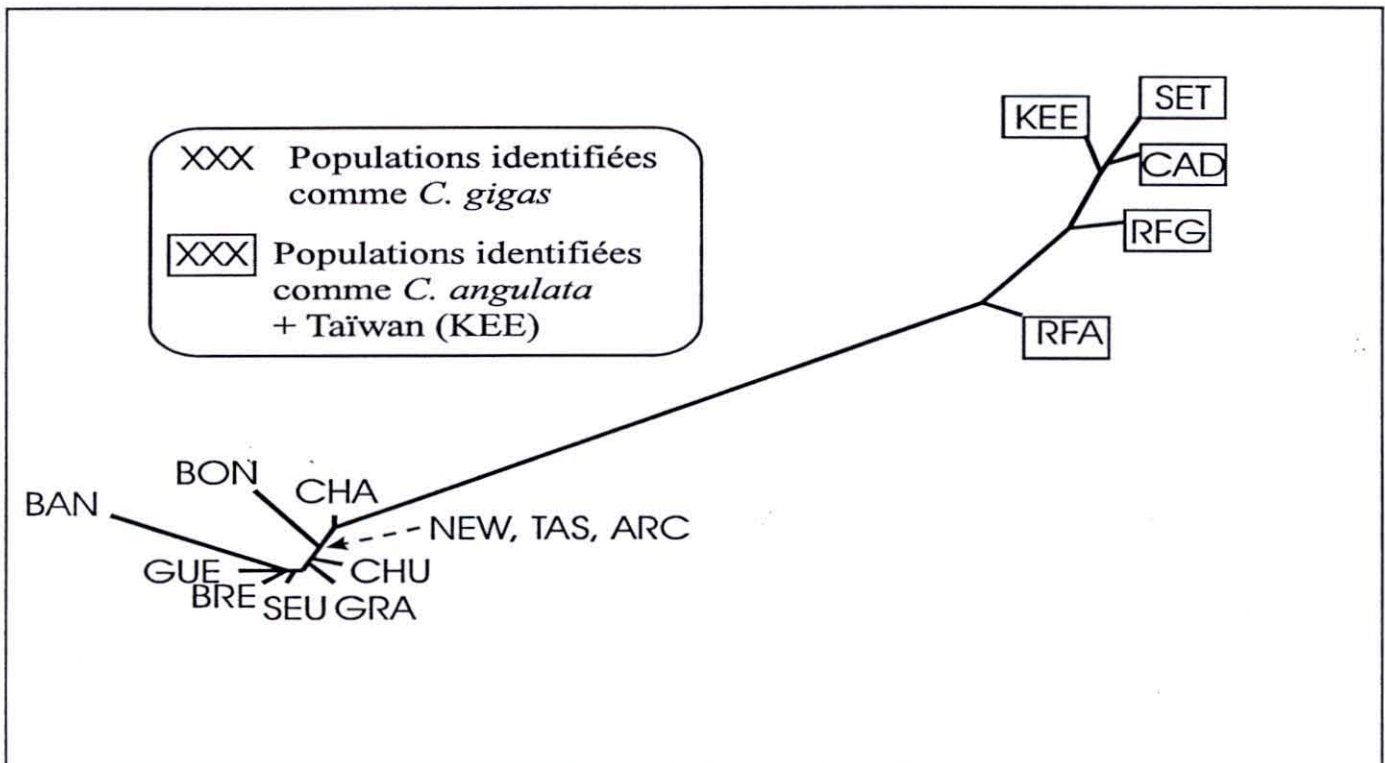
Beaucoup d'études s'appliquent à analyser les divergences et similitudes tant morphologiques, physiologiques que génétiques entre plusieurs espèces d'huîtres creuses. La variabilité phénotypique la plus importante s'exprime sur la susceptibilité différente de chacune aux pathologies virales : un exemple majeur est l'infection iridovirale dévastatrice sur *C. angulata* (Comps et al., 1976) sans conséquence sur *C. gigas*. Les seuls autres paramètres révélant une différence sont d'ordre physiologique (His, 1972 ; Bougrier et al., 1986) et en faveur de *Crassostrea gigas* : une différence de croissance a été mise en évidence associée à une activité de filtration plus élevée, une résistance plus conséquente aux conditions environnementales (turbidité, exigence moindre de température).

La meilleure approche dans ce cas précis est sûrement une étude génétique. Plusieurs ont été réalisées avec des marqueurs allozymiques (Mathers et al., 1974 ; Buroker et al., 1979 ; Mattiucci et Villani, 1983) et mitochondriaux (Boudry et al., soumis). L'état des connaissances actuelles ne permet pas de différencier morphologiquement *Crassostrea gigas* et *C. angulata*. Elles se croisent naturellement et donnent des hybrides totalement viables et fertiles (Buroker et al., 1979). Une étude a été réalisée sur les chromosomes de ces hybrides, les caryotypes sont les mêmes chez les deux taxons ($2n=20$ chromosomes), et aucune anomalie n'a été constatée (Menzel, 1974). Les études allozymiques, Mathers et al. (1974) dans leur analyse sur deux loci (estérase et phosphoglucose isomérase), Buroker et al. (1979) sur 18 loci ainsi que Mattiucci et Villani (1983) sur 20 loci enzymatiques, n'ont révélé aucune différence significative entre des populations de *C. gigas* et *C. angulata*. Mathers (1974) conclut que les différences phénotypiques à ces systèmes enzymatiques ne sont pas plus importantes entre deux populations de ces deux taxons qu'entre deux populations isolées d'une même espèce. L'ensemble des travaux de Menzel (1974) amène à la conclusion que *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* sont deux sous-espèces de l'espèce *Crassostrea gigas* notées donc *Crassostrea gigas gigas* et *Crassostrea gigas angulata*. Ceci est en contradiction avec les premières définitions taxonomiques donnant deux espèces distinctes basées surtout sur la disparité de leur répartition géographique. Dans ce cas, comment expliquer cette répartition géographique ?

Les dernières données traitent du polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP) sur l'ADN mitochondrial (Boudry et al., soumis) (ce travail a été réalisé au laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie de La Tremblade). Elles plaident en faveur d'une distinction (mise en évidence d'une nette différenciation entre ces deux taxons présentant chacun un haplotype majeur). L'hypothèse la plus probable serait un foyer évolutif asiatique (Japon, Taïwan) avec une origine asiatique de *Crassostrea angulata* supportée par les similitudes entre les populations originaires du sud de l'Espagne et du Portugal

et celle de Taïwan. Les différences s'expliqueraient par celles déjà existantes dans les populations asiatiques et celles accumulées au fil du temps façonnées par l'adaptation à l'environnement local. L'arbre (Figure 1) a été construit par "neighbor-joining" à partir de ces données RFLP mitochondriales et illustre les relations génétiques entre les populations de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*. On observe deux regroupements caractéristiques, l'un des populations de *Crassostrea gigas* et l'autre des populations de *Crassostrea angulata*. La population taïwanaise (KEE) se regroupe avec les populations de *C. angulata* espagnoles et portugaises.

Figure 1 Arbre obtenu par neighbor-joining sur les données RFLP de l'ADN mitochondrial à partir des distances de Nei (1987) (Boudry et al., soumis)



CHA: Charente, BON: Bonne Anse, ARC: Arcachon, SEU: Seudre, BRE: Brest, GRA: Gravelines, BAN: Bangor, GUE: Guernesey, CHU: Corée du Sud, NEW: Nouvelle-Zélande, TAS: Tasmanie, KEE: Taïwan, CAD: Cadix, SET: Setubal, RFA-RFG: Faro.

En résumé, beaucoup d'auteurs supposent l'existence d'une seule espèce. Aucune différence significative n'apparaît au niveau des allozymes. Les marqueurs mitochondriaux génèrent une différence d'haplotype permettant un typage de ces deux huîtres creuses. L'étude de la diversité génétique est maintenant abordée en estimant la variabilité observée à l'aide de marqueurs génétiques, les microsatellites, au polymorphisme généralement considéré comme "neutre". La question que l'on se pose est de savoir si *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* présentent de réelles différences à ces marqueurs hypervariables.

L'analyse des différentes populations, à l'aide de marqueurs microsatellites afin d'estimer le niveau de variabilité intra- et inter-taxons et compléter le travail déjà effectué avec des marqueurs mitochondriaux, devrait apporter quelques réponses ou tout du moins éclaircir un point conflictuel en génétique des bivalves marins.

II/ MATERIEL ET METHODES

Le matériel biologique est représenté par deux taxons d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* (*Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*) et les méthodes de biologie moléculaire employées sont : les techniques d'extraction de l'ADN, la mise au point et l'utilisation des marqueurs microsatellites par PCR (Polymerase Chain Reaction).

II-1/ Matériel :

II-1-1/ Matériel biologique

II-1-1-1/ Modèles biologiques : les huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *C. angulata*

La systématique de ces deux taxons est donnée en annexe 1. Les particularités démographiques du modèle d'étude sont de fortes fécondités ainsi que des grandes tailles de populations. Quelques caractéristiques physiologiques, génétiques, écologiques et géographiques (données en annexe 2) soulignent les différences et les points communs de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*.

II-1-1-2/ Populations échantillonnées

L'échantillonnage comprend 12 populations (4 de *C. angulata* et 8 de *C. gigas*) avec une moyenne de 39 individus par population (soit 468 individus au total). Les fluctuations du nombre d'individus entre populations sont dues aux difficultés d'échantillonnage.

L'ensemble des caractéristiques des populations échantillonnées est donné dans le tableau 1 et la répartition géographique est présentée en annexe 3 sous la forme d'une carte européenne situant précisément les échantillons géographiquement proches auxquels il faut ajouter les deux populations asiatiques : Taïwan et Corée du Sud.

Tableau 1 Populations échantillonnées

Population	Taxon prédéterminé	Descriptif (lieu de prélèvement)	Effectif
RFA, RFG	Ca / Cg	Faro, 1 population présentant un mélange de <i>C. gigas</i> et <i>C. angulata</i> , 200 km au sud de Lisbonne, Portugal	35
CAD	Ca	Cadix, Chiclana de la Frontera, 150 km au sud de Faro, Espagne	50
SET	Ca	Setubal, 20 km au sud de Lisbonne, Portugal	13
TAH	Ca	Tahaddart, 340 km au nord de Casablanca, Maroc	16
KEE	Cg *	Keelung, Sud de Taiwan	30
CHU	Cg	Chungmu, Corée du Sud	50
OUA	Cg	Lagune de Oualidia, 175 km au sud de Casablanca, Maroc	45
VEN	Cg	Venise, Italie	39
BAN	Cg	Bangor, Pays de Galle, GB (population d'écloserie)	41
ROZ	Cg	Anse du Roz, Rade de Brest, France	50
ARC	Cg	Arcachon, France	50
SEU	Cg	Anse de la Seudre, La Tremblade, France	49

Cg = *Crassostrea gigas*

Ca = *Crassostrea angulata*

* échantillon donné comme *C. gigas* et apparaissant regroupé à *C. angulata* avec les données mitochondriales.

Il faut noter que la détermination du taxon est réalisée par des scientifiques de la région d'échantillonnage sur des critères taxonomiques et historiques mais non génétiques. Elle a été confirmée par les analyses mitochondriales pour l'ensemble des échantillons sauf pour la population taïwanaise (KEE).

Les quatre populations de *Crassostrea angulata* viennent de régions sud de l'Europe (Espagne, Portugal) et nord de l'Afrique (proche du détroit de Gibraltar). Ce taxon ne se localise quasiment que sur les côtes de ces pays où elle est majoritaire. Sur d'autres côtes comme en France, quelques individus peuvent subsister mais en faible quantité et certainement hybridés avec l'huître creuse japonaise. Par contre pour *Crassostrea gigas*, très représentée à l'échelle mondiale, l'échantillonnage est plus vaste et centré sur deux localisations principales : l'Asie et l'Europe.

Les échantillons sont reçus au laboratoire sous forme de fragments de branchies conservés dans de l'alcool ou bien les animaux entiers sont fournis et mis en élevage en quarantaine au laboratoire puis biopsés. Dans chaque population, de l'ADN extrait était déjà disponible sur plusieurs individus (matériel de travail pour les RFLP de l'ADN mitochondrial) et d'autres extractions ont été nécessaires pour

compléter les effectifs de chaque population afin d'obtenir un échantillonnage plus représentatif dans une étude avec des marqueurs microsatellites.

II-1-2/ L'outil moléculaire : les microsatellites

L'existence d'ADN répété dans le génome des Eucaryotes est connue depuis près de 30 ans (Britten et Kohne, 1968). Le nombre et la large distribution de ces éléments répétés ont été découverts dans les années 1980 (Tautz et Renz, 1984). Depuis 1992, les microsatellites sont très utilisés en génétique des populations.

Un marqueur microsatellite (schématisé en annexe 4) est une séquence d'ADN constituée d'unités nucléotidiques courtes (de 1 à 6 paires de bases) répétées en tandem (Rassman et *al.*, 1991). Un nombre de répétitions correspond à un allèle (témoin de la différence de taille entre allèle), chaque allèle étant séparé d'un autre par une ou plusieurs mutations. Il est admis qu'une mutation survient par un phénomène qualifié de glissement de polymérase. Le modèle de mutation n'est pas encore unanime pour ces marqueurs. Les simulations montrent que les distributions alléliques rencontrées correspondent mieux à un modèle de type SMM (Stepwise Mutation Model) qu'à un modèle IAM (Infinite Allele Model) (Shriver et *al.*, 1993 ; Valdes et *al.*, 1993). Cependant, il a été observé des mutations portant plus d'un motif (Valdes et *al.*, 1993). L'hypothèse actuelle la plus probable semble être le modèle TPM (Two Phase Model) (Di Rienzo et *al.*, 1994) qui allie une faible proportion (1-p) du modèle KAM (K Allele Model) avec des mutations vers des états alléliques éloignés à une probabilité de $u/(k-1)$ (u = taux de mutation) et une forte proportion (p) du SMM où un allèle a une probabilité de $u/2$ de muter vers l'état allélique directement supérieur ou inférieur c'est-à-dire seulement séparé d'une répétition. Il se différencie du modèle à nombre fini d'allèles (IAM) admis pour les allozymes. Les études laissent penser que le nombre de répétitions tend à augmenter avec le temps d'évolution mais qu'il existe tout de même une régulation de la taille des loci microsatellites les contraignant à ne pas dépasser une taille "déraisonnable" (Nauta et Weissing, 1996 ; Goldstein et *al.*, 1995).

Les avantages des microsatellites, justifiant leur utilisation grandissante, sont multiples :

- leur présence dans de nombreux génomes animaux et végétaux,
- la neutralité,
- la codominance (distinction des homozygotes et des hétérozygotes),
- le fort taux de polymorphisme (lié au fort taux de mutation de l'ordre de $10^{-4} / 10^{-3}$),
- l'analyse par PCR # technique non destructrice
besoin de peu d'ADN et/ou de mauvaise qualité.

Mais quelques problèmes, surtout d'ordre pratique, limitent tout de même l'utilisation de ces marqueurs :

- caractérisation longue (par clonage et séquençage),
- présence d'allèles nuls interférant dans l'analyse des données (Pemberton *et al.*, 1995),
- modèle de mutation pas admis et différent de celui des allozymes,
- nombre d'allèles souvent très élevé limitant l'accès à certains logiciels de traitement de données,
- coût d'analyse élevé.

L'examen des individus a été réalisé au premier abord avec 3 marqueurs microsatellites (CG44, CG49, CG108) mis au point par l'équipe grecque de E. Zouros (Institute of Marine Biology of Creete). A cela s'ajoutent les essais de mise au point de 5 nouveaux marqueurs L8, L10, L16, L32, L48 (dont les séquences sont fournies par l'équipe de F. Bonhomme, laboratoire Génome et Populations). Une fois la mise au point accomplie, un des nouveaux marqueurs (L10) a pu être utilisé dans cette étude. Les autres serviront dans l'avenir à la compléter et l'affiner.

L'étude a donc été effectuée avec 4 loci microsatellites dont les caractéristiques essentielles sont données dans le tableau 2.

Tableau 2 Marqueurs microsatellites

locus (code genbank)	séquence répétée	amorces	Tm	taille du fragment cloné
CG 44 (Y12085)	(CA) ₁₃	S : gaa gaa tgt cat aga ttg atg g AS : cat gcc tgt tta cca gta ttc	53°C	391 pb
CG 49 (Y12086)	(CA) ₃₅	S : cat cag ggg taa att aaa gta agc AS : cca cag acg att tca tat atc ctg	53°C	194 pb
CG 108 (Y12087)	(CA) ₁₈	S : ata tgt aat gat tac gaa act AS : gta tga gat ttg gtt cca cc	55°C	228 pb
L 10	(AG) ₂₆	confidentiel	55°C	330 pb

amorce S = sens, amorce AS = anti-sens.

II-2/ Méthodes :

Pour expliquer les manipulations, il faut retracer le cheminement expérimental en partant du matériel biologique (l'huître) sur lequel un morceau de branchie est prélevé (pour en extraire de l'ADN) jusqu'à l'obtention d'un film photographique où l'on peut distinguer des bandes visibles et analysables en

terme d'allèles et donc géotyper les individus. Pour cela différentes techniques sont nécessaires : les biopsies, l'extraction d'ADN, la PCR "radioactive" pour amplifier les microsatellites, la séparation des fragments d'ADN sur gel d'acrylamide pour visualiser les résultats.

II-2-1/ Extraction d'ADN

Les prélèvements non destructifs de fragments de branchie sur huîtres vivantes (anesthésiées par du chlorure de magnésium permettant l'ouverture des deux valves) suffisent à l'extraction d'ADN réalisée à l'aide de deux méthodes : Phénol/Chloroforme (décrite par Moore, 1993) ou Chélex (Estoup et *al.*, 1996) dont les caractéristiques sont données en annexe 5. Les avantages et inconvénients sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 Avantages et inconvénients des deux méthodes d'extraction

Méthode d'extraction	Phénol/Chloroforme	Chélex 5%
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> ☛fiabilité proche de 100% ☛obtention de grandes concentrations de matériel de bonne qualité ☛utilisation de petites quantités d'ADN dans un protocole PCR (la moitié de celles utilisées à partir d'ADN extrait au chélex) 	<ul style="list-style-type: none"> ☛protocole rapide ☛produits non toxiques
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> ☛protocole lourd ☛produits utilisés toxiques 	<ul style="list-style-type: none"> ☛fiabilité voisine de 70-80% chez <i>Crassostrea gigas</i> ☛obtention de faibles concentrations de matériel de qualité moyenne ☛utilisation de grandes quantités d'ADN dans le protocole PCR ☛problème d'amplification dans 2 populations

L'utilisation de la méthode Phénol/Chloroforme est, au final, préférable. Les résultats sont beaucoup plus fiables et constants même si le gain de temps avec la méthode Chélex est important. A noter la réduction du protocole Phénol/Chloroforme : l'étape Chloroforme est supprimée car elle n'est pas nécessaire si le prélèvement du surnageant après la phase phénol est bien effectué.

II-2-2/ Polymerase Chain Reaction (PCR)

II-2-2-1/ Principe et réalisation

La PCR est une réaction d'amplification en chaîne mise au point par K. MULLIS en 1985. Elle permet l'amplification sélective de fragments d'ADN par réplication de la séquence située entre les bornes des zones d'hybridation des amorces. Ces amorces oligonucléotidiques ont été construites après connaissance d'une séquence d'amorçage. La PCR suit un protocole strict de travail. L'amorce marquée au P^{33} radioactif est mélangée avec les réactifs de travail de la PCR (annexes 6 et 7). L'ensemble est distribué sur une plaque PCR (où sont distribués les échantillons d'ADN) et suit un cycle rigoureux :

- **dénaturation initiale** : 5 minutes à 94°C
- **cycle de PCR** :
 - . dénaturation : 1 minute à 94°C
 - . hybridation des amorces ou annealing : 1 minute à une température spécifique à chaque locus microsatellite variable suivant la longueur et la composition des amorces (tableau 2).
 - . élongation : 1 minute 45 secondes à 72°C.

Ce cycle est répété 30 fois et conduit à une amplification exponentielle du fragment sélectionné.

- **élongation finale** : 5 minutes à 72°C.

Les échantillons peuvent être ainsi conservés au congélateur. L'étape suivante, après distribution de bleu de marquage et dénaturation 5 minutes à 94°C, consiste à séparer les fragments d'ADN de chaque individu sur un gel d'acrylamide (paragraphe II-2-3).

II-2-2-2/ Mise au point

Les séquences des amorces de 5 nouveaux marqueurs microsatellites sont disponibles. Leur utilisation demande une mise au point afin d'obtenir des conditions de travail applicables à tous les individus permettant une lecture fiable et répétable des bandes. Les conditions de PCR et de migration varient d'un locus à l'autre. La spécificité de la PCR dépend en particulier de la stabilité du complexe d'hybridation entre l'amorce et la région cible de la matrice ADN. Les principaux facteurs qui déterminent cette spécificité sont la température d'hybridation ainsi que la concentration des réactifs utilisés et plus particulièrement celle des dNTPs et des ions $MgCl^{2+}$. L'élévation de la température d'hybridation et la diminution des concentrations de dNTPs et de $MgCl^{2+}$ augmentent cette spécificité. L'utilisation d'une machine à gradient de température couplée à des gradients de concentration de ces réactifs a progressivement permis l'obtention d'un protocole d'amplification utilisable en routine sur 2 nouveaux marqueurs (se reporter à l'annexe 7), les 3 autres nécessitant des perfectionnements. La

difficulté réside dans l'obtention d'un équilibre entre faible (trop de bandes amplifiées) et forte spécificité (amplification hasardeuse).

II-2-3/ Migration et lecture des autoradiographies

La séparation des fragments d'ADN de chaque individu est réalisée sur un gel d'acrylamide 8% vertical. Il permet une résolution fine des fragments de 60 à 400 paires de bases avec la discrimination de fragments ayant 1 paire de bases de différence. Les migrations se font à puissance constante (50 watts) sous voltage et intensité non limitants pendant 2 à 5 heures en fonction de la taille du locus analysé.

Les allèles sont numérotés à partir de 1 pour l'allèle le plus haut avec un incrément de 2 paires de bases soit un motif de répétition. Les allèles les plus hauts correspondent à ceux ayant la migration la plus réduite et donc ce sont les plus grands. Inversement, les allèles les plus bas sont les plus petits.

Tous les homozygotes et les individus sans résultat d'amplification ont été analysés deux et parfois trois fois. L'utilisation d'un témoin (mélange de plusieurs individus) permet les recoupements entre gels.

II-2-4/ Traitement des données

Wright (1951) a mis au point un ensemble d'outils mathématiques, connu sous le nom de F-statistiques, permettant de décrire la répartition de la variabilité génétique entre les populations et à l'intérieur de ces populations. Cette méthode est la plus utilisée actuellement en génétique des populations. 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 de chaque population,
- F_{it} (pour individu et population) mesure les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg sur l'ensemble des populations.

Ici, nous nous intéresserons aux deux premiers indices uniquement. Ces paramètres seront estimés selon Weir & Cockerham (1984).

La significativité des valeurs de F_{is} est testée par estimation d'une valeur P obtenue avec la méthode de la chaîne de Markov. La valeur P correspond à la probabilité d'exclusion de la valeur réelle en dehors de la distribution moyenne obtenue après permutations sur les allèles de chaque population.

La significativité des valeurs de F_{st} (estimateur Theta de Weir et Cockerham) est étudiée par permutations sur les génotypes des populations traitées. Une distribution de tous les F_{st} obtenus à chaque permutation est comparée à la valeur réelle en donnant le pourcentage de valeurs supérieures et inférieures

à celle-ci. La significativité est montrée quand le nombre de valeurs inférieures à la valeur réelle de F_{st} n'atteint pas 5%. Les deux autres niveaux de significativité sont 1% et 0,1%.

Le calcul des distances de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) a servi de base à la réalisation d'un arbre de distances par la méthode de "neighbor-joining" (Saitou et Nei, 1987).

Le traitement des données est réalisé avec les logiciels suivants : Genetix version 3.0 (Belkhir et al., 1996) et Genepop version 3.1 (Raymond et Rousset, 1995) pour le calcul des F-statistiques ; Phylip et Treeview (Page, 1996) pour la réalisation de l'arbre de distances.

A noter que Genetics 3.0 autorise un maximum de 30 populations, de 6 loci et de 50 allèles par locus amenant à la réalisation d'une classe d'allèles rares à chacun des loci. Dans tous les cas, le regroupement est fait avec les allèles rares (représentés une seule fois) à l'extrémité droite de l'histogramme (figure 3, annexes 11, 12, 13) correspondant aux allèles les plus petits.

Un test de significativité est réalisé sur les distributions des fréquences alléliques chez *C. gigas* et *C. angulata* pour savoir si elles sont homogènes ou différent l'une de l'autre. Le test employé est le test non paramétrique de Wilcoxon (sur deux échantillonnages), proche du test U de Mann-Whitney (Sokal et Rohlf, 1995). Pour chaque taille d'allèle et suivant l'ensemble des deux distributions, un rang est assigné par ordre croissant. La somme des rangs sur l'échantillon le plus petit, à savoir *C. angulata* (144 individus), correspond à R et est utilisée dans le calcul suivant :

$$C = n_1 n_2 + (n_2(n_2 + 1)/2) - R \quad \text{avec } n_1 = 2 \cdot 324 \text{ et } n_2 = 2 \cdot 144$$

C est comparé à la valeur $n_1 n_2 - C$, la plus petite des deux quantités est choisie comme la statistique U_s .

Pour des données dépassant $n > 50$, le calcul de t_s s'impose : $t_s = (U_s - (n_1 n_2 / 2)) / \sqrt{((n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)) / 12)}$, valeur à comparer avec le $t_{\alpha, \infty}$ de Student avec $\alpha =$ seuil de significativité.

III/ RESULTATS

III-1/ Données microsatellites :

Tableau 4 Résultats propres aux microsatellites

locus	nb d'ind. analysés	nb d'ind. non amplifiés	nb d'ind. hétérozygotes	Hétérozygotie observée	Hétérozygotie attendue	nb total d'allèles
CG 44	468	12	312	0.68	0.97	52
CG 49	468	15	322	0.71	0.973	53
CG 108	468	8	380	0.83	0.969	52
L 10	468	3	422	0.90	0.97	56

L'hétérozygotie globale à chaque locus est obtenue en divisant le nombre d'individus hétérozygotes au locus considéré par le nombre total d'individus analysés à ce même locus. Ces valeurs supposent l'état à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour l'ensemble des populations à chaque locus et correspondent aux valeurs nécessaires au calcul du Fit.

On constate une grande variabilité (tableau 4) puisque le nombre d'allèles dépasse 50 à tous les locus. Le nombre moyen d'allèles par locus est de 53,25 avec un minimum de 52 aux loci CG44 et CG108 et un maximum de 56 au locus L10.

III-2/ Variabilité intra-population :

- **Variabilité** : Le tableau 5 représente le polymorphisme intra-population suivant les 4 loci considérés avec le nombre moyen d'allèles par locus, l'hétérozygotie observée et attendue. Le niveau de variabilité observé est très élevé. He (mesure de la diversité génique) donne des valeurs fortes (0,944 pour la population KEE au locus CG44 ; 0,962 pour SEU au locus L10). Chaque population présente à tous les loci un nombre conséquent d'allèles. Le nombre moyen d'allèles par locus et par population est de 27 avec un minimum de 23 (CG 44) et un maximum de 31 (L10). A l'inverse, la population CHU présente un faible nombre d'allèles , environ deux fois moins que les populations présentant le même effectif (exemple : CHU et ARC présentent respectivement 15 et 30 allèles au locus CG49).

Tableau 5 Polymorphisme intra-population

pop	CG44			CG108			CG49			L10		
	nb all	Ho	He	nb all	Ho	He	nb all	Ho	He	nb all	Ho	He
RFAG	24	0,857	0,942	23	0,823	0,935	25	0,411	0,939	27	0,971	0,947
CAD	21	0,54	0,906	28	0,8	0,948	33	0,96	0,957	33	0,857	0,954
SET	12	0,692	0,896	13	0,769	0,887	11	0,545	0,892	17	1	0,914
KEE	26	0,766	0,944	26	0,966	0,943	26	0,666	0,942	30	0,896	0,948
TAH	27	0,875	0,908	32	0,937	0,918	33	0,4	0,904	37	1	0,933
OUA	14	0,571	0,942	15	0,822	0,955	30	0,727	0,956	27	1	0,962
BAN	26	0,658	0,879	33	0,756	0,887	33	0,575	0,937	38	0,951	0,945
ROZ	30	0,7	0,943	28	0,791	0,948	36	0,775	0,963	35	0,755	0,961
VEN	23	0,631	0,949	38	0,891	0,947	30	0,714	0,949	37	0,871	0,945
ARC	27	0,88	0,943	27	0,8	0,954	30	0,836	0,938	31	0,98	0,962
CHU	15	0,38	0,904	16	0,869	0,960	15	0,765	0,951	20	0,84	0,957
SEU	30	0,791	0,943	34	0,755	0,955	35	0,652	0,948	40	0,918	0,962

nb all=nombre total d'allèles par population et par locus, Ho=hétérozygotie observée, He=hétérozygotie attendue

Le tableau présentant les fréquences alléliques par population et par locus est répertorié en annexe 8.

- *Conformité à Hardy-Weinberg* : L'indice Fis (tableau 6) de Weir et Cockerham (1984), dérivé du F de Wright (1951) mesurant les écarts à Hardy-Weinberg de chaque population, est calculé à partir de l'hétérozygotie observée et attendue (tableau 5).

Tableau 6 Fis de Weir et Cockerham (1984) et significativité

POP	CG44	CG108	CG49	L10
	Fis W&C	Fis W&C	Fis W&C	Fis W&C
RFAG	0,105 *	0,134 *	0,572 ***	-0,013 NS
CAD	0,413 ***	0,166 ***	0,007 NS	0,118 ***
SET	0,265 **	0,172 *	0,429 ***	-0,054 NS
KEE	0,205 **	-0,008 NS	0,308 **	0,073 *
TAH	0,069 NS	0,011 NS	0,581 ***	-0,039 NS
OUA	0,404 ***	0,15 ***	0,25 ***	-0,027 NS
BAN	0,263 ***	0,16 **	0,398 ***	0,009 NS
ROZ	0,267 ***	0,176 ***	0,205 ***	0,225 ***
VEN	0,347 ***	0,073 *	0,262 ***	0,091 NS
ARC	0,077 ***	0,172 ***	0,12 ***	-0,006 NS
CHU	0,587 ***	0,106 *	0,173 ***	0,133 *
SEU	0,171 **	0,22 ***	0,322 ***	0,058 NS

Fis W&C=Fis selon Weir et Cockerham (1984) ; quand $P \geq 0,05$ NS non significatif, quand $P < 0,05$ * significatif, $P < 0,01$ ** très significatif, $P < 0,001$ *** hautement significatif.

Le Fis est quasiment toujours positif révélant un déficit en hétérozygotes significatif dans 11, 10, 11 et 4 populations respectivement aux loci CG44, CG108, CG49 et L10. De plus, les déficits observés au locus L10 sont beaucoup moins forts qu'aux autres loci. La valeur maximale de Fis à ce locus est 0,225 alors qu'il peut atteindre 0,58 (populations CHU et TAH respectivement aux loci CG44 et CG49).

III-3/ Variabilité inter-populations :

La variabilité génétique entre populations est estimée au niveau multilocus par les calculs des indices F_{st} de Wright (1951). Les résultats par paires de populations ainsi que la significativité des valeurs sont donnés en annexe 9.

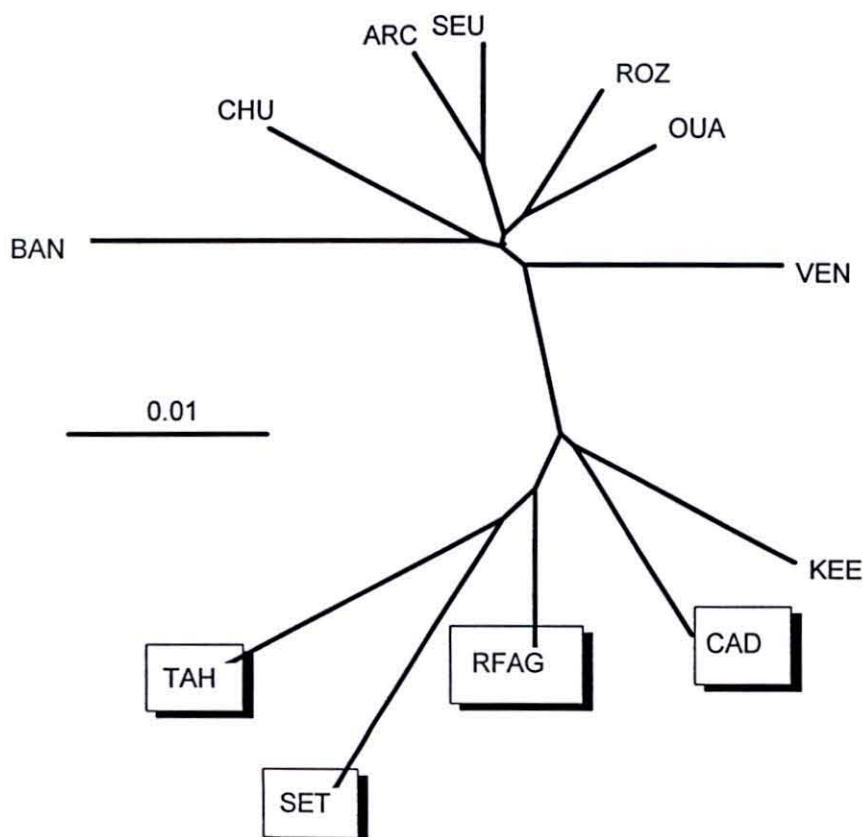
La différenciation observée entre paires de populations est faible avec un F_{st} de l'ordre de 0 à 0,04. Les F_{st} entre populations *Crassostrea gigas* (sans KEE) et *Crassostrea angulata* sont tous significatifs. Les populations européennes de *Crassostrea angulata* et Taïwan présentent pour la plupart des valeurs soit faiblement significatives (Faro/Taïwan et Cadix/Setubal) soit non significatives. C'est le cas des paires de populations suivantes : Faro avec Tahaddart ; Setubal avec Tahaddart, Faro et Taïwan.

Les F_{st} sont significatifs entre toutes les paires de populations *Crassostrea gigas* à l'exception de deux populations françaises Arcachon et Seudre seulement séparées d'une centaine de kilomètres ainsi que les populations Oualidia (OUA) avec Brest (ROZ) présentant une valeur quasi-nulle, résultat surprenant étant donné la situation des deux populations.

Une distance génétique quantifie le degré de divergence génétique entre unités taxonomiques (populations, espèces) prises deux à deux. Une matrice de distance de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) (annexe 10) a été calculée sur ces populations à partir du logiciel Genetix et a permis la réalisation d'un arbre de distances par neighbor-joining (figure 2).

Figure 2 Arbre obtenu par neighbor-joining à partir des données microsatellites

Les populations encadrées sont des populations *Crassostrea angulata*, les autres sont des populations *Crassostrea gigas*.

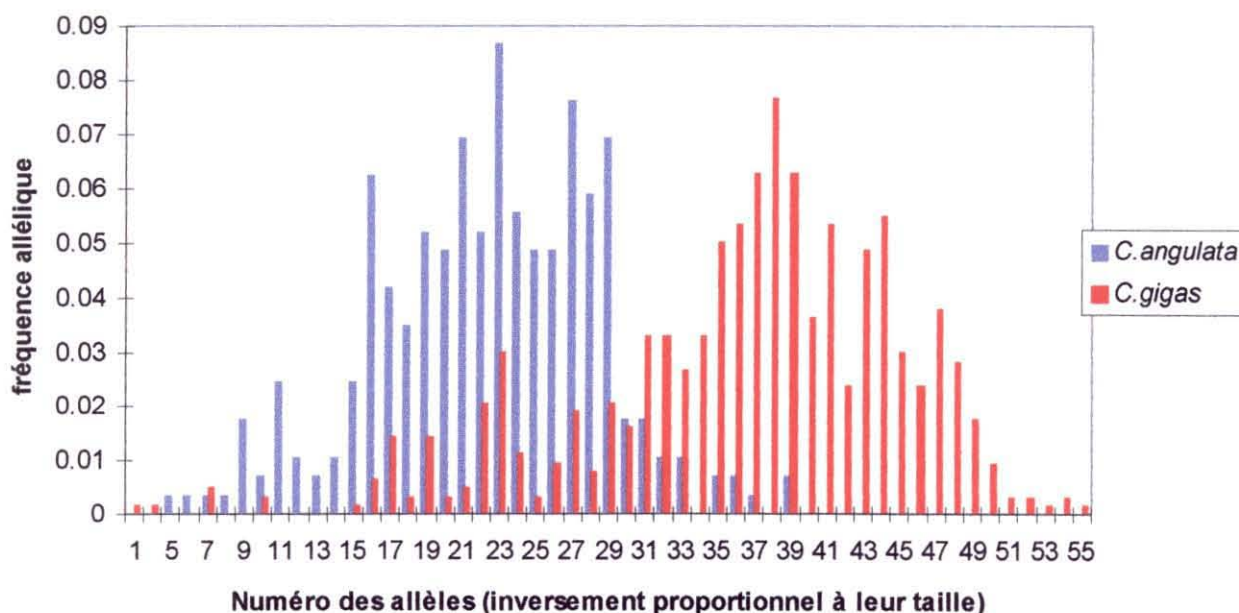


III-4/ Différenciation *Crassostrea gigas* - *Crassostrea angulata* :

L'étude des fréquences alléliques à chaque locus chez *Crassostrea gigas* puis *Crassostrea angulata* amène à la réalisation d'histogrammes exprimant la fréquence des allèles en fonction de leur taille respective. L'exemple du locus CG44 est donné en figure 3, les histogrammes aux autres loci sont en annexes 11, 12 et 13.

Pour ce faire, toutes les populations, au sein de chaque taxon, sont groupées en une seule afin de procéder au calcul des fréquences alléliques dans deux pôles distincts et les comparer. Au vu des résultats (figures 1 et 2), la population KEE (Taïwan) est insérée dans le regroupement *C. angulata*. On constate que sur un loci (CG 44) une nette différenciation dans la taille des allèles apparait entre les deux taxons : 38% des allèles présents chez *Crassostrea gigas* sont absents chez *Crassostrea angulata* et 15% dans le sens inverse. *Crassostrea angulata* ne présente que des allèles grands comparativement à *Crassostrea gigas* dont les allèles se répartissent sur toute la courbe avec une prédominance au niveau des petites tailles alléliques. Sur le locus CG 108, les résultats vont dans le même sens avec 24% des allèles présents chez *Crassostrea gigas* et absents chez *Crassostrea angulata*. Par contre sur les deux autres loci, à savoir CG 49 et L10, les allèles sont présents sur à peu près toute la distribution des tailles. Le pourcentage d'allèles présents chez l'un des deux taxons et absents chez l'autre ne dépasse pas 11%.

Figure 3 Répartition des fréquences alléliques au locus CG44 en fonction de la taille des allèles



Le test non paramétrique de Wilcoxon est utilisé pour tester l'homogénéité des distributions aux deux taxons. Les résultats obtenus sont :

CG44	19,70	*** / Très significatif
CG108	13,40	*** / Très significatif

CG49	8,55	*** / Très significatif
L10	1,13	Non Significatif

La distribution des allèles est bien significativement différente entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* aux loci CG44, CG108 et CG49 (mais pas au locus L10).

IV/ DISCUSSION

IV-1/ Variabilité intra-population :

Le niveau observé de variabilité intra-population est très élevé. Les valeurs obtenues sont caractéristiques de loci microsatellites et traduisent un fort taux de mutation. En effet, le niveau de variabilité dépend surtout du taux et du mode de mutation par rapport aux effets de la dérive (Scribner et al., 1994). Cela peut sous-entendre que la population CHU (Corée du sud) a subi un important effet de dérive. En effet, elle présente un nombre d'allèles deux fois moindre comparativement aux autres populations (à niveau d'échantillonnage égal) et surtout à la population BAN (Pays de Galle) qui est une population d'écloserie.

La majorité des populations n'est pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg et présente des déficits en hétérozygotes communément observés sur des données allozymiques chez les bivalves marins (Singh et Green, 1984 ; Zouros et Foltz, 1984 ; Gaffney, 1994). L'explication majeure pour les allozymes, en dehors des hypothèses conventionnelles émises dans cette étude, est une sélection balancée avec une fitness des homozygotes et des hétérozygotes différente au stade larvaire (Singh et Green, 1984).

Le déséquilibre sous-entend le non-respect d'une des conditions nécessaires à l'équilibre de Hardy-Weinberg : panmixie et pangamie, dérive, sélection et migration négligeables. L'explication de ce déficit observé en hétérozygotes peut avoir plusieurs origines. L'hypothèse la plus avancée dans les études microsatellites, est la présence d'allèles nuls couplée à des éventuels artéfacts de lecture de gels. Les autres hypothèses, plus en retrait, sont la consanguinité, l'effet Wahlund, des phénomènes d'aneuploïdie ainsi qu'une éventuelle sélection envers les hétérozygotes.

La **consanguinité** annihile la condition de croisements aléatoires émise dans l'équilibre de Hardy-Weinberg. Il est donc logique que ce phénomène aboutisse à une réduction de l'hétérozygotie au sein d'une population puisque des allèles ont une probabilité plus grande de se rencontrer et de former des homozygotes. La notion de consanguinité est tout de même à nuancer sur un modèle d'étude comme l'huître. En effet, les caractéristiques majeures sont définies par des tailles de populations importantes, de fortes fécondités, une fécondation externe associée à des pontes simultanées et des phases de dispersion

gamétique et larvaire. Toutes ces particularités réduisent les possibilités de croisements consanguins. De plus, ce phénomène doit être considéré globalement, c'est-à-dire au niveau multilocus. En effet, la consanguinité affecte tout le génome et donc la réduction de fréquence des hétérozygotes devrait être observée aux quatre loci microsatellites. Deux populations, à savoir ROZ (Brest) et CHU (Corée de sud), présentent des Fis significatifs à tous les loci analysés. La consanguinité est une explication possible dans ces populations mais pourrait être rejetée quand les déficits en hétérozygotes n'apparaissent pas sur les quatre marqueurs.

A l'inverse, l'**effet Wahlund** peut expliquer un déficit apparent seulement sur une partie des loci. L'hypothèse de l'effet Wahlund suppose qu'il existe des sous-groupes à l'intérieur des populations et que ces sous-groupes sont différenciés. Ils peuvent co-exister dans une zone sans pour autant montrer d'échange d'individus (à l'état larvaire) et/ou de gamètes. Dans ce cas, la reproduction d'un groupe se fait sans contribution à celle du groupe voisin. Une génération de croisements aléatoires donnerait des fréquences de génotypes hétérozygotes plus faibles que ceux attendus à l'équilibre de Hardy-Weinberg (dans le cas de gènes multi-allèles). Cette réduction de l'hétérozygotie est appelée effet Wahlund. Cet effet n'est pas forcément observable à tous les loci, tout dépend des covariances des fréquences alléliques entre subdivisions. En théorie, des excès d'hétérozygotes peuvent apparaître, ce qui n'a pas été observé dans cette étude. Accepter l'hypothèse de sous-groupes différenciés à l'intérieur d'une population revient à dire que les Fis sont des F_{st} et donc à admettre qu'il y a des F_{st} de 0,01 à 0,58 dans ces populations. Or, le F_{st} entre populations n'est que de 0,04 au maximum, soit près de 10 fois moins. Cela n'est guère probable.

Pour expliquer le déficit en hétérozygotes aux loci enzymatiques, beaucoup d'auteurs émettent l'hypothèse d'une **sélection** éliminant une partie des hétérozygotes pendant la phase larvaire chez les mollusques (Singh et Green, 1984). Des phénomènes de liaison avec des gènes sélectionnés sont envisageables (Charlesworth, 1991) bien que l'hypothèse de sélection ne soit pas en accord avec la caractéristique majeure des microsatellites, à savoir la neutralité. L'explication génétique n'est pas complètement élucidée mais l'idée de co-ségrégation marqueurs neutres/gènes enzymatiques sélectionnés n'est pas à exclure. L'hypothèse envisagée serait plutôt une sélection par mortalité différentielle contre les hétérozygotes pendant la phase larvaire. Cependant, Bierne et *al.* (soumis) ont analysé une cohorte d'huîtres plates pendant toute la phase larvaire à l'aide de locus microsatellites et ont montré un avantage très précoce en faveur des hétérozygotes. Ces résultats remettent en question l'hypothèse de sélection balancée sur les loci allozymiques pour expliquer les déficits en hétérozygotes.

L'**aneuploïdie** est définie par l'existence de plus de deux chromosomes homologues (trisomie) ou par l'absence d'un ou des deux chromosomes d'une paire (monosomie, nullisomie). Le second cas est concevable pour expliquer un déséquilibre à Hardy-Weinberg. Thiriot-Quévieux (1986) a montré

l'existence d'un pourcentage d'aneuploïdie (de 9 à 26%) dans certaines cellules chez *Crassostrea gigas*, phénomène absent chez les autres. L'extraction d'ADN, à partir de cellules branchiales d'un individu donné, n'a pu être faite uniquement sur des cellules aneuploïdes, condition obligatoire à la non visualisation en PCR d'au moins un des deux allèles. Les résultats ne semblent pas être attribuables à ce phénomène.

Les **allèles nuls** correspondent à des allèles non détectables en PCR. Une notion d'ordre pratique à prendre en considération est la disparité dans la visualisation des allèles chez un individu. En effet, des différences importantes d'intensité de bandes sont observables sur les autoradiographies obtenues par impression sur un gel. Les bandes hautes correspondant aux allèles grands présentent des intensités beaucoup plus faibles que les bandes basses (ou allèles petits) dues à des phénomènes de compétition pendant la PCR favorisant les plus petits. Les allèles les plus grands peuvent alors ne pas être visualisés. Ce problème a été en partie effacé par une deuxième (et quelquefois une troisième) analyse de tous les homozygotes à chaque locus permettant la diminution d'environ un tiers du nombre d'homozygotes. Cette notion peut être dès lors supposée négligeable. A ces allèles non visibles liés à des problèmes de réactions de PCR s'ajoutent les allèles non amplifiés. Des mutations ponctuelles dans les zones amont et aval empêchant l'appariement des amorces de PCR suffisent à expliquer l'absence de bandes sur les gels (Callen et al., 1993). Des individus hétérozygotes sont lus homozygotes ce qui peut expliquer une partie du déficit de l'hétérozygotie observée. Cela suggère la présence d'homozygotes aux allèles nuls. Les individus sans résultat d'amplification sur un locus et non sur les autres sont supposés être des individus homozygotes à ces allèles. A noter que tous les individus non génotypés le sont aux autres loci. Une mauvaise extraction de l'ADN n'est donc pas envisageable pour expliquer l'absence de résultat. L'estimation des fréquences aux allèles nuls (notée r) est permise par deux méthodes. Chakraborty et al. (1992) puis Broofield (1996) ont estimé cette fréquence par des systèmes de calculs tenant compte de la différence hétérozygotie observée/hétérozygotie attendue ainsi que du nombre d'individus non amplifiés uniquement dans la méthode de Brookfield (1996). Trois résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 Exemples de calcul des fréquences intra-population aux allèles nuls selon deux méthodes

méthodes	population OUA, locus CG44, Fis=0,404***	population ROZ, locus L10, Fis=0,225***	population VEN, locus CG108, Fis=0,073*
r selon Chakraborty et al. (1992)	0,245	0,108	0,030
r selon Broofield (1996)	0,232 3 ind. non amplifiés	0,09 3 ind. non amplifiés	0,0289 aucun ind non amplifié

Le choix de trois populations à trois loci différents est simplement fait pour avoir une gamme de Fis significatifs. Les résultats sont similaires avec les deux méthodes et donnent des fréquences très fortes au moins pour la population OUA au locus CG44.

La question posée est le seuil nécessaire pour expliquer le déséquilibre observé à Hardy-Weinberg : quelle fréquence d'allèles nuls peut interpréter les forts déficits observés ? Les valeurs observées dans la population OUA donnent des fréquences aux allèles nuls de l'ordre de 0,24. Aucun autre allèle n'affiche une telle valeur (annexe 8). En conséquence, il est difficile d'envisager dans cet exemple la présence d'allèles nuls comme explication des déficits en hétérozygotes. Par contre, à des fréquences plus limitées (0,03 à la population VEN au locus CG108 ou 0,1 à la population ROZ au locus L10), cette hypothèse ne peut pas être rejetée.

En conclusion, les déséquilibres observés significatifs à Hardy-Weinberg toujours dans le sens d'un déficit d'hétérozygotes soumettent de nombreuses hypothèses. Aucune ne fait l'unanimité. Une combinaison de différentes explications est envisageable suivant la population et/ou le locus étudié. Un point important est à souligner : les valeurs moyennes observées de Fis chez les mollusques par des analyses microsatellites avoisinent 0,2 (P. Jarne, com. pers.). Les valeurs observées de Fis sur l'ensemble des populations ne sont pas en contradiction avec cette estimation.

IV-2/ Variabilité inter-populations :

Les études de génétique des populations suggèrent que la distribution de gènes neutres peut être affectée principalement par la dérive et le flux génique (Nauta et Weissing, 1996). Une autre force indissociable de l'outil moléculaire utilisé est la mutation. Le jeu des forces s'oppose. Le flux génique conduit à une homogénéisation entre populations. A l'inverse, la mutation et la dérive mènent à l'hétérogénéité génétique. Des conditions d'isolement, au moins partielles, un effectif efficace réduit temporairement laissant place à l'action de la dérive et des forts taux de mutation sur nos marqueurs suffiraient à expliquer des indices de différenciation génétique relativement élevés entre populations. Or, ils sont faibles mais tout de même suffisants pour suggérer une structuration génétique au sein de chaque taxon et plus encore entre taxons.

Les populations de *Crassostrea gigas* montrent une différenciation plus prononcée que les populations de *Crassostrea angulata* alors que les transferts commerciaux typiques à *C. gigas* s'opposent à la différenciation. La situation géographique peut l'illustrer. En effet, l'huître creuse portugaise a une répartition beaucoup plus réduite et l'échantillonnage est centré sur le détroit de Gibraltar. L'éloignement géographique maximum entre les populations données comme *Crassostrea angulata* n'excède pas 800

kilomètres. Au contraire, la répartition des populations de *Crassostrea gigas* est large. L'absence de différence significative entre deux populations françaises d'huîtres japonaises Arcachon et Seudre ($F_{st}=0,0012$) seulement séparées d'une distance géographique voisine de 150 kilomètres conforte l'idée d'une faible différenciation due au **flux génique**. La population Seudre donne des F_{st} faibles avec l'autre population française ROZ ($F_{st}=0,0045$), avec OUA ($F_{st}=0,007$) facilement explicables par les transferts d'huîtres effectués de Charente vers Oualidia, et des F_{st} plus fort (0,014) avec CHU (Corée) supportés par l'éloignement géographique. Précisons que Hozaki et Fujio (1986) ont estimé les capacités de migration actives de *Crassostrea gigas* (à l'état larvaire) à environ 50 kilomètres. Le flux génique se ferait plutôt par migrations passives (courants marins, cycles tidaux, transports d'adultes sur la coque des bateaux, échanges entre zones d'élevage ostréicole).

Le résultat de F_{st} quasi-nul entre ROZ (Brest) et OUA est surprenant. Les importations d'huîtres vers Oualidia proviennent de Charente. La population de l'Anse du Roz (Brest) est naturalisée à partir d'individus provenant également de Charente (vers les années 1975). Elles montrent plus de similitudes entre elles qu'avec la population Seudre (F_{st} significatifs). Le calcul du F_{st} multilocus puis monolocus indique une différence significative locus par locus alors que l'ensemble des F_{st} sommés donne une valeur multilocus proche de 0.

La dérive, associée à l'isolement géographique, et la mutation concourent à augmenter la diversité entre populations. L'action de la **dérive** sera d'autant plus importante que l'effectif de la population sera petit. Des mortalités massives (exemple : iridovirose chez *C. angulata*), la colonisation d'une zone vierge et création d'une nouvelle population (Smith et al., 1986) ou des repeuplements des stocks naturels (transplantations) traduisent des réductions d'effectifs au moins temporaires. Ces événements «bottlenecks» (ou goulots d'étranglement) passés et peut-être présents aboutissent au phénomène génétique nommé effet fondateur. Il en résulte une réduction de la variabilité génétique observée avec disparition de certains allèles et tendance à la fixation d'autres.

La **mutation** peut avoir une forte influence sur la divergence entre populations. Ceci est du au fort taux présent chez les marqueurs microsatellites. Son action peut être plus puissante que l'effet homogénéisant de la migration (Scribner et al., 1994).

Le positionnement de la population KEE (Taïwan) avec les populations d'huîtres portugaises est observé grâce aux données mitochondriales et microsatellites (figures 1 et 2). Il soulève plusieurs hypothèses :

- des échanges multiples entre les deux zones,

- l'introduction d'individus *Crassostrea angulata* sur les côtes de l'île de Taïwan,
- inversement, l'introduction d'individus d'origine asiatique sur les côtes sud de l'Europe.

La première hypothèse n'est pas envisageable car elle demanderait des importations massives auquel cas la littérature les mentionnerait. La seconde hypothèse est peu vraisemblable. Des données de séquençage du fragment 16S ribosomal sur quatre taxons du genre *Crassostrea* (l'origine asiatique de trois taxons est acceptée) démontrent les similitudes génétiques nettement plus prononcées entre *C. angulata* et *C. gigas* qu'entre *C. angulata* et les deux autres taxons japonais (*C. ariakensis* et *C. sikamea*) (Boudry et al., soumis). L'hypothèse soutenue est l'introduction ancienne (par les premiers navigateurs portugais) d'individus issus des côtes de Taïwan en direction du sud de l'Europe. Ces individus seraient donc à l'origine des populations de *C. angulata* actuelles (Boudry et al., soumis). Le scénario envisagé conduit à supposer un transfert d'un nombre restreint d'individus et donc émet l'hypothèse d'un effet fondateur marqué.

La séparation géographique des populations OUA (Oualidia) et TAH (Tahaddart) est faible (550 kilomètres). Cette population OUA se situe dans la zone de répartition *C. angulata*. L'arbre de distances (figure 2) les regroupe dans deux pôles différents. L'explication est l'activité ostréicole à l'origine d'importations de *Crassostrea gigas* dans la région de Oualidia depuis la Charente. La population TAH est un gisement naturel et se regroupe avec les populations de *C. angulata* (et OUA avec les populations *C. gigas*). Cela confirme la présence de ce taxon sur les côtes sud de l'Europe et nord de l'Afrique aux endroits indemnes de l'activité ostréicole.

Pour résumer, il faut souligner les faibles différenciations génétiques observées du fait de caractéristiques propres au modèle d'étude : de grandes tailles d'effectif de population, des fécondités élevées, les capacités de dispersion de l'espèce et du milieu marin et les transports liés à l'ostréiculture. Mais inversement, d'autres phénomènes tendent à augmenter les différences entre populations : la dérive et la mutation.

Une réelle structuration génétique (à l'inverse des résultats allozymiques) est montrée avec plusieurs échelons :

- la différenciation est plus forte inter-taxons que intra-taxon,
- la différenciation intra-*C. gigas* est plus importante qu'intra-*C. angulata*. L'explication de cette différence réside certainement dans la plus grande répartition géographique des populations *C. gigas*. Il apparaît au travers des distances génétiques un «respect» des distances géographiques tout au moins entre les populations dont les échanges commerciaux sont limités.

IV-3/ Différenciation *Crassostrea gigas* - *Crassostrea angulata* :

L'arbre obtenu par neighbor-joining est similaire à celui obtenu avec les données RFLP de l'ADN mitochondrial et discrimine *C. gigas* de *C. angulata*. Un tel recoupement des données entre deux types de marqueurs très différents (mode de transmission uniparental pour l'ADN mitochondrial) est le résultat le plus probant de cette étude. L'autre point clé est l'observation de différences jamais mises en évidence avec des allozymes (Mathers et al., 1974 ; Buroker et al., 1979 ; Mattiucci et Villani, 1983).

Deux regroupements attendus se détachent sur l'arbre : d'une part, les populations de *Crassostrea gigas* et d'autre part, celles de *Crassostrea angulata*. Le regroupement de la population Taïwan avec les populations de *Crassostrea angulata* est à nouveau mis en évidence. Les valeurs de F_{st} sont plus fortes inter-taxons que intra-taxon. Enfin, la distribution des fréquences alléliques en fonction des tailles des allèles est significativement différente entre les deux taxons sur trois loci. L'ensemble de ces résultats souligne une différenciation *Crassostrea gigas* - *C. angulata*.

Une différence dans la taille des allèles présente aux deux taxons est très marquée au loci CG44 et CG108. *Crassostrea gigas* possède à peu près tout le panel d'allèles à chaque locus alors que *Crassostrea angulata* est restreinte aux allèles grands. Différentes explications peuvent être formulées :

- L'action de la dérive chez *Crassostrea angulata* aurait entraîné une perte de variabilité. L'hypothèse émise dans le paragraphe IV-2, à savoir l'introduction d'huîtres asiatiques au sud de l'Europe à l'origine des populations *C. angulata* soumet une alternative. Cette introduction a certainement eu lieu à partir de peu d'individus provoquant une réduction importante du nombre d'allèles.

Cette notion peut être couplée à un mode de mutation différent. Après cette perte d'allèles, un taux de mutation différentiel, vers l'augmentation du nombre de répétitions chez *C. angulata* et pas chez *C. gigas*, pourrait démontrer la répartition des allèles. Une question reste en suspens : comment expliquer alors le regroupement de KEE avec les populations *C. angulata* ?

- Une autre hypothèse serait une différence du taux de mutation des marqueurs suivant les deux taxons. Un taux plus fort chez *C. gigas* conduirait à la présence d'un nombre plus élevé d'allèles.

Ces deux marqueurs montrent une discrimination par présence/absence d'allèles et par une répartition différente des fréquences aux allèles communs. La différence observée au locus CG49 est uniquement dans la répartition des fréquences alléliques suivant les tailles des allèles. Comment expliquer alors l'observation d'une homogénéité génétique au locus L10 entre les deux taxons ? Entrevoir une sélection différentielle entre *C. angulata* et *C. gigas* à trois loci est très hasardeux. Cela supposerait un phénomène «d'autostop» (hitch-hiking) de ces trois loci avec des gènes sélectionnés. Le locus L10 a un motif $(AG)_n$. Les autres microsatellites ont un motif $(CA)_n$. Il est remarquable qu'une différence apparaisse aux trois marqueurs présentant le même motif. Est-il concevable d'imaginer plus de mutations sur un motif répété

que sur un autre ? Si oui, le temps écoulé de séparation n'est pas suffisant au locus L10 pour observer une différence entre taxons.

V/ CONCLUSION

Les études de génétique des populations visant à statuer sur les définitions taxonomiques de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* ne donnent pas des résultats similaires. L'uniformité des caractères morphologiques et physiologiques et l'homogénéité génétique observée au niveau allozymique sont en contraste avec les résultats du polymorphisme mitochondrial et des microsatellites. La bonne distinction de *C. gigas* et *C. angulata* par ces deux types de marqueurs démontre une réelle différenciation génétique. Le regroupement de la population taïwanaise avec les populations *C. angulata* du sud de l'Europe porte à croire en l'introduction d'individus *C. gigas* issus d'Asie en direction de l'Europe. Cet évènement pourrait remonter à environ cinq siècles (Boudry et *al.*, soumis). L'hypothèse principale est donc l'existence d'une seule espèce en accord avec les similitudes morphologiques, physiologiques, allozymiques et l'inter-croisement naturel. Les différences observées sur des marqueurs plus variables sont explicables par le temps de séparation propre à l'action de la dérive et donc à la divergence donnant des populations *Crassostrea angulata* génétiquement différenciées de *Crassostrea gigas*. Les échanges de *Crassostrea gigas* dans un cadre commercial (exemple : importations d'huîtres originaires du bassin de Marennes-Oléron à destination de Oualidia au Maroc) augmentent le flux génique et limitent les divergences observables par l'adaptation locale à l'environnement. On peut supposer que ces raisons expliquent la différenciation plus forte entre *C. angulata* et *C. gigas* qu'à l'intérieur même de chaque "taxon".

Un aspect génétique omis dans cette étude est l'hybridation. Aucune barrière n'apparaît au croisement *C. gigas* et *C. angulata*. Le mélange des génomes est attendu. La population Faro a été donnée comme un mélange de *C. gigas* et *C. angulata*. L'analyse de l'ADN mitochondrial a révélé la présence de quelques haplotypes caractéristiques de *C. gigas*. Le reste des individus est typé *C. angulata*. Un résultat attendu pourrait être l'apparition d'allèles petits dans la population Faro au locus CG44. Malheureusement, il n'est pas possible avec le nombre d'individus analysés d'observer un éventuel effet de quelques individus *C. gigas* dans une population *C. angulata*.

Des questions restent en suspens. Quel est le pourcentage d'individus «hybrides», si croisement il y a ? Comment la composition de tel génome évolue-t-elle ? Y-a-t-il un avantage ou vigueur hybride ?

L'utilisation des marqueurs hypervariables se révèle informative dans l'étude des relations génétiques entre l'huître japonaise et portugaise. Le faible polymorphisme, observé auparavant, incitait à les utiliser. La conclusion générale est l'apport positif des microsatellites exprimant des résultats cohérents en regard de ceux obtenus avec les marqueurs mitochondriaux.

L'évolution de ce sujet peut être envisagée à plusieurs niveaux :

- La ségrégation mendélienne de ces marqueurs microsatellites doit être vérifiée en étudiant les descendants de populations déjà analysées. Une génération G1 et une G2 sont en élevage au laboratoire de La Tremblade à partir de parents originaires des populations Arcachon et Seudre. Une biopsie suivie d'une extraction d'ADN de ces individus apporterait le matériel d'étude nécessaire.

- Le séquençage d'au moins un allèle par locus est prévu dans le but d'obtenir le nombre de répétitions de cet allèle. Cette connaissance permettrait de déterminer toutes les tailles alléliques. Ce travail pourrait aussi permettre d'entrevoir l'existence ou non d'homoplasie et essayer de confirmer la présence d'allèles nuls.

- L'analyse élargie avec un échantillonnage plus vaste, notamment avec une population japonaise, et plus de marqueurs microsatellites (deux loci sont dès maintenant utilisables et la mise au point de deux autres est à réaliser) ainsi que l'analyse complète des populations échantillonnées en RFLP mitochondrial permettrait d'affiner l'étude et de confirmer les résultats observés.

- Une des caractéristiques des microsatellites est leur conservation entre espèces proches. L'idée est de tester les marqueurs utilisés dans cette étude sur d'autres espèces d'huîtres creuses afin de voir si l'amplification est possible. A titre anecdotique, le test d'un individu de l'espèce *Crassostrea virginica* sur le marqueur CG44 ne donne aucun résultat positif. Il serait intéressant de tester les deux espèces du complexe asiatique dans lequel se situe *Crassostrea gigas* à savoir *C. ariakensis* et *C. sikamea*.

BIBLIOGRAPHIE

- AMOS, W., S.J. SAWCER, R.W. FEAKES and D.C. RUBINSZTEIN, 1996. Microsatellites show mutational biases and heterozygote instability. *Nature Genetics*, 13 : 390-391.
- BARNABE, G., 1986. *Aquaculture*, volume 1. Lavoisier. 1115 pp.
- BIERNE, N., S. LAUNEY, Y. NACIRI-GRAVEN and F. BONHOMME. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Soumis à Genetics*.
- BRITTEN, R.J. and D. KOHNE, 1968. Repeated sequences in DNA. *Sciences*, 161 : 529-540.
- BROOKFIELD, J.F.Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455.
- BOUDRY, P., S. HEURTEBISE, B. COLLET, F. CORNETTE and A. GERARD. Genetic differentiation between Portuguese [*Crassostrea angulata* (Lamarck)] and Pacific [*Crassostrea gigas* (Thunberg)] oyster populations, as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Soumis à Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- BOUGRIER, S., G. RAGUENES, E. BACHERE, G. TIGE and H. GRIZEL, 1986. Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France, résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. Angulata* - *C. Gigas*. *Conseil international pour l'exploitation de la mer*, 10 pp.
- BUROKER, N.E., W.K. HERSHBERGER and K.K. CHEW, 1975. Genetic variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of the fisheries research board of Canada*, 32(12) : 2471-2477.
- BUROKER, N.E., W.K. HERSHBERGER and K.K. CHEW, 1979. Populations genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology*, 54 : 157-169.
- BUROKER, N.E., W.K. HERSHBERGER and K.K. CHEW, 1979. Populations genetics of the family Ostreidae. II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Marine Biology*, 54 : 171-184.

- CALLEN, F.D., A.D. THOMPSON, Y. SHEN, H.A. PHILLIPS, R.I. RICHARDS, J.C. MULLEY and G.R. SUTHERLAND, 1993. Incidence and origin of "nul" alleles in the (AC)_n microsatellites markers. *Am. J. Genet.*, 52 : 922-927.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. and A.W.F. EDWARDS, 1967. Phylogenetic analysis : models and estimation procedures. *Amer. J. Hum. Genet.*, 19 : 233-257.
- CHAKRABORTY, R., M. DE ANDRADE, S.P. DAIGER and B. BUDOWLE, 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, 56 : 45-57.
- CHARLESWORTH, D., 1991. The apparent selection on neutral marker loci in partially inbreeding populations. *Genet. Res. Camb.*, 57 : 159-175.
- CHIKHI, L., 1995. Différenciation génétique chez *Sardinella aurita* et *S. maderensis*, allozymes et ADN mitochondrial. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie CURIE, Paris VI, 236 pp.
- COMPS M., BONAMI J.R., VAGO C. et A. CAMPILLO, 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C. R. Acad. Sci., Paris, Sciences de la vie*, 282 : 1991-1993.
- DAVID, P., 1996. Structures génétiques et relation génotype-phénotype en milieu marin : le cas du bivalve *Spisula ovalis*. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, 76 pp.
- DI RIENZO, A., A.C. PETERSON, J.C. GARZA, A.M. VALDES, M. SLATKIN and N.B. FREIMER, 1994. Mutational process of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 91 : 3166-3170.
- ELLEGREN, H., C.R. PRIMMER and B.C. SHELDON, 1995. Microsatellite "evolution" : directionality or biais ? *Nature Genetics*, 11 : 359-362.
- ELZIERE POPYANNI, P., 1993. Coquillages. Informations techniques des Services Vétérinaires français. 509 pp.
- ESTOUP, A., L. GARNERY, M. SOLIGNAC and J.M. CORNUET, 1995. 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., C.D. LARGIADER, E. PERROT and D. CHOURROUT, 1996. Rapid one-tube extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5(4) : 295-598.

- FOIGHIL, D.O., P.M. GAFFNEY and T.J. HILBISH, 1995. Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* (Wakiya)] oyster species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 192 : 211-220.
- FUJIO, Y., 1979. Enzyme polymorphism and population structure of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 30(1) : 32-42.
- FUJIO, Y., Y. NAKAMURA and M. SUGITA, 1979. Selective advantage of heterozygotes at catalase locus in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Japan J. Genetics*, 54(5) : 359-366.
- GAFFNEY, P.M., 1994. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves : More light ? In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, Ed A.R. Beaumont. Chapman & Hall, London, 146-153.
- GOLDSTEIN, D.B., A.R. LINARES, L.L. CAVALLI-SFORZA and M.W. FELDMAN, 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139 : 463-471.
- GOUDET, J., M. RAYMOND, T. DE MEEÛS and F. ROUSSET, 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144 : 1933-1940.
- GRIZEL, H. and M. HERAL, 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 47 : 399-403.
- HIS, E., 1972. Premiers éléments de comparaison entre l'huître portugaise et l'huître japonaise. *Bull. Inst. Pêches Marit.*, 219, 10 pp.
- INNIS, M.A. and D.H. GELFAND, 1990. Optimization of PCRs. In *PCR protocols : a guide to methods and applications*. Ed Academic Press, San Diego, 3-12.
- LIU, L.L., K. SOONG and C.P. CHEN, 1995. Allozyme variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* along the coast of Taiwan. *Zoological Studies*, 34(3) : 177-182.
- MATHERS, N.F., N.P. WILKINS and P.R. WALNE, 1974. Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. Gigas*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2 : 93-96.
- MATTIUCCI, S, and F. VILLANI, 1983. Studio elettroforetico dei sistemi gene-enzima in ostriche classificate come *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca : Ostreidae). *Parassitologia*, 25 : 21-27.

- MENZEL, R.W., 1974. Portuguese and Japanese oysters are the same species. J. Fish. Res. Board. Can., 31 : 453-456.
- MOORE, D., 1993. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1. Ed F.M. Ausubel, New York, unit 2-2 : 1-2.
- MORAGA, D., M. OSADA, A. LUCAS et T. NOMURA, 1989. Génétique biochimique de populations de *Crassostrea gigas* en France (côte atlantique) et au Japon (Miyagi). Aquatic Living Resources, 2 : 135-143.
- NAUTA, M.J. and F.J.WEISSING, 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci : implications for genetic differentiation. Genetics, 143 : 1021-1032.
- NIELSEN, J.L., C.A. GAN, J.M. WRIGHT, D.B. MORRIS and W.K. THOMAS, 1994. Biogeographic distributions of mitochondrial and nuclear markers for southern steelhead. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5) : 281-293.
- OZAKI, H. and Y. FUJIO, 1985. Genetic differentiation in geographical populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. Tohoku Journal of Agricultural Research, 36(1) : 49-61.
- PAGE, R. D. M., 1996. TREEVIEW : An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences, 12 : 357-358.
- PEMBERTON, J.M., J. SLATE, D.R. BANCROFT and J.A. BARRETT, 1995. Non amplifying alleles at microsatellites loci : a caution for parentage population studies. Molecular Ecology, 4 : 249-252.
- PRESA, P., F. KRIEG, A. ESTOUP et R. GUYOMARD, 1994. Diversité et gestion génétique de la truite commune : apport de l'étude du polymorphisme des locus protéiques et microsatellites. Genet. Sel. Evol., 26 : 183-202.
- RASSMAN, K., C. SCHLOTTERER and D. TAUTZ, 1991. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction base DNA fingerprinting. Electrophoresis, 12 : 113-118.
- RUZZANTE, D.E., C.T. TAGGART, D. COOK and S. GODDARD, 1996. Genetic differentiation between inshore and offshore atlantic cod (*Gadus morhua*) off newfoundland : microsatellite DNA variation and antifreeze level. Can. J. Fish Aquat Sci., 53 : 634-645.
- SAITOU N. and M. NEI, 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstruction phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4(4) : 406-425.

- SCRIBNER, K.T., J.W. ARNTZEN and T. BURKE, 1994. Comparative analysis of intra- and interpopulation genetic diversity in *Bufo bufo*, using allozymes, single-locus microsatellite, minisatellite, and multilocus minisatellite data. *Molecular Biology Evolution*, 11(5) : 737-748.
- SHRIVER, M.D., L. JIN, R. CHAKRABORTY and E. BOERWINKLE, 1993. VNTR allelic frequency distributions under the stepwise mutation model - a computer simulation approach. *Genetics*, 134 : 983-993.
- SINGH, S.M. and R.H. GREEN, 1984. Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. *Malacologia*, 25(2) : 569-581.
- SMITH, P.J., H. OZAKI and Y. FUJIO, 1986. No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 20 : 569-574.
- SOKAL, R.R. and F.J. ROHLF, 1995 . *Biometry*, third edition. Ed. W.H. FREEMAN and Compagny, New York, 887 pp.
- TAUTZ, D. and M. RENZ, 1984. Simple sequences are ubiquitous components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids research*, 12 : 4127-4138.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C., 1986. Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). *Genetica*, 70 : 225-231.
- VALDES, A.M., M. SLATKIN and N.B. FREIMER, 1993. Allelic frequencies at microsatellite loci : the stepwise mutation model revisited. *Genetics*, 133 : 737-749.
- VIARD F., 1996. Autofécondation et migration en populations subdivisées : apport des marqueurs microsatellites chez le gastéropode *Bulinus truncatus*. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, 87 pp.
- WEIR, B.S. and C.C. COCKERHAM, 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- ZOUROS, E. and D.W. FOLTZ, 1984. Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oyster populations. *Developmental Genetics*, 4 : 393-405.

- ANNEXES -

- ✓ annexe 1 Systématique de *Crassostrea gigas* et *C. angulata*
- ✓ annexe 2 Quelques caractéristiques physiologiques, génétiques, écologiques et géographiques de *Crassostrea gigas* et *C. angulata*
- ✓ annexe 3 Répartition géographique des populations échantillonnées
- ✓ annexe 4 Schéma d'un marqueur microsatellite
- ✓ annexe 5 Méthodes d'extraction de l'ADN, phénol/chloroforme et chélex 5%
- ✓ annexe 6 Protocole expérimental d'utilisation des microsatellites
- ✓ annexe 7 Protocole expérimental d'utilisation des nouveaux microsatellites
- ✓ annexe 8 fréquences alléliques
- ✓ annexe 9 polymorphisme inter-populations
- ✓ annexe 10 matrice de distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967)
- ✓ annexes 11, 12, 13 histogrammes aux loci CG108, CG49 et L10 exprimant la fréquence allélique en fonction de leur taille

SYSTEMATIQUE DE CRASSOSTREA GIGAS ET C.ANGULATA

Invertébré

Embranchement :

Mollusque

Classe :

Bivalve - Lamellibranche

Ordre :

Filibranche

Sous-ordre :

Anisomyaria

Super-famille :

Oestreioidea

Famille :

Crassostreidea

Genre :

Crassostrea

Espèces :

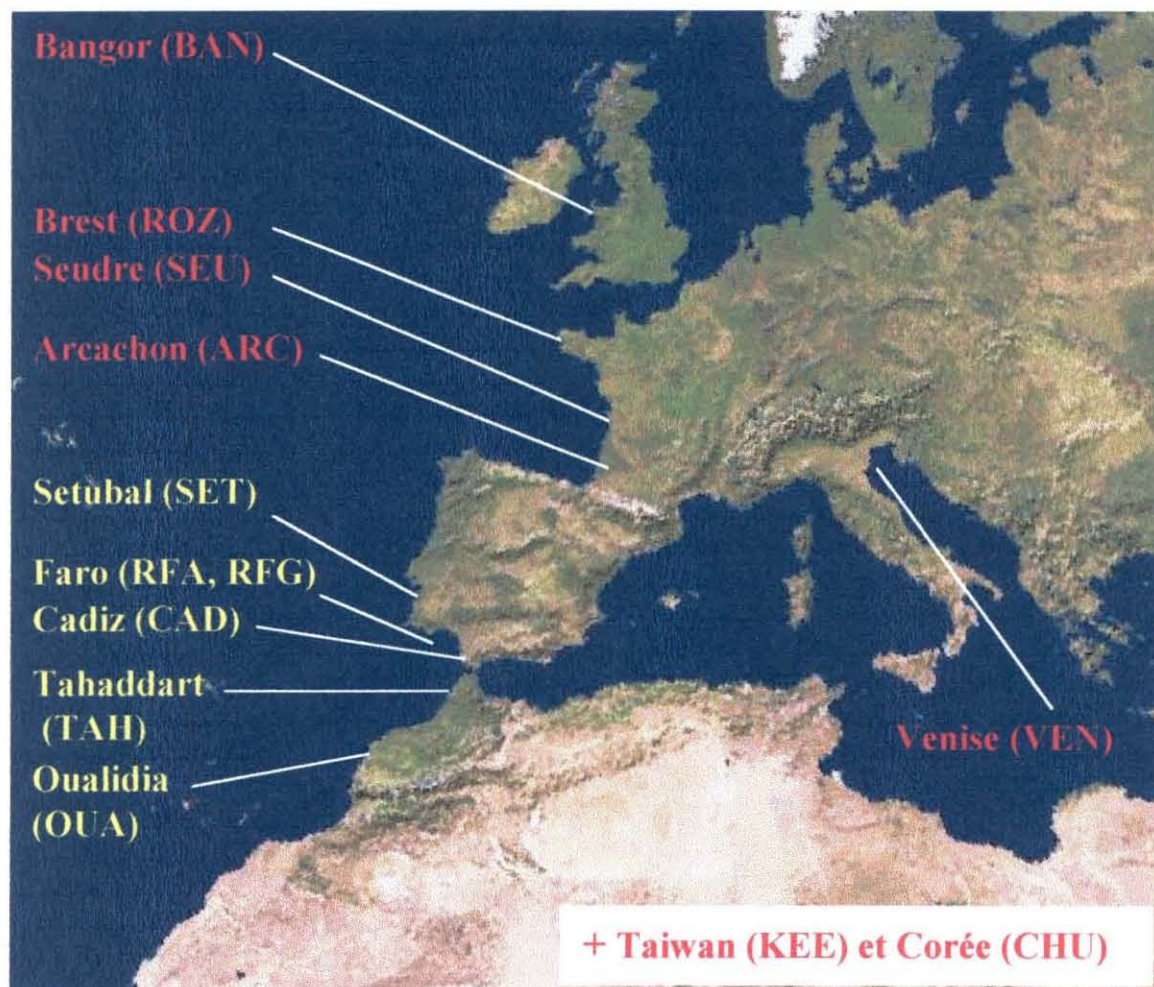
Crassostrea gigas
l'huître japonaise

Crassostrea angulata
l'huître portugaise

QUELQUES CARACTERISTIQUES

Familles	<i>Crassostreidea</i>	
Espèces	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Crassostrea angulata</i>
Nombre de chromosomes	2n=20	
Morphologie Taille	taille maximale=30 cm	
Fécondation	externe	
Reproduction	Hermaphrodisme alternatif, ponte maximale en juillet	
Fécondité moyenne	plusieurs dizaines de millions d'ovocytes	
Phase larvaire	ovipare, de 15 à 18 jours	
Mode de vie	Sédentaire, fixée	
Pathologie	sensibilité négative à l'iridovirus	sensibilité positive à l'iridovirus (mortalité)
Physiologie	croissance 2 fois supérieure à <i>C. angulata</i>	croissance plus faible associée à une activité de filtration réduite
Habitat	infralittoral jusqu'à 15 m de profondeur, fixée sur fonds meubles et durs exigences écologiques moins grandes : bonne résistance aux fortes turbidités, température moins élevée	infralittoral jusqu'à 15 m de profondeur, fixée sur fonds meubles et durs exigences écologiques plus grandes : température plus chaude de quelques degrés
Répartition géographique	<u>Foyer asiatique naturel</u> : Japon, Corée, Taïwan,... <u>introduite</u> en Europe de l'ouest, Amérique, Nouvelle-Zélande, Tasmanie, Afrique de l'ouest,...	Sud de l'Europe : Espagne, Portugal Nord de l'Afrique

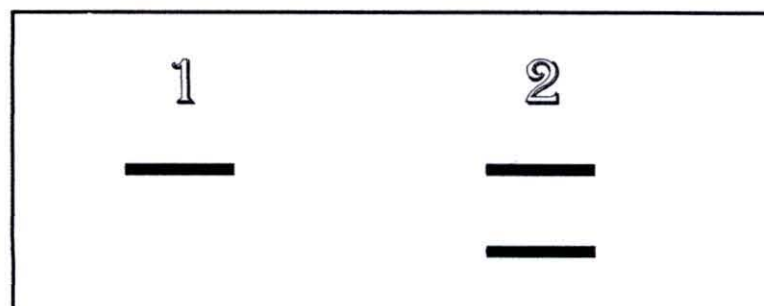
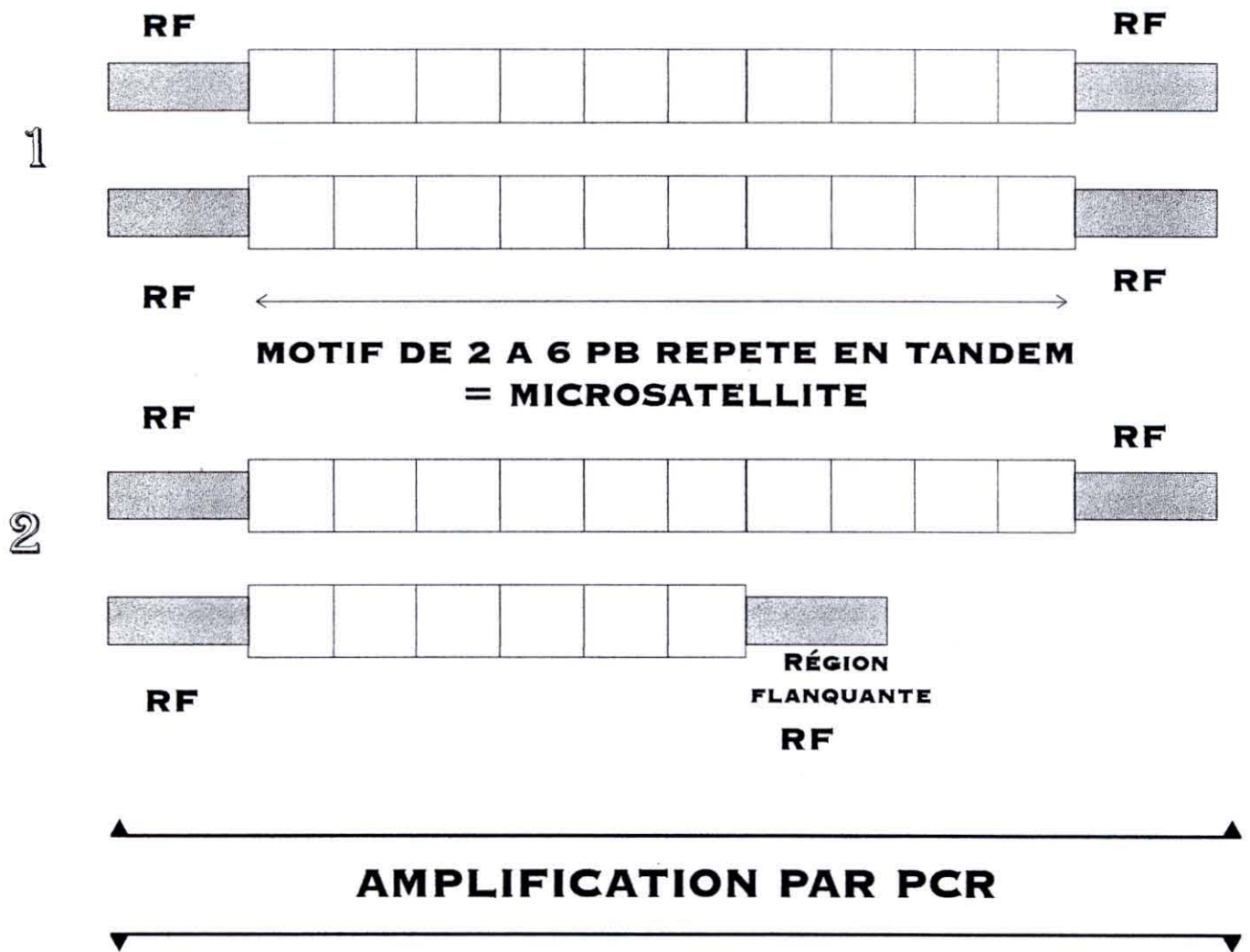
Répartition géographique des populations échantillonnées



population échantillonnée comme *Crassostrea gigas*

population échantillonnée comme *Crassostrea angulata*

Description schématique d'une séquence microsatellite



EXTRACTION D'ADN AU PHENOL/CHLOROFORME

Protocole :

- dans un tube eppendorf :
 - un fragment d'échantillon de branchie prélevé sur un individu (séché si conservé dans l'alcool)
 - 400 µl de tampon d'extraction (9,3g EDTA - 1,5g Tris - 2,5 g SDS - qsp H₂O 250 ml)
 - 5 µl de protéinase K (10 mg/ml)
 - (phase de dissociation des tissus et destruction des membranes cellulaires)
- 4 heures au minimum au bain-marie à 55°C
- ajout de 500 µl de phénol (pH = 8) qui est un déprotéinisant puissant
- centrifugation 10 minutes à 10000 tr/min à 4°C.
- prélèvement du surnageant (contenant les acides nucléiques)
- ajout de 500 µl de chloroforme (élimine les traces de phénol)
- centrifugation 10 minutes à 10000 tr/min à 4°C.
- prélèvement du surnageant
- ajout de 500 µl d'éthanol 100 (lavage des acides nucléiques)
- précipitation des acides nucléiques (ARN et ADN) au froid (au moins une heure à -20°C)
- centrifugation 10 minutes à 10000 tr/min à 4°C
- enlever l'éthanol, ajout de 400 µl d'éthanol 70 (lavage des acides nucléiques)
- centrifugation 10 minutes à 10000 tr/min à 4°C
- enlever l'éthanol, laisser sécher
- reprendre dans 50 à 200 µl d'H₂O mQ suivant la taille du culot (mélange ADN/ARN)

L'ADN natif ainsi obtenu est stocké à -20°C, une partie est diluée à 5% (stockée à +4°C) utilisable directement en PCR.

EXTRACTION D'ADN AU CHELEX 5%

Protocole :

- dans un tube eppendorf :
 - un micro-fragment d'échantillon de branchie prélevé sur un individu (séché si conservé dans l'alcool)
 - 400 µl de chélex 5% (5g de chélex - 100 ml d'H₂O mQ)

Annexe 5

30 μ l de TE 1X (pH = 7,5) (TE 100X = 121,1g Tris - 37,2 g EDTA - ajuster à pH 7,5 - qsp
H₂O mQ)

- 4 heures au minimum au bain-marie à 55°C
- 20 minutes au bain-marie à 100°C
- vortex 30 secondes, centrifugation 10 minutes à 10000 tr/min à 4°C
- prélèvement du surnageant

L'ADN natif ainsi obtenu est stocké à -20°C et directement utilisé en manipulation PCR.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'UTILISATION DES MARQUEURS MICROSATELLITES

● Marquage d'une des 2 amorces avec le radioélément ATP γ 33P, réalisé au bain-marie à 37°C durant 30 minutes.

Exemple pour le locus CG44 :

<i>Réactifs</i>	<i>volume (μl) pour une réaction PCR</i>	<i>concentration finale</i>	<i>concentration de la solution mère</i>
Amorce S ou AS	0,23	2,3 μ M	10 μ M
Tampon Kinase	0,1	1 X	10 X
Kinase	0,06	0,6 unités	10 unités/ μ l
ATP γ 33 P	0,1	1 mCi	10 mCi/ml
H ₂ O mQ	0,51		
Total	1		

● Ajout de l'amorce marquée au mélange de réactifs de fonctionnement de la PCR

<i>Réactifs</i>	<i>volume (μl) pour une réaction PCR</i>	<i>concentration finale</i>	<i>concentration de la solution mère</i>
Tampon Taq polymérase	1,5	1 X	10 X
MgCl ₂	1,8	3 mM	25 mM
dNTPs	1,5	0,2 mM	2 mM
Amorce AS ou S	0,21	0,14 μ M	10 μ M
Taq polymérase	0,05	0,017 unités	5 unités/ μ l
H ₂ O mQ	4,94		
Amorce S ou AS marquée	1	0,15 μ M	2,3 μ M
ADN	4		
Total	15		

Pour les deux autres loci CG108 et CG49, seules les concentrations de $MgCl_2$ changent et sont respectivement de 1 et 2 mM. Le volume annoncé de 4 μl d'ADN par puits est à considérer quand le matériel ADN est extrait par la technique phénol/chloroforme, sinon une quantité supérieure (6 à 9 μl) est nécessaire à partir d'ADN extrait au chélex 5%.

● Distribution des échantillons ADN sur une plaque PCR 96 puits (un individu dans un puits), et ajout dans chaque puits d'une partie du mélange amorce marquée-réactifs PCR (11 μl par puits) et d'une goutte d'huile.

● protocole de PCR :

- dénaturation initiale : 5 minutes à 94°C

- cycle de PCR (30 fois) : . dénaturation : 1 minute à 94°C
. hybridation des amorces ou annealing : 1 minute à une température spécifique à chaque locus microsatellite (tableau 3).

. élongation : 1 minute 45 secondes à 72°C.

- élongation finale : 5 minutes à 72°C.

● Ajout de 5 μl par puits de bleu de marquage (25 ml de formamide - 0.025g de xylène cyanol - 0.025 g de bleu de bromophénol - 1 ml d'Éthylène Diamine Tetraacétique Acide 0,5M) puis dénaturation des échantillons ADN à 94°C pendant 5 minutes.

● dépôt des échantillons (3,6 μl de chaque puits) sur un gel d'acrylamide 8% vertical (70ml d'acrylamide - 350 μl d'ammonium persulfate 10% - 70 μl de TEMED)

avec acrylamide : 210 g d'urée - 75 ml d'acrylogel - 50 ml TBE 10X - qsp 500 ml H_2O mQ

et TBE 10X : 162 g de Tris - 27,5 g d'acide borique - 50 ml d'EDTA 0,5M - qsp 1L H_2O mQ

● migration et séparation des fragments ADN sur gel sous puissance constante (50 W), la tension et l'intensité sont réglées de manière non limitante (respectivement 1900 V et 150 mA) dans un tampon TBE 0,5X.

● révélation sur plaque photographique. Le temps d'exposition est variable suivant la mesure des rayonnements radioactifs (en coups par seconde) du gel avant l'exposition.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'UTILISATION DES NOUVEAUX MICROSATELLITES

- Marquage d'une des 2 amorces avec le radioélément ATP γ 33P

<i>Réactifs</i>	<i>volume (μl) pour une réaction PCR</i>	<i>concentration finale</i>	<i>concentration de la solution mère</i>
Amorce S ou AS	0,03	0,4	10 μ M
Tampon Kinase	0,02	1 X	10 X
Kinase	0,01	0,5 unités	10 unités/ μ l
ATP γ 33 P	0,08	5 mCi	10 mCi/ml
H ₂ O mQ	0,02		
Total	0,15		

- Mélange des réactifs pour la PCR : (température d'hybridation des amorces = 55°C)

<i>Réactifs</i>	<i>volume (μl) pour une réaction PCR</i>	<i>concentration finale</i>	<i>concentration de la solution mère</i>
Tampon Taq polymérase	1	1 X	10 X
MgCl ₂	0,4	1 mM	25 mM
dNTPs	0,37	0,074 mM	2 mM
Amorce AS ou S	0,15	0,4 μ M	10 μ M
Taq polymérase	0,07	0,35 unités	5 unités/ μ l
H ₂ O mQ	2,61		
Amorce S ou AS marquée	0,4	0,03 μ M	2 μ M
ADN	5		
Total	10		

Ce protocole est utilisé en routine avec le locus L10 et est utilisable avec L8. La mise au point des 3 autres marqueurs n'est pas achevée. Les loci L16 et L48 demandent juste une augmentation de la spécificité (présence de bandes parasites) pouvant être réalisée par une élévation de la température d'hybridation des amorces dans le cycle de PCR (en manipulation froide sur gel d'agarose, l'amplification est observée jusqu'à 58°C pour le locus L16). Par contre, le locus L32 ne donne qu'une série de bandes ininterprétables.

FREQUENCES ALLELIQUES au locus CG44

CG44	RFAG	CAD	SET	KEE	TAH	OUA	BAN	ROZ	VEN	ARC	CHU	SEU
(N)	35	50	13	30	16	45	41	50	39	50	50	49
1											0,01	
4											0,01	
5				0,017								
6				0,017								
7	0,014										0,03	
8				0,017								
9		0,04			0,031							
10		0,02							0,026			
11	0,057		0,039	0,033								
12		0,01		0,033								
13				0,017	0,031							
14				0,033	0,031							
15	0,029	0,03	0,039	0,017						0,01		
16	0,029	0,13		0,05					0,053			
17	0,114	0,01	0,039	0,017	0,031	0,012		0,01	0,079	0,01		
18	0,029	0,01	0,039	0,017	0,156			0,01			0,01	
19	0,014	0,07		0,083	0,063	0,024		0,01	0,066	0,01		
20	0,057	0,03	0,115	0,067				0,02				
21	0,043	0,1	0,077	0,067	0,031	0,024			0,013			
22	0,057	0,04		0,05	0,125	0,024		0,03	0,066	0,03		
23	0,057	0,14	0,115	0,033	0,063			0,03	0,066	0,02	0,09	
24	0,057	0,04	0,154	0,05	0,031	0,048		0,01		0,01	0,01	
25	0,071	0,04		0,017	0,125				0,013			0,01
26	0,086		0,077	0,05	0,094	0,012	0,024			0,01		0,021
27	0,014	0,17	0,077	0,033		0,048		0,01	0,04	0,01	0,01	0,021
28	0,057	0,02	0,154	0,1	0,031	0,012		0,02			0,01	0,01
29	0,043	0,06	0,077	0,1	0,094	0,036	0,012	0,03	0,013		0,04	0,01
30	0,043				0,063	0,048		0,01	0,013	0,01	0,03	
31	0,043			0,033		0,012	0,024	0,03	0,026	0,04	0,07	0,021
32	0,014	0,01		0,017		0,036		0,08	0,013	0,02	0,02	0,052
33	0,029	0,01				0,036		0,02	0,013	0,02	0,04	0,052
34						0,048		0,06	0,04	0,04	0,02	0,021
35	0,014			0,017		0,119		0,08	0,026	0,04	0,04	0,042
36	0,014	0,01				0,083		0,09	0,026	0,01	0,12	0,031
37				0,017		0,107		0,07	0,026	0,03	0,14	0,052
38						0,012	0,073	0,06	0,066	0,08	0,19	0,042
39	0,014	0,01				0,048	0,207	0,06	0,026	0,01	0,06	0,042
40						0,036	0,085	0,01	0,053	0,03	0,01	0,042
41						0,036	0,061	0,02	0,079	0,08		0,104
42						0,012	0,049	0,01	0,066	0,02		0,021
43						0,012	0,024	0,11	0,013	0,05	0,01	0,104
44						0,06	0,183	0,02		0,06		0,073
45						0,012	0,11	0,03		0,02		0,042
46						0,024	0,037	0,02		0,06		0,021
47							0,012		0,026	0,13		0,083
48							0,098			0,05	0,02	0,031
49									0,04	0,06		0,021
50								0,02		0,01	0,01	0,021
51								0,01				0,01
52						0,024		0,01	0,013	0,02		
H exp.	0,943	0,906	0,896	0,944	0,908	0,942	0,88	0,943	0,949	0,944	0,905	0,943
H obs.	0,857	0,54	0,692	0,767	0,875	0,571	0,659	0,7	0,632	0,88	0,38	0,792

FREQUENCES ALLELIQUES au locus CG108

CG108 (N)	RFAG 35	CAD 50	SET 13	KEE 30	TAH 16	OUA 45	BAN 41	ROZ 50	VEN 39	ARC 50	CHU 50	SEU 49
1						0,011						
3						0,011						
5	0,015										0,011	
8											0,022	
9						0,011						
10										0,01		
11		0,02									0,022	
12		0,02									0,022	
13		0,02		0,017								
14		0,04									0,011	
15		0,04									0,011	
16		0,04	0,039	0,05	0,031	0,011			0,014	0,04		
17	0,029	0,02	0,039	0,033	0,031							0,054
18		0,03							0,027			0,022
19	0,059	0,07	0,115	0,05	0,031	0,011		0,01		0,01	0,011	0,041
20	0,015	0,04	0,039	0,05	0,063			0,052		0,04	0,033	0,02
21	0,044	0,07	0,115	0,083	0,031	0,022			0,027	0,02	0,022	0,02
22	0,015	0,1	0,077	0,017	0,125	0,011	0,024	0,021		0,03		0,041
23	0,059	0,07	0,231	0,067	0,094	0,033			0,014	0,01	0,011	0,051
24	0,088	0,04	0,077	0,033		0,033		0,021	0,068	0,04	0,022	0,02
25	0,044	0,07	0,077	0,05	0,031	0,022	0,012	0,01	0,068	0,01	0,011	0,041
26	0,015	0,07	0,039	0,05	0,063	0,033	0,061	0,021			0,022	0,01
27	0,088	0,01	0,039	0,017	0,063	0,044		0,021	0,014	0,02	0,011	0,031
28	0,044	0,04		0,05	0,031	0,056	0,061	0,031	0,041	0,03	0,011	0,061
29	0,044	0,05	0,077	0,05	0,125	0,056		0,021	0,041	0,02	0,054	0,041
30	0,132	0,02		0,133	0,031	0,022	0,085	0,021	0,054	0,05	0,022	0,02
31	0,059		0,039	0,033		0,022	0,024	0,042	0,014	0,02	0,044	0,041
32	0,029	0,03				0,022		0,021			0,022	0,031
33	0,015	0,01		0,017		0,033		0,052	0,054	0,09	0,033	0,041
34				0,033	0,125	0,067		0,063	0,054	0,02	0,011	0,061
35	0,059	0,02		0,017		0,056		0,021	0,068	0,05	0,011	0,01
36		0,01		0,017		0,044		0,104	0,054	0,08	0,087	
37	0,074	0,01		0,017		0,011	0,024	0,031	0,054	0,04	0,054	0,01
38		0,01			0,063	0,033	0,159	0,063	0,054	0,06	0,065	0,01
39	0,015					0,067	0,122	0,052	0,108	0,01	0,054	0,01
40				0,05		0,044	0,012	0,073	0,027	0,04	0,011	0,031
41	0,015	0,01				0,011	0,061	0,01		0,05	0,011	0,051
42					0,063	0,056	0,073	0,083		0,02	0,044	0,02
43	0,015	0,02		0,017		0,089	0,207	0,031	0,027	0,02	0,033	0,01
44	0,029			0,017		0,011	0,061	0,031	0,027		0,033	0,01
45				0,017		0,011			0,014	0,01	0,033	0,02
46						0,022			0,014	0,05	0,022	0,102
47								0,01	0,027	0,01	0,011	0,01
48				0,017				0,042		0,02		0,041
49								0,021		0,01	0,011	0,051
50									0,014			
51								0,021		0,01		
52							0,012		0,014		0,011	0,01
53						0,011			0,014			
54										0,06		0,031
H exp.	0,936	0,948	0,888	0,943	0,918	0,955	0,887	0,949	0,948	0,954	0,961	0,955
H obs.	0,824	0,8	0,769	0,967	0,938	0,822	0,756	0,792	0,892	0,8	0,87	0,755

FREQUENCES ALLELIQUES au locus CG49

CG49 (N)	RFAG 35	CAD 50	SET 13	KEE 30	TAH 16	OUA 45	BAN 41	ROZ 50	VEN 39	ARC 50	CHU 50	SEU 49
1				0,033								
3				0,017								
7	0,029			0,017								
8									0,014			
9		0,01		0,017		0,023						
10						0,011						
11		0,03		0,05			0,025				0,061	
12		0,04				0,011			0,014			
13	0,029	0,07					0,025				0,01	
14		0,03			0,033	0,011	0,025	0,01	0,029	0,01	0,01	
15		0,02									0,061	
16	0,118	0,01			0,033	0,057	0,025	0,02		0,01	0,01	0,022
17		0,04				0,023	0,075	0,031			0,071	0,022
18	0,029		0,136		0,033	0,034	0,038	0,02	0,029			
19	0,044	0,06		0,017			0,05				0,01	0,011
20	0,059	0,01	0,136	0,017	0,033	0,023	0,013	0,02			0,02	
21	0,015	0,03					0,025		0,029	0,02	0,01	0,033
22	0,044	0,02			0,033			0,01		0,01		
23	0,029	0,02		0,1			0,063	0,01	0,029		0,041	0,022
24	0,044	0,07	0,046	0,033	0,067	0,011	0,013	0,041	0,043	0,02		0,011
25	0,015	0,05	0,136	0,1		0,023	0,15	0,031	0,029	0,02	0,061	0,011
26	0,118	0,03	0,091	0,033		0,023	0,113	0,02		0,01	0,031	0,011
27	0,015	0,09	0,046	0,1		0,023	0,025	0,02		0,01	0,031	0,011
28		0,02		0,017	0,1	0,046	0,013	0,02	0,1	0,01	0,071	0,065
29		0,04		0,017		0,034	0,025	0,02	0,029	0,01	0,01	0,044
30	0,029	0,04		0,033	0,033	0,011			0,029	0,02	0,031	0,011
31	0,015	0,01		0,083						0,02	0,02	0,011
32	0,088	0,01	0,091	0,017	0,133		0,013	0,031	0,029	0,02	0,071	0,033
33		0,03	0,046	0,05		0,034	0,013	0,02	0,057	0,041	0,02	0,011
34	0,044	0,03	0,091			0,023	0,038	0,01	0,014	0,01		0,011
35	0,015			0,05		0,08	0,013	0,041	0,014	0,041	0,01	0,022
36	0,015	0,03				0,023	0,038	0,031	0,057	0,02	0,02	0,011
37	0,015	0,04		0,05		0,091	0,013	0,031	0,014	0,02	0,02	0,022
38	0,044		0,046		0,167			0,071	0,071	0,031	0,061	0,044
39				0,017	0,067	0,046	0,05	0,031		0,01	0,061	
40	0,044		0,136		0,133		0,025	0,01	0,014	0,041	0,01	0,054
41	0,015	0,01		0,033		0,023		0,031		0,174	0,051	0,087
42		0,03			0,033	0,011		0,051	0,071	0,061	0,02	0,12
43		0,03		0,033		0,023	0,025	0,041		0,071	0,02	0,044
44								0,01	0,043	0,01		0,076
45		0,02				0,034	0,013		0,014	0,031	0,061	0,022
46		0,01				0,034		0,02	0,014	0,051		0,022
47				0,033	0,033	0,011		0,061		0,061		0,011
48	0,029	0,01				0,011		0,051				0,054
49							0,025	0,031		0,01		0,022
50	0,059					0,068	0,013	0,051	0,014	0,02		
51		0,01		0,017		0,023		0,041	0,029			0,011
52					0,067	0,057		0,031	0,086	0,041		0,011
53				0,017		0,034		0,01	0,029	0,01		
54						0,011	0,025	0,02	0,057	0,051	0,01	0,033
H exp.	0,939	0,957	0,893	0,942	0,904	0,956	0,938	0,963	0,949	0,939	0,951	0,948
H obs.	0,412	0,96	0,546	0,667	0,4	0,727	0,575	0,776	0,714	0,837	0,796	0,652

FREQUENCES ALLELIQUES au locus L10

L10 (N)	RFAG 35	CAD 50	SET 13	KEE 30	TAH 16	OUA 45	BAN 41	ROZ 50	VEN 39	ARC 50	CHU 50	SEU 49
1						0,011		0,01				
3		0,01										
5											0,02	
6								0,01			0,01	
7				0,017		0,022				0,01		
8				0,017							0,01	0,01
9		0,02		0,017		0,011	0,024	0,02	0,013		0,01	
10				0,017					0,013			
11									0,013	0,03	0,01	
12				0,017		0,022					0,02	0,01
13						0,011	0,049			0,01		
14					0,031	0,022		0,051		0,02	0,03	
15	0,014	0,02		0,017				0,01				0,01
16	0,014			0,017	0,031			0,031				
17	0,014			0,017	0,031	0,022	0,012		0,013			0,01
18	0,043	0,031					0,012			0,01		
19					0,031	0,022	0,012	0,02		0,01		0,01
20	0,014		0,039	0,035	0,031	0,011	0,073	0,02		0,01		
21						0,033	0,037	0,01	0,013	0,03	0,01	0,01
22	0,043	0,031	0,039	0,017				0,031	0,013		0,02	0,02
23		0,01			0,063			0,031	0,013	0,01	0,03	0,01
24	0,057	0,051		0,069				0,051		0,04	0,01	0,02
25	0,071	0,02	0,039	0,017	0,125	0,022		0,082	0,013	0,02		0,02
26	0,014	0,031		0,017	0,063	0,067	0,024	0,031		0,03	0,02	0,051
27	0,029	0,051		0,035	0,031	0,033	0,061	0,02	0,039	0,01	0,02	0,031
28	0,043	0,031		0,035	0,031	0,033	0,049	0,041	0,026	0,01	0,06	0,061
29	0,029	0,01	0,192	0,017	0,063	0,044	0,11	0,051	0,039		0,02	0,061
30	0,129	0,041	0,077	0,086		0,033	0,024	0,051	0,013	0,05	0,04	0,031
31	0,029	0,051	0,039		0,063	0,033	0,061	0,031	0,013	0,05	0,01	0,041
32	0,043	0,041			0,063	0,044	0,024	0,041	0,026	0,02	0,06	0,041
33	0,029	0,051	0,115	0,052	0,031	0,033	0,085	0,02	0,103	0,07	0,08	0,051
34	0,071	0,041	0,039		0,125	0,089	0,037	0,051	0,026	0,02	0,08	0,01
35	0,043	0,01		0,069		0,011	0,024	0,031	0,026	0,04	0,03	0,071
36	0,014	0,061	0,039	0,035	0,031	0,044			0,103	0,04	0,02	0,031
37	0,057		0,077	0,035	0,063	0,022		0,051	0,039	0,04	0,01	0,031
38	0,029	0,051	0,039	0,035		0,011	0,049	0,031	0,039	0,05	0,06	0,041
39			0,039	0,017	0,031	0,022	0,024	0,01	0,051	0,04	0,02	0,02
40	0,029	0,051	0,077			0,022		0,031	0,013	0,06	0,03	0,031
41	0,014	0,02	0,039	0,121		0,044	0,024	0,031	0,064	0,02	0,01	0,031
42	0,057	0,031	0,039		0,031	0,033		0,02	0,051	0,02	0,02	0,02
43	0,014	0,01	0,039	0,035		0,033	0,024	0,01	0,064	0,02	0,01	0,02
44		0,01		0,052			0,024		0,09	0,03	0,04	0,01
45		0,02		0,035	0,031	0,011		0,01	0,026	0,01	0,01	0,02
46				0,017		0,022	0,049	0,01	0,013	0,01	0,06	0,02
47		0,051		0,017		0,022	0,012		0,013	0,02	0,04	0,02
48	0,043	0,031		0,017		0,011		0,02		0,01		
49	0,014	0,01	0,039			0,011	0,012	0,02		0,04	0,01	0,031
50						0,011				0,05	0,04	0,041
51		0,102				0,044	0,061	0,01	0,026	0,04	0,02	0,041
53												0,01
H exp.	0,946	0,954	0,914	0,949	0,934	0,962	0,946	0,962	0,945	0,962	0,958	0,963
H obs.	0,971	0,857	1	0,897	1	1	0,951	0,755	0,872	0,98	0,84	0,918

Polymorphisme inter-populations

Calculs des Fst (Weir et Cockerham, 1984) multilocus par paires de populations et test de significativité

pop	CAD	SET	KEE	TAH	OUA	BAN	ROZ	VEN	ARC	CHU	SEU
RFAG	0.0152 ***	0.0019 NS	0.0053 *	0.0075 NS	0.01370 ***	0.03687 ***	0.01410 ***	0.01535 ***	0.0216 ***	0.0209 ***	0.0188 ***
CAD	0	0.0113 *	0.0077 *	0.0192 ***	0.0181 ***	0.0410 ***	0.0230 ***	0.0164 ***	0.0255 ***	0.0220 ***	0.0233 ***
SET		0	0.0053 NS	0.0058 NS	0.0213 ***	0.0411 ***	0.0236 ***	0.0220 ***	0.0316 ***	0.0269 ***	0.0231 ***
KEE			0	0.0167 ***	0.0121 ***	0.0339 ***	0.0139 ***	0.0116 ***	0.0179 ***	0.0181 ***	0.0165 ***
TAH				0	0.0149 ***	0.0442 ***	0.0123 **	0.0142 **	0.0259 ***	0.0211 ***	0.0178 ***
OUA					0	0.0214 ***	0,00001 NS	0.0056 **	0.0102 ***	0.0086 ***	0.007 ***
BAN						0	0.0252 ***	0.0279 ***	0.0303 ***	0.0263 ***	0.0261 ***
ROZ							0	0.0082 ***	0.007 ***	0.006 ***	0.0045 **
VEN								0	0.0085 ***	0.0170 ***	0.008 ***
ARC									0	0.0141 ***	0.0012 NS
CHU										0	0.0136 ***

Le Fst est estimé par bootstraps sur les données génotypiques et la valeur réelle est comparée à la distribution des valeurs estimées (avec le pourcentage de valeurs supérieures et de valeurs inférieures).

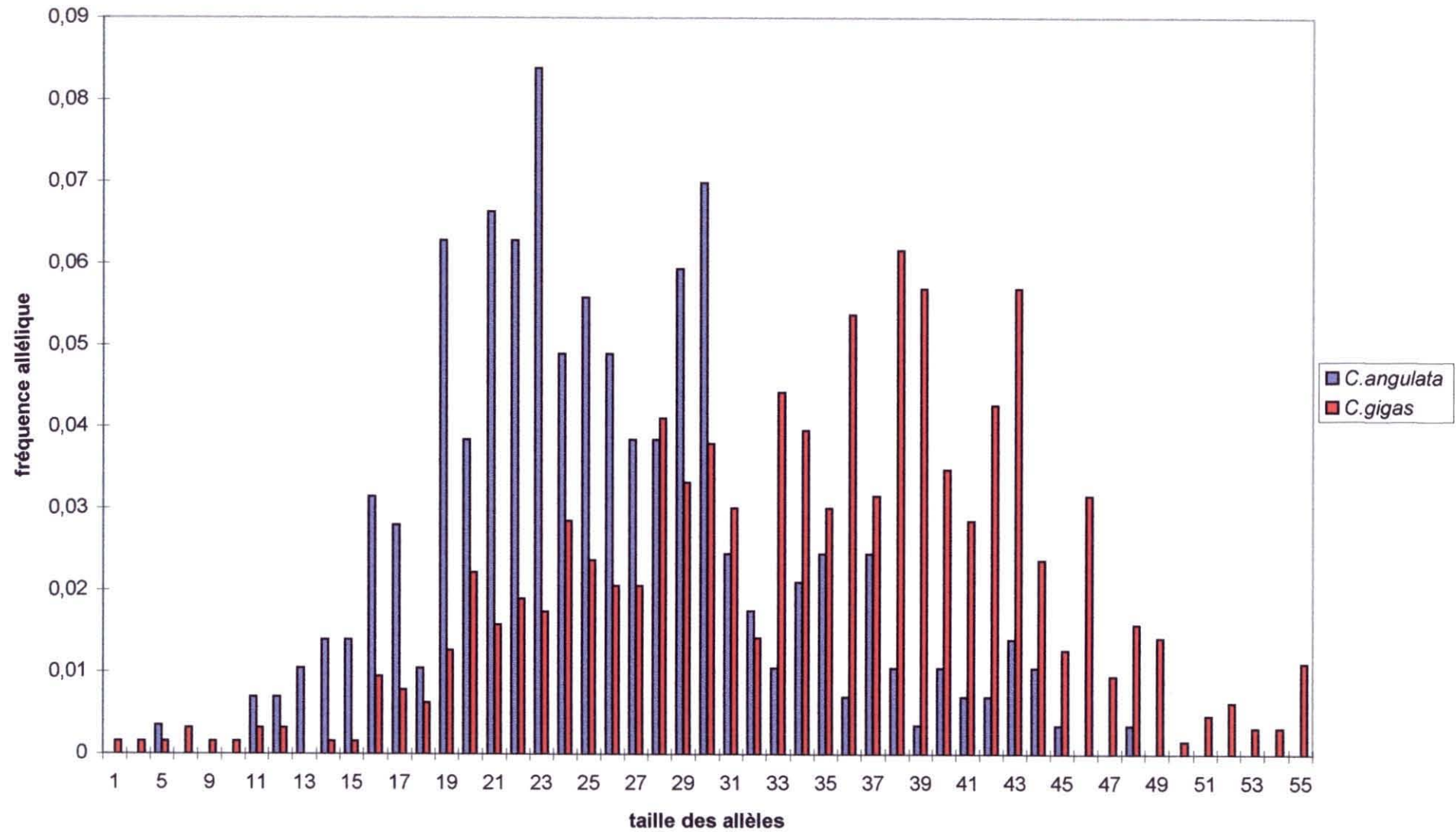
Quand le nombre de valeurs inférieures à la valeur réelle de Fst est : $\geq 0,05$ NS non significatif

$< 0,05$ * significatif

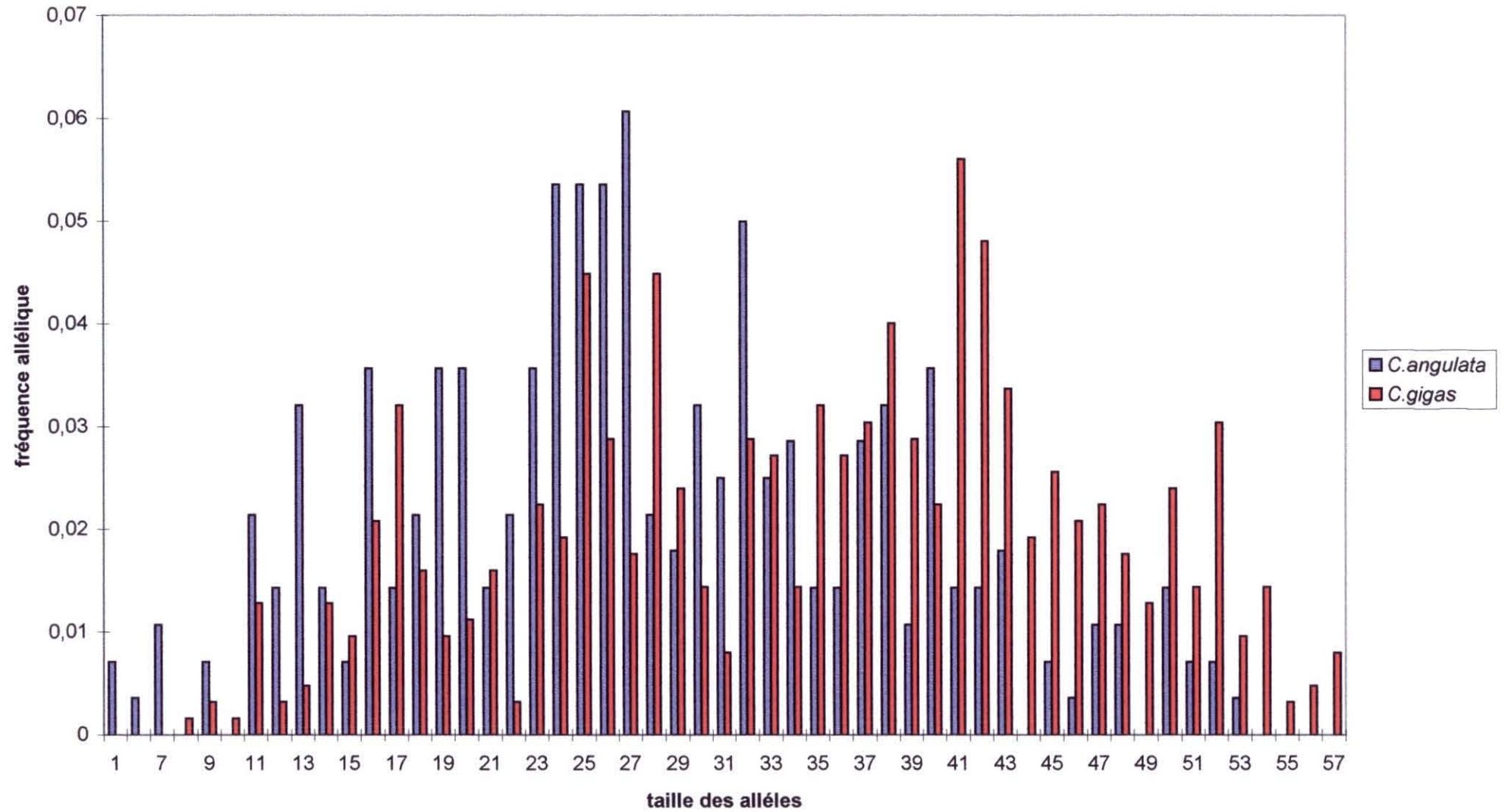
$< 0,01$ ** très significatif

$< 0,001$ *** hautement significatif

Répartition des fréquences alléliques au locus CG108 en fonction de la taille des allèles



Répartition des fréquences alléliques au locus CG49 en fonction de la taille des allèles



Répartition des fréquences alléliques au locus L10 en fonction de la taille des allèles

