



**HAL**  
open science

# Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la caractérisation de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose, et pour la détection de signatures de la sélection naturelle

Estelle Harrang

## ► To cite this version:

Estelle Harrang. Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la caractérisation de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose, et pour la détection de signatures de la sélection naturelle. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2012. Français. NNT : 2012LAROS374 . tel-00840222

**HAL Id: tel-00840222**

**<https://theses.hal.science/tel-00840222>**

Submitted on 2 Jul 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de La Rochelle  
ED0523

IFREMER  
Laboratoire de Génétique et Pathologie (La Tremblade)

THÈSE

présentée par :

Estelle HARRANG

soutenue le 12 juillet 2012  
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle  
Discipline : Océanologie biologie et environnement marin

**Apport des informations moléculaires et cellulaires  
pour la caractérisation de la résistance  
de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose,  
et pour la détection de signatures de la sélection naturelle.**

JURY :

Brigitte CROUAU-ROY  
Xavier DE MONTAUDOUIN  
Jean-Robert BONAMI  
Pierre BOUDRY  
Pascale GARCIA  
Edwige QUILLET  
Isabelle ARZUL  
Sylvie LAPÈGUE

Pr1 Classe except°, Université Paul Sabatier, Toulouse, Rapporteur  
Maître de Conférences, HDR, Université de Bordeaux, Rapporteur  
Directeur de Recherche Honoraire, CNRS, Examinateur  
Cadre de Recherche 3, HDR, IFREMER, Examinateur  
Professeur, Université de La Rochelle, Examinateur  
Directeur de Recherche, HDR, INRA, Examinateur  
Cadre de Recherche 2A, IFREMER, Co-encadrante de la thèse  
Cadre de Recherche 2A, HDR, IFREMER, Directeur de thèse

---

# Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette œuvre doit faire l'objet d'une autorisation préalable de l'auteur. (Loi n° 92-597 ; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

---

# Remerciements

Ifremériens trembladais, Ifremériennes trembladaises,  
ces quelques années passées en votre compagnie furent à la fois haletantes,  
riches en rencontres...  
en joies...  
en frustrations...  
en rires...  
en angoisses...  
et en découvertes!

Ce travail de thèse n'aurait pu être mené à bien sans le concours, de près ou de loin, d'un grand nombre de personnes que je remercie toutes très chaleureusement. Merci à vous de m'avoir accompagnée, soutenue, conseillée, mais aussi de m'avoir fait découvrir le microcosme trembladais et le macrocosme de la Recherche en milieu marin.

J'aimerais tout d'abord remercier Jean Prou et Tristan Renault pour leur accueil très chaleureux au sein de la Station Ifremer de La Tremblade, et plus particulièrement au sein du Laboratoire de Génétique et de Pathologie. Merci également pour votre bonne humeur et votre disponibilité.

J'enchaînerais avec Sylvie Lapègue, qui fut ma directrice de thèse, et Isabelle Arzul, qui fut co-encadrante de mes travaux. Un grand MERCI à toutes les deux pour votre confiance et votre aiguillage dans cet ambitieux projet ! Merci également à vous deux pour vos conseils avisés et pour l'autonomie que vous avez su me laisser développer pour gérer les différentes étapes de mon projet. Ce fut un plaisir de travailler avec vous, même si cela n'a pas toujours été facile de concilier l'aspect « génétique » représenté par Sylvie, et l'aspect « pathologie » représenté par Isabelle. Bien que j'ai parfois eu l'impression d'être assise entre deux chaises, pour une première collaboration directe entre les deux équipes, je trouve que l'on s'en est plutôt bien sorties ! Sylvie, un grand merci pour m'avoir permis de suivre toutes ces formations complémentaires ! Pour nos déplacements, nous n'avons pas eu beaucoup de chance avec les aéroports... alors, merci Isabelle d'avoir pris en charge ma présentation aux USA !

Je remercie la Région Poitou Charentes et tous les partenaires du projet Européen SEAFARE, projet transnational financé par l'Union Européenne, pour le financement de la totalité de mes travaux de thèse, chacun à hauteur de 50 %. Je remercie également les partenaires du projet ANR HiFlo pour le financement de mes divers déplacements en formations, réunions et congrès, en France comme à l'étranger.

J'aimerais ensuite sincèrement remercier les membres de mon jury de thèse qui ont, pour certains, également été membres de mes comités de thèse. Encore merci à vous pour vos commentaires constructifs.

Tout d'abord, je remercie sincèrement Brigitte Crouau-Roy, professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse et Xavier de Montaudouin, maître de conférence à l'Université de Bordeaux, d'avoir accepté avec intérêt et enthousiasme d'être rapporteurs de ce travail. Brigitte, j'ai eu le grand plaisir de te revoir à l'occasion du Colloque du Petit Pois Dérivé et je suis particulièrement touchée que tu m'aies proposé à cette occasion de faire partie de mon jury de thèse. Mr de Montaudouin, nous ne nous sommes rencontrés qu'une seule fois, à l'occasion de ma soutenance, mais je suis très heureuse d'avoir fait votre connaissance et vous remercie vivement d'avoir vu cette petite touche « écologie » dans mes travaux.

J'aimerais ensuite remercier Pascale Garcia, professeur à l'Université de La Rochelle, qui fut examinatrice de mes travaux et qui a présidé mon jury de thèse. J'aimerais également remercier Jean-Robert Bonami, directeur de recherche honoraire du CNRS, qui fut examinateur de mon travail de thèse. Mr Bonami, ce fut un honneur pour moi que vous acceptiez de faire partie de mon jury de thèse, tout particulièrement parce que vous avez suivi de près une grande partie des travaux menés sur l'interaction entre l'huître plate européenne et son parasite *Bonamia* sp., auquel parasite vous avez donné votre nom.

Je souhaite remercier chaleureusement Pierre Boudry, cadre de recherche IFREMER à Brest, et Edwige Quillet, directrice de recherche INRA à Jouy-en-Josas, pour avoir accepté de faire partie de mes comités de thèse mais aussi pour avoir été examinateurs de mes travaux. Un grand merci pour votre intérêt, votre regard critique et vos conseils.

Par la même occasion, je remercie chaleureusement Nicolas Bierne, chargé de recherche CNRS à l'Institut des Sciences de l'évolution de Montpellier, pour avoir lui aussi accepté de faire partie de mes comités de thèse. Nicolas, je te remercie vivement pour tes conseils, pour l'organisation des workshops « outliers » où il restait toujours une petite place pour moi, même si j'étais novice et que je ne faisais pas partie du projet HiFlo... enfin, au départ, puisque j'ai fini par m'y « incruste » ! Et surtout, un grand merci pour notre collaboration dans la valorisation des résultats de mes travaux. Sans toi, il n'y aurait jamais eu ce très joli premier petit papier... !

---

Je tiens ensuite à exprimer toute ma gratitude à deux figures du LGP, deux personnes qui n'ont pas hésité par leur aide, leurs conseils, leur humour, leur constante bonne humeur et petits coups de gueule, leur investissement dans le bon fonctionnement du labo, à contribuer de façon régulière et spontanée à chacune de mes demandes de coups de main ou de mes appels au secours. Un grand grand grand MERCI à Nicole Faury et Serge Heurtebise pour leur aide au quotidien au cours de ces années de dur labeur ! Sans vous, je n'aurais pas été aussi efficace dans la gestion de mes manipes ! Nicole, un merci tout particulier pour les ponctions d'hémolymphes et pour m'avoir formée aux traitements des ARN ! Serge, je ne sais pas par quoi commencer... la manipulation de la grosse bête qu'est le séquenceur, mon agrément pour notre agence matrimoniale des plates et pour l'élevage larvaire et la nurserie... le boulot de mes stagiaires à finir, les dissections et infections... et j'en passe ! Un grand merci aussi à tous les deux pour toutes nos discussions, formelles et informelles, culturelles et sportives.

Un grand merci également à Raphaël Brizard et à toute l'équipe de l'écloserie, ceux qui y sont passés et ceux qui y sont restés, Christophe, J-C, Philippe, Pascal et Pascal et Caroline, Élise, pour l'accueil de mes centaines de milliers de petits « cailloux » (comme on appelle si gentillement les huîtres, d'où je viens) et pour avoir supporté que je réquisitionne la salle « quarantaine » pour en faire une « salle des plates » ! Merci à vous pour m'avoir assistée dans mes élevages, dans la préparation des bacs de mes manipes, et dans les approvisionnements en « eau non-traitée aux UV » et en phyto !

En passant... merci à tout le personnel de la station (LGP, LCR, LERPC) d'avoir contribué à ma très longue manipe « cohabitation » (15 mois !) en me relayant au cours des astreintes pour les relevés de mortalités...

Pour avoir partagé leurs données et ainsi contribué à enrichir l'intérêt de mes travaux, je remercie très sincèrement Benjamin Morga (doctorant au LGP jusqu'en 2010), Nicolas Galtier et Philippe Gayral (ISEM, Projet PopPhyl), Delphine Lallias (ancienne doctorante du LGP et partenaire de l'Université de Bangor, UK, dans le projet SEAFARE) et Toni Gossmann (doctorant à l'Université du Sussex, Brighton, UK).

Pour leur soutien à l'analyse des contigs, je remercie sincèrement toute l'équipe Sigen@e et particulièrement Christophe Klopp (INRA Toulouse), ainsi que Sylvie Lapègue.

Pour leurs conseils avisés, je remercie sincèrement Audrey Rohfritsch (ancienne post-doc du LGP, actuellement au CBGP de Montpellier), Christopher Sauvage (INRA Avignon) et Arnaud Huvet (IFREMER Brest).

Je remercie chaleureusement tous ceux qui m'ont aidée au labo, par leur bonne humeur mais aussi pour avoir passé du temps à me former à certaines pratiques de labo ou pour avoir contribué à mes manipes. Pour tous ces petits riens qui font beaucoup... : Bruno Chollet, pour m'avoir formée à la technique fastidieuse de purification du parasite *Bonamia ostreae*, ainsi que pour nos nombreux échanges lors de mes toutes aussi nombreuses empreintes tissulaires à la cellule analytique. Jean-Pierre Joly, pour m'avoir « appris » à me servir du microscope avec immersion, et pour nos nombreuses discussions lors de mes toutes aussi nombreuses observations... Philippe Haffner, pour avoir mis à ma disposition tout plein de matériel et pour ne pas avoir trop râlé quand je vidais les placards de consommables alors qu'il venait tout juste de les remplir ! Maéva Robert et Emmanuelle Omnes, pour leur aide dans la détection de *B. ostreae* lorsque je me suis retrouvée pressée par le temps, et pour le traitement au microtome de toutes mes coupes tissulaires ! Céline Garcia-Dégremont et Cyrille François pour avoir organisé les prélèvements REPAMO et avoir augmenté les effectifs pour que je puisse prélever des tissus pour mes analyses de pop nat. !

Je remercie également Philippe Haffner, Delphine Tourbiez et Pierrick Moreau pour les analyses Herpes et Vibrios ; Florence Cornette, Émilie Flahauw et María Prado-alvarez pour leurs coups de main ponctuels. Flo, je n'oublierai pas notre dernière astreinte ensemble, le jour du chaos de Xynthia...

Je tiens à remercier mes trois stagiaires, Loïc Fasan (2009), Tzvetelina Ivanova (2010) et Cécile Gallerne (2011) pour m'avoir fait découvrir et apprécier les joies de l'encadrement ! De l'autre côté du miroir... Un grand merci et bonne continuation à vous trois.

Je remercie aussi Denis Saulnier pour ses petits conseils en Biomol, et Tristan Renault pour m'avoir initiée à la cyto centrifugation même si ce ne fut pas très concluant sur les cellules purifiées de *Bonamia*... merci de m'avoir accordé un peu de votre temps, pourtant très pris ! Denis, bonne continuation dans ton nouvel horizon.

Bien sûr, mes expérimentations n'auraient pu être réalisées sans du matériel bien vivant. À ce propos, je remercie vivement Aimé Langlade (IFREMER La Trinité), le personnel Ifremer de Corse et L. F. Jensen pour avoir répondu à mes besoins. Pour les échantillons de tissus d'*Ostrea edulis* et *O. angasi*, je remercie J. Theodorou, L. Bargelloni, P. Boudry, I. Laing, P. Kamermans, D. Lallias, A. Leitao, L. F. Jensen, A. Lok, D. Hurwood, M. S. Porisin et N. Riccardi.

---

Pour tous les aspects administratifs, engagements de missions, ressources documentaires, je remercie Véronique Betto, Martine Grasset et Florence Rivet. Merci aussi à Maryse, pour son aide et sa perpétuelle bonne humeur.

Je remercie vivement mon « petit » Lionel, avec qui j'ai partagé avec plaisir mon/son bureau pendant ces quelques années. Mais j'ai bien cru qu'en arrivant un matin je trouverais mon bureau dans le patio ! Un drôle de loustic, celui-là... Tiens, je crois bien que tu vas quand-même me manquer ! Allez, sans rancune pour mes artichauts ! Et prends bien soin de toute ta petite famille !

Je tiens également à remercier tous mes ex-collègues membres de l'association ASCI17. Ce fut un véritable plaisir de vous accompagner pendant ces trois années au sein du bureau. Bon courage à ceux qui ont repris le flambeau et longue vie à l'asso !

Pour nos discussions et nos échanges, qu'ils furent aquatiques, gastronomiques, culturels ou sportifs, je remercie également Abdellah, l'équipe du LERPC et du labo de microbiologie, et plus particulièrement Olivier C., Philippe G., Jean-Luc, Patrice, Sylvie T., Stéphane R. et Stéphane G., Daniel. Merci aussi à Olivier L., Philippe G. et le multi-tâches Serge H. pour leur aide en informatique !

Une autre pensée pour tous les gens du voyage : CDD, stagiaires, thésards, post-docs, de passage ou de retour, que j'ai eu le plaisir de croiser pendant ces quelques années : Cécile G., Audrey, Benjamin M., Coralie, Maria, David, Sophie dD., Andréa, Gwénaëlle, Émilie, Cécile, Soledad, Amélie, Pierrick, Dimitri, Sophie L., Lætitia, Loïc, Tanguy, Flora, Yann, Tzvetelina, Benjamin G., Gwénaël, Valérie... Une pensée toute particulière à ma chère Ronghua, venue de Chine pour apprendre à faire du vélo ! Euh pardon, ça c'était en option... tu m'auras fichu la frousse plus d'une fois ! Mais ton rire et ton sourire me resteront aussi en mémoire !

Un petit clin d'œil aux thésards et post-docs d'ailleurs rencontrés avec plaisir au cours de réunions ou de formations. Frederica Batista, ce fut un plaisir d'échanger avec toi sur l'huître plate ! Dirk Schaerlaekans, encore merci d'être venu me chercher devant « Le Roi du Matelas » de Bruxelles, mon vélo et moi on n'en pouvait plus ! Et un grand merci pour m'avoir fait découvrir le super réseau cyclable fietsnet ! Thomas Broquet, à chacune de nos rencontres : « il me semble que l'on se connaît, non ? ». Célia Gosset, j'aurais bien aimé visiter ton petit moulin ! Etienne Loire, merci pour les dépannages informatiques lors de mes passages à Sète. Vanessa B., Christelle, et tous les autres, bonne continuation à vous tous et qui sait, on se recroisera probablement à nouveau ! Le monde de la recherche n'est pas si grand...

Dans un tout autre registre, je remercie vivement mes compagnons des « Vagues à bond des planches ». Merci d'avoir accepté la novice que j'étais, vous m'avez rendu un énorme service en me permettant désormais d'être beaucoup plus à l'aise lors de mes présentations en colloques et congrès ! Bruno, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de monter sur les planches à vos côtés. Merci également à Marie, Camille, Eliane, Armelle, Olivier, Brigitte, Badré, Bernard, Anne, Yolande... J'ai vraiment adoré ces quelques représentations ensemble ! Bonne continuation à vous tous... !

Avec certitude, je n'en serais jamais arrivée là sans le soutien moral indéfectible, la confiance et les sacrifices de mes parents. Avec toute ma reconnaissance, ma gratitude, mon amour je vous remercie du fond du cœur ! Merci pour votre présence, votre écoute, vos encouragements, vos conseils. Merci pour avoir toujours cru en moi et m'avoir toujours soutenue et suivie quels que fussent mes choix et mes destinations... ! Je remercie également mon frère et mon compagnon pour leur soutien, leurs taquineries sur mes activités de recherche, leur aide en matière d'informatique et leurs sacrifices. Je ne vous remercierai jamais assez... je sais ce que je vous dois et je suis tellement heureuse de vous avoir à mes côtés ! Je remercie encore mon papa tatillon pour avoir lu l'intégralité de ce mémoire, à la recherche de la moindre petite faute d'orthographe ou de grammaire. Un grand merci à toi, je crois bien que tu es le seul à avoir lu mon manuscrit en intégralité, avec autant d'attention ! Un grand grand MERCI à mon frère, mon informaticien toujours à portée de main, toujours prêt à m'aider, me dépanner... et surtout, surtout, un grand merci à toi pour m'avoir accompagnée dans la conception de la version finale de ce mémoire en me formant au langage L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X ! Merci de m'avoir consacré autant de temps... J'adore le rendu !

---

À ma famille,  
et à tous mes petits « cailloux » que je laisse derrière moi...

---

« La recherche est une tache d'huile qui s'étend par la circonférence  
plus qu'une goutte d'acide qui creuse en son centre »

de Henri Laborit  
(*Biologie et structure*, 1968)  
(à propos de la recherche interdisciplinaire)



---

# Sommaire

Liste des figures . . . . .	XVI
Liste des tableaux . . . . .	XVIII

## **Introduction générale** **1**

## **I Contexte de la thèse** **4**

I.1	Présentation de l’huître plate européenne . . . . .	4
I.1.1	Biologie de l’huître . . . . .	4
I.1.1.1	Anatomie et systématique . . . . .	4
I.1.1.2	Aire de distribution géographique . . . . .	5
I.1.1.3	Particularité sexuelle et cycle de vie . . . . .	6
I.1.2	Histoire mouvementée de l’huître plate sur les côtes européennes . . . . .	8
I.1.2.1	Une succession d’épisodes de mortalités . . . . .	8
I.1.2.2	Les transferts de coquillages et leur réglementation . . . . .	9
I.2	Focus sur la bonamiose . . . . .	13
I.2.1	Structure cellulaire et taxinomie . . . . .	13
I.2.2	Spectre d’hôtes et distribution géographique actuelle . . . . .	14
I.2.3	Symptômes et facteurs influençant la maladie . . . . .	16
I.2.4	Méthodes de détection . . . . .	17
I.2.5	Contrôle et moyens de lutte contre la maladie . . . . .	19
I.3	Mécanismes de réponse aux agents pathogènes . . . . .	20
I.3.1	Mécanismes à médiation cellulaire . . . . .	20
I.3.2	Mécanismes de l’immunité humorale . . . . .	23
I.4	Étude et amélioration de la résistance à la bonamiose . . . . .	24
I.4.1	Sélection de lignées résistantes à la bonamiose . . . . .	24
I.4.1.1	Premiers programmes de sélection de lignées « résistantes » . . . . .	24
I.4.1.2	Le programme français initié par Ifremer . . . . .	25
I.4.1.2.1	Première partie (1985-1995) . . . . .	25
I.4.1.2.2	Deuxième partie (1995-actuel) . . . . .	26
I.4.2	Recherche de régions du génome associées à cette résistance . . . . .	28
I.5	Objectifs du projet de thèse . . . . .	30

## **II Choix et acquisition du matériel d’étude** **32**

II.1	Production d’une nouvelle génération d’huîtres . . . . .	32
II.1.1	Plan de croisement . . . . .	32
II.1.2	Choix des familles ségrégeantes à produire . . . . .	33
II.1.3	Zootechnie . . . . .	33

II.1.3.1	Maturation des futurs géniteurs . . . . .	33
II.1.3.2	Formation des couples . . . . .	34
II.1.3.3	Élevage et fixation des larves . . . . .	36
II.1.4	Choix des familles ségrégeantes pour les expérimentations . . . . .	39
II.2	Choix des populations naturelles d'étude . . . . .	41

### **III Cartographie génétique comparée 43**

III.1	Introduction . . . . .	43
III.2	Développement de nouveaux outils moléculaire, les marqueurs SNP . . . . .	47
III.2.1	Les SNP <i>in vitro</i> . . . . .	47
III.2.1.1	Matériels et méthodes . . . . .	47
III.2.1.1.1	Choix des séquences . . . . .	47
III.2.1.1.2	Choix du matériel biologique . . . . .	48
III.2.1.1.3	Extraction des ADN des populations naturelles . . . . .	49
III.2.1.1.4	Amplification totale d'ADN génomique . . . . .	49
III.2.1.1.5	Dessin des amorces, amplification et séquençage . . . . .	50
III.2.1.1.6	Analyses des séquences et détection du polymorphisme . . . . .	52
III.2.1.2	Résultats . . . . .	53
III.2.1.3	Discussion . . . . .	58
III.2.1.3.1	Succès du séquençage . . . . .	58
III.2.1.3.2	Distribution du polymorphisme . . . . .	60
III.2.1.4	Choix des SNP <i>in vitro</i> pour le génotypage . . . . .	60
III.2.2	Les SNP <i>in silico</i> . . . . .	61
III.2.2.1	Présentation des deux technologies . . . . .	61
III.2.2.1.1	Pyroséquençage et séquençage 454 (Roche) . . . . .	61
III.2.2.1.2	Technologie Solexa/Illumina . . . . .	64
III.2.2.2	Méthodologie et résultats . . . . .	64
III.2.2.2.1	Obtention des contigs . . . . .	65
III.2.2.2.2	Traitement des séquences et choix des SNP . . . . .	65
III.2.3	Conclusion . . . . .	66
III.3	Cartographie génétique comparée . . . . .	67
III.3.1	Matériels et Méthodes . . . . .	67
III.3.1.1	Carte d'identité des familles ségrégeantes . . . . .	67
III.3.1.2	Extraction ADN . . . . .	67
III.3.1.3	Génotypage des SNP . . . . .	67
III.3.1.4	Génotypage des microsatellites . . . . .	71
III.3.1.5	Construction des cartes génétiques de liaison . . . . .	73
III.3.1.5.1	Préparation des données de typage . . . . .	74
III.3.1.5.2	Analyse de la distorsion de ségrégation . . . . .	75
III.3.1.5.3	Analyse de liaison . . . . .	76

III.3.1.5.4	Construction des cartes de liaison . . . . .	76
III.3.1.5.5	Taille des cartes de liaison et couverture du génome . . . . .	77
III.3.1.5.6	Cartographie comparée . . . . .	77
III.3.2	Résultats . . . . .	77
III.3.2.1	Données de typage . . . . .	77
III.3.2.2	Distorsion de ségrégation . . . . .	79
III.3.2.2.1	Famille 09.04 . . . . .	79
III.3.2.2.2	Famille 09.09 . . . . .	79
III.3.2.2.3	Famille 09.67 . . . . .	80
III.3.2.3	Cartes de liaison . . . . .	80
III.3.2.3.1	Famille 09.04 . . . . .	80
III.3.2.3.2	Famille 09.09 . . . . .	84
III.3.2.3.3	Famille 09.67 . . . . .	87
III.3.3	Discussion . . . . .	91
III.3.3.1	Distorsion de ségrégation . . . . .	91
III.3.3.2	Cartographie génétique comparée . . . . .	92
III.3.4	Conclusion et perspectives . . . . .	100

## **IV Caractérisation phénotypique et génétique en réponse à une infection expérimentale avec le parasite *Bonamia ostreae* 102**

IV.1	Présentation des expérimentations . . . . .	102
IV.2	À l'échelle inter-familiale : diversité des QTL de réponse à une infection à <i>Bonamia ostreae</i> entre familles ségrégeantes . . . . .	104
IV.2.1	Introduction . . . . .	104
IV.2.2	Matériels et méthodes . . . . .	105
IV.2.2.1	Carte d'identité des familles . . . . .	105
IV.2.2.2	Obtention de la suspension de <i>Bonamia ostreae</i> . . . . .	105
IV.2.2.3	Infection expérimentale par cohabitation . . . . .	106
IV.2.2.4	Suivi de l'infection . . . . .	108
IV.2.2.5	Prélèvements de tissus et extraction ADN . . . . .	108
IV.2.2.6	PCR quantitative . . . . .	109
IV.2.2.7	Génotypage et construction des cartes génétiques de liaison . . . . .	110
IV.2.2.8	Analyse QTL . . . . .	111
IV.2.3	Résultats . . . . .	112
IV.2.3.1	Cinétique des mortalités . . . . .	112
IV.2.3.2	Cartes de liaison . . . . .	117
IV.2.3.2.1	Famille 09.04 . . . . .	117
IV.2.3.2.2	Famille 09.67 . . . . .	117
IV.2.3.3	Détection de QTL . . . . .	118
IV.2.3.3.1	QTL liés à la survie . . . . .	118

---

IV.2.3.3.2	QTL liés à une infection à <i>B. ostreae</i> . . . . .	124
IV.2.4	Discussion . . . . .	128
IV.2.4.1	Cinétique des mortalités . . . . .	128
IV.2.4.2	Diversité des QTL liés à la résistance à la bonamiose . . . . .	130
IV.2.5	Conclusion et perspectives . . . . .	139
IV.3	À l'échelle intra-familiale : approche eQTL . . . . .	142
IV.3.1	Introduction . . . . .	142
IV.3.2	Matériels et Méthodes . . . . .	144
IV.3.2.1	Carte d'identité de la famille testée . . . . .	144
IV.3.2.2	Infection expérimentale . . . . .	145
IV.3.2.3	Prélèvements et analyses de données . . . . .	145
IV.3.2.3.1	Prélèvements de tissus et extraction ADN . . . . .	145
IV.3.2.3.2	PCR quantitative . . . . .	146
IV.3.2.3.3	Génotypage et construction de la carte génétique de liaison . . . . .	146
IV.3.2.3.4	Prélèvements d'hémolymphe . . . . .	146
IV.3.2.3.5	Cytométrie en flux . . . . .	147
IV.3.2.3.5.1	Capacité de phagocytose . . . . .	147
IV.3.2.3.5.2	Production d'Espèces Oxygénées Réactives (EOR) . . . . .	147
IV.3.2.3.5.3	Acquisition des données . . . . .	147
IV.3.2.3.6	Purification de l'ARN total et synthèse des ADN complémentaires . . . . .	148
IV.3.2.3.7	PCR en temps réel . . . . .	150
IV.3.2.3.8	Coupe sagittale de tissus . . . . .	155
IV.3.2.3.9	Analyses statistiques . . . . .	156
IV.3.2.3.10	Analyses QTL et eQTL . . . . .	156
IV.3.3	Résultats . . . . .	156
IV.3.3.1	Carte génétique de liaison . . . . .	157
IV.3.3.2	Détection de <i>Bonamia ostreae</i> . . . . .	157
IV.3.3.3	Réponses cellulaires . . . . .	157
IV.3.3.4	Réponses moléculaires . . . . .	158
IV.3.3.5	Détection de QTL et eQTL . . . . .	159
IV.3.4	Discussion . . . . .	166
IV.3.4.1	Détection du parasite . . . . .	166
IV.3.4.2	Détection de QTL et eQTL liés à la réponse à une injection de parasites . . . . .	167
IV.3.5	Conclusion et perspectives . . . . .	180
IV.4	À l'échelle des populations . . . . .	182
IV.4.1	Introduction . . . . .	182
IV.4.2	Matériels et Méthodes . . . . .	183
IV.4.2.1	Choix des trois populations <i>O. edulis</i> d'étude . . . . .	183
IV.4.2.2	Infection expérimentale . . . . .	184
IV.4.2.3	Prélèvements et analyses de données . . . . .	185
IV.4.2.3.1	Prélèvements d'hémolymphe . . . . .	185

IV.4.2.3.2	Cytométrie en flux	185
IV.4.2.3.3	Purification de l'ARN total et synthèse des ADN complémentaires	185
IV.4.2.3.4	PCR en temps réel	186
IV.4.2.3.5	Analyses statistiques	187
IV.4.3	Résultats	187
IV.4.3.1	Arrêt prématuré de l'expérience	187
IV.4.3.2	Recherche des causes de l'épisode de mortalités	189
IV.4.3.3	Réponses cellulaires	190
IV.4.3.4	Réponses moléculaires	191
IV.4.4	Discussion	192
IV.4.4.1	Épisode de mortalités	192
IV.4.4.2	Réponses fonctionnelles à un épisode infectieux	194
IV.4.5	Conclusion et perspectives	196

## V Diversité et structure génétique 199

V.1	Introduction	199
V.2	Diversité génétique chez <i>Ostrea edulis</i>	201
V.2.1	Abstract	203
V.2.2	Introduction	204
V.2.3	Materials and Methods	205
V.2.3.1	Sampling and molecular protocols	205
V.2.3.2	Analysis of DNA sequence polymorphism	205
V.2.4	Results	207
V.2.5	Discussion	209
V.2.6	Acknowledgements	212
V.2.7	References	213
V.2.8	Figure legends	220
V.2.9	Supplementary files	224
V.3	Structure génétique des populations naturelles	232
V.3.1	Introduction	232
V.3.2	Matériels et Méthodes	233
V.3.2.1	Populations naturelles échantillonnées	233
V.3.2.2	Extraction ADN et géotypage	233
V.3.2.3	Analyse de la diversité et de la structure génétique	234
V.3.2.3.1	Estimation de la diversité génétique intra-population	234
V.3.2.3.2	Estimation de la diversité et de la structure inter-populations	235
V.3.2.4	Détection de signatures de sélection	237
V.3.3	Résultats	238
V.3.3.1	Diversité génétique intra-population	239
V.3.3.2	Diversité et structure entre populations	241

---

V.3.3.3	Signatures de la sélection . . . . .	250
V.3.4	Discussion . . . . .	254
V.3.4.1	Diversité et différenciation . . . . .	254
V.3.4.2	Structure des populations . . . . .	255
V.3.4.3	Signatures de la sélection . . . . .	256
V.3.5	Conclusion et perspectives . . . . .	260
<b>VI</b>	<b>Conclusion générale</b>	<b>263</b>
VI.1	Rappel des Objectifs . . . . .	263
VI.2	Bilan du développement des nouveaux marqueurs moléculaires . . . . .	264
VI.3	Caractérisation génétique des ressources naturelles de <i>O. edulis</i> . . . . .	265
VI.4	Détection de régions génomiques liées à la réponse à la bonamiose . . . . .	267
VI.5	Faisabilité d'un programme MAS ou GAS contre la bonamiose . . . . .	268
<b>Bibliographie</b>		<b>XIX</b>
<b>Valorisations des travaux de thèse</b>		<b>XLVI</b>
<b>Abstract</b>		<b>XLIX</b>
<b>Résumé</b>		<b>LI</b>

---

## Liste des figures

1	Arbre phylogénétique des Ostréidés . . . . .	5
2	Anatomie de l’huître plate européenne <i>Ostrea edulis</i> . . . . .	5
3	Aire de distribution de l’huître plate européenne <i>Ostrea edulis</i> . . . . .	6
4	Cycle de développement de l’huître plate européenne <i>Ostrea edulis</i> . . . . .	7
5	Production ostréicole française au cours du XX <sup>ème</sup> siècle . . . . .	10
6	Production française de coquillage pour la période 2010/2011 . . . . .	10
7	Observations au microscope photonique d’appositions de branchies d’une huître <i>Ostrea edulis</i> infectée par <i>Bonamia ostreae</i> . . . . .	13
8	Détail de la classification phylogénétique des Haplosporidiae . . . . .	14
9	Aire de distribution de l’huître plate européenne <i>Ostrea edulis</i> sur les zones côtières infectées par le parasite <i>Bonamia ostreae</i> et les zones où le parasite n’a pas été détecté . . . . .	15
10	Hémocytes cytocentrifugés et colorés avec le Kit Hemacolor . . . . .	20
11	Internalisation du parasite <i>Bonamia ostreae</i> par un hémocyte d’huître creuse <i>Crasostrea gigas</i> . . . . .	22
12	Performances de survie des lignées d’huîtres plates européennes produites en 1998 dans le cadre du programme de sélection contre la bonamiose, à l’issue d’une expérience test de 3 ans . . . . .	27
13	Schéma bi-parental de production des générations $F_1$ et $F_2$ . . . . .	32
14	Dispositif dit du « HLM » pour l’obtention de pontes bi-parentales chez l’huître plate . . . . .	36
15	Scobalites utilisés en élevage larvaire . . . . .	37
16	Distribution des pontes et des lots de larves fixées au cours de la période de production de la nouvelle génération d’huîtres . . . . .	37
17	Dispositif de fixation des jeunes larves d’huître plate . . . . .	38
18	Dispositif de stabulation du naissain . . . . .	39
19	Généalogie sur trois générations des trois familles ségrégeantes choisies pour les expérimentations d’infection par <i>B. ostreae</i> . . . . .	40
20	Sites de provenance des huîtres utilisées pour le développement des marqueurs SNP <i>in vitro</i> par séquençage direct . . . . .	49
21	Profil électrophorétique et quantification des ADN amplifiés par PCR . . . . .	51
22	Polymorphisme de type SNP . . . . .	53
23	Distribution des séquences EST utilisées pour la caractérisation de SNP <i>in vitro</i> chez <i>Ostrea edulis</i> parmi huit grandes catégories fonctionnelles . . . . .	57
24	Distributions quantitatives de la longueur des régions introniques . . . . .	58
25	Description des technologies de séquençage haut-débit (Roche 454 et Solexa/Illumina) utilisées pour la détection des SNP <i>in silico</i> . . . . .	63
26	Exclusion des échantillons présentant un écart à la moyenne pour le p50 GC . . . . .	69
27	Illustration de la qualité des génotypes SNP . . . . .	70
28	Exemple de fichier d’entrée pour le logiciel JoinMap 4 . . . . .	75
29	Distribution de la distorsion de ségrégation des marqueurs SNP chez la famille 09.04 . . . . .	79

30	Distribution de la distorsion de ségrégation des marqueurs SNP et des microsatellites chez la famille 09.09 . . . . .	79
31	Distribution de la distorsion de ségrégation des marqueurs SNP chez la famille 09.67	80
32	Proportion de marqueurs distordus au sein de la carte génétique de liaison de la famille 09.04 . . . . .	81
33	Carte génétique de liaison de la famille 09.04 . . . . .	83
34	Proportion de marqueurs distordus au sein de la carte génétique de liaison de la famille 09.09 . . . . .	85
35	Carte génétique de liaison de la famille 09.09 . . . . .	86
36	Proportion de marqueurs distordus au sein de la carte génétique de liaison de la famille 09.67 . . . . .	88
37	Carte génétique de liaison de la famille 09.67 . . . . .	90
38	Carte génétique de liaison du parent 410_8 de la famille 05.04 . . . . .	98
39	Gradients de sucrose et de Percoll pour la purification des cellules parasitaires de <i>Bonamia ostreae</i> . . . . .	106
40	Huître plate anesthésiée, après un bain de chlorure de magnésium . . . . .	106
41	Dispositif expérimental d'infection par cohabitation des huîtres testées par les huîtres sur-infectées par injection de <i>Bonamia ostreae</i> . . . . .	107
42	Courbe standard construite à partir de 7 dilutions successives de plasmides linéarisés correspondant au gène de l'actine 1 de <i>Bonamia ostreae</i> . . . . .	110
43	Taux de mortalités des huîtres sauvages sur-infectées par injection et des huîtres des 3 familles testées par cohabitation . . . . .	112
44	Évolution des mortalités totales cumulées des huîtres testées et des huîtres injectées, au cours de l'expérience de cohabitation . . . . .	113
45	Évolution des mortalités totales cumulées des trois familles d'huîtres testées par cohabitation . . . . .	115
46	Évolution de la charge en <i>Bonamia ostreae</i> détectée chez les individus morts de la famille 09.67 . . . . .	117
47	Cartographie comparée des QTL significatifs et présumés pour la survie ou la mortalité à une infection à <i>B. ostreae</i> , chez les familles 09.04 et 09.67 . . . . .	123
48	Cartographie des QTL significatifs et présumés liés à la résistance ou à la sensibilité à une infection avec <i>B. ostreae</i> , chez la famille 09.67 . . . . .	127
49	Cartographie comparée des QTL liés à une infection à <i>B. ostreae</i> , chez les familles 09.04, 09.67 et 05.04_2 . . . . .	137
50	Généalogie sur trois générations de la famille ségrégeante utilisée pour l'expérimentation d'infection par <i>B. ostreae</i> . . . . .	144
51	Présentation des résultats de mesure des activités cellulaires en cytométrie de flux	148
52	Profil électrophorétique des ARN purifiés et traités à la DNase . . . . .	149
53	Plan de plaque pour la PCR d'expression comparative . . . . .	152
54	Courbes de dissociation des gènes EF1- $\alpha$ et Fas ligand . . . . .	153
55	Transformation logarithmique de la courbe d'amplification du gène EF1- $\alpha$ . . . . .	154



56	Exemple de quantités relatives d'expression d'un gène d'intérêt, par rapport au calibrateur ramené à zéro . . . . .	155
57	Plan de coupe sagittale de tissus chez une huître plate européenne . . . . .	155
58	Distributions quantitatives de la proportion de cellules hémoctaires pour l'activité de phagocytose et pour la production d'espèces oxygénées réactives . . . . .	158
59	Distributions quantitatives des valeurs d'expression relative au calibrateur des cinq gènes d'intérêt . . . . .	159
60	Distribution des LOD score le long des groupes de liaison regroupant les QTL et eQTL associés aux activités hémoctaires et à l'expression des gènes potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose . . . . .	165
61	Cartographie comparée des QTL liés à une infection à <i>B. ostreae</i> , et des QTL et eQTL associés aux activités hémoctaires et à l'expression des gènes potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose . . . . .	179
62	Localisation des trois populations naturelles de <i>Ostrea edulis</i> choisies pour l'expérimentation d'infection avec <i>Bonamia ostreae</i> . . . . .	183
63	Dispositif expérimental des lots témoins et des huîtres testées par injection de <i>Bonamia ostreae</i> chez les trois populations naturelles . . . . .	184
64	Pourcentages de mortalités des lots d'huîtres des 3 populations testées, au bout d'une semaine d'expérimentation . . . . .	188
65	Cinétique de l'épisode de mortalités ayant touché les huîtres plates, des 3 populations naturelles, injectées avec la suspension parasitaire . . . . .	189
66	Quantités relatives de cellules hémoctaires pour la production d'EOR, et pour l'activité de phagocytose, pour la réponse spécifique à l'injection de la suspension Bo chez les populations de Quiberon et de Corse . . . . .	190
67	Quantités relatives d'expression des gènes potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose pour la réponse spécifique à l'injection de la suspension Bo chez les populations de Quiberon et de Corse . . . . .	191
68	Distribution of Watterson's theta and non-synonymous to silent diversity ratio across loci . . . . .	220
69	Non-synonymous to silent diversity ratio in the <i>O. edulis</i> nuclear genome and allele frequency spectrum . . . . .	220
70	Non-synonymous diversity in plant and animal species as a function of synonymous diversity and allozyme heterozygosity . . . . .	220
S1	Functional classification of the EST sequences used for SNP identification . . . . .	228
S2	Distribution of non-synonymous to silent diversity ratios of the 37 nuclear loci analyzed according to their putative biological function. . . . .	229
S3	Distribution of the Effective Number of Codon and GC3 . . . . .	230
S4	Distribution of $F_{ST}$ values between all populations, and between Atlantic and Mediterranean populations . . . . .	231
71	Représentation des $F_{ST}$ en fonction du log(PO) . . . . .	238

---

72	Arbres de Neighbor-joining inférés à partir des distances génétiques de Nei (1972) sur les populations d' <i>Ostrea edulis</i> et la population d' <i>O. angasi</i> . . . . .	244
73	AFC sur les fréquences alléliques des populations naturelles de <i>O. edulis</i> et de la population <i>O. angasi</i> . . . . .	245
74	Changements de second ordre du logarithme de probabilité pour les K sous-populations inférées avec le logiciel Structure . . . . .	247
75	Résultats du logiciel Structure pour les marqueurs microsatellites et les marqueurs SNP . . . . .	249
76	Fréquence de l'allèle majoritaire de 6 marqueurs SNP chez 12 populations naturelles de l'huître plate européenne . . . . .	253
77	Structuration géographique des populations naturelles de l'huître plate européenne	257

---

## Liste des tableaux

1	Différentes méthodes de diagnostic de <i>Bonamia</i> sp. . . . .	18
2	Effectifs des futurs géniteurs $F_1$ pour la production de la nouvelle génération $F_2$ . . . . .	34
3	Plan de croisement des 9 familles . . . . .	35
4	Inventaire des lots d'huîtres de génération $F_2$ survivants au-delà de l'étape de fixation des larves . . . . .	38
5	Caractéristiques des différents lots d'huîtres utilisés en Parties 3, 4 et 5 du présent manuscrit . . . . .	42
6	Résultats du séquençage direct de 40 portions de gènes chez <i>O. edulis</i> pour la recherche de sites polymorphismes . . . . .	55
7	Caractéristiques des marqueurs microsatellites d' <i>Ostrea edulis</i> utilisés pour le génotypage . . . . .	72
8	Conditions de PCR pour l'amplification des marqueurs microsatellites d' <i>Ostrea edulis</i> utilisés pour le génotypage . . . . .	73
9	Codage des génotypes pour utilisation avec le logiciel JoinMap 4 . . . . .	74
10	Table de significativité de la distorsion de ségrégation des marqueurs moléculaires . . . . .	76
11	Résultats de typage des marqueurs moléculaires SNP et/ou microsatellites . . . . .	78
12	Caractéristiques de la carte génétique de liaison de la famille 09.04 obtenue avec l'ensemble des marqueurs SNP . . . . .	81
13	Caractéristiques de la carte génétique de liaison de la famille 09.04 obtenue avec les marqueurs SNP peu ou pas distordus . . . . .	82
14	Caractéristiques de la carte génétique de liaison de la famille 09.09 obtenue avec l'ensemble des marqueurs SNP et microsatellites . . . . .	84
15	Caractéristiques de la carte génétique de liaison de la famille 09.09 obtenue avec les marqueurs SNP et microsatellites peu ou pas distordus . . . . .	85
16	Caractéristiques de la carte génétique de liaison de la famille 09.67 obtenue avec l'ensemble des marqueurs SNP . . . . .	87
17	Caractéristiques de la carte génétique de liaison de la famille 09.67 obtenue avec les marqueurs SNP peu ou pas distordus . . . . .	89
18	Correspondances entre les cartes génétiques de liaison construites chez les familles 09.04, 09.09 et 09.67 . . . . .	92
19	Caractéristiques de la carte génétique de liaison du parent 410_8 de la famille 05.04 obtenue avec l'ensemble des marqueurs AFLP, microsatellites et SNP . . . . .	95
20	Correspondances entre les cartes génétiques de liaison des familles 09.04, 09.09 et 09.67 et la carte génétique complétée du parent 410_8 de la famille 05.04 . . . . .	99
21	Disponibilité en tissus pour la détection de la charge en <i>Bonamia ostreae</i> par PCR quantitative chez les trois familles d'huîtres testées et effectifs et taux d'infection des huîtres sacrifiées . . . . .	116
22	Caractéristiques principales des QTL pour la survie, cartographiés chez les familles 09.04 et 09.67, à l'issue d'une infection par cohabitation avec le parasite <i>B. ostreae</i> . . . . .	120

---

23	Caractéristiques principales des QTL pour la charge en parasite <i>B. ostreae</i> , cartographiés chez la famille 09.67 après une infection par cohabitation . . . . .	126
24	Caractéristiques des six gènes utilisés pour la PCR d'expression comparative . . . . .	150
25	Caractéristiques principales des QTL pour les deux activités hémocytaires et des eQTL pour l'expression des cinq gènes potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose . . . . .	162
26	Effectifs des individus biopsés à J <sub>7</sub> , par population et par condition . . . . .	188
S1	Primer sequences and size of the PCR products for the 40 loci of this study . . . . .	224
S2	Nucleotide diversity and Tajima's D statistic of the 40 loci analyzed in this study . . . . .	225
S3	Number of SNPs for the 37 nuclear loci analyzed in this study . . . . .	226
S4	References of published nuclear and allozyme data used in <b>Figure 70</b> . . . . .	227
27	Liste des sites échantillonnés correspondant aux populations naturelles d' <i>O. edulis</i> , de <i>O. angasi</i> et <i>O. chilensis</i> étudiées . . . . .	234
28	Distances maritimes en kilomètres entre les populations naturelles d' <i>Ostrea edulis</i> étudiées . . . . .	236
29	Diversité génétique des populations naturelles d' <i>O. edulis</i> , <i>O. angasi</i> et <i>O. chilensis</i> . . . . .	240
30	Différenciation mesurée par les valeurs de $\theta$ ( $F_{ST}$ ), entre paires de populations d'huîtres plates <i>O. edulis</i> , <i>O. angasi</i> et <i>O. chilensis</i> . . . . .	243
31	Résultats de la détection de marqueurs SNP sous sélection chez l'huître plate européenne, avec le logiciel BayeScan . . . . .	251

# Introduction générale

Dans le milieu naturel, les organismes vivants évoluent en équilibre précaire. Le déplacement de l'un de ces organismes dans une nouvelle niche écologique peut parfois produire un déséquilibre aux conséquences désastreuses, tant pour les autres organismes vivants que pour les activités économiques humaines.

Le protozoaire *Bonamia ostreae* a été détecté pour la première fois en 1979 chez l'huître plate endémique des côtes européennes, *Ostrea edulis* (Linné, 1758). Identifié alors comme l'organisme responsable de la mortalité d'huîtres bretonnes, ce parasite s'est rapidement propagé sur l'ensemble de la côte Atlantique européenne où il a contribué à décimer les bancs naturels de cette huître, déjà malmenée par la sur-exploitation de ses gisements naturels et par l'émergence de précédentes épizooties. Historiquement présents sur toute la côte européenne, de la Mer du Nord à la Mer Noire, en passant par l'Océan Atlantique et la Mer Méditerranée, les bancs naturels de cette espèce sont devenus très localisés et fragmentés. En quelques années, la production ostréicole de l'huître plate européenne est devenue anecdotique et a été presque totalement supplantée par l'exploitation de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*, précédemment introduite.

Les mollusques bivalves marins, comme tous les invertébrés, possèdent un système immunitaire inné dépourvu de la capacité de réponse adaptative. Cette particularité biologique ainsi que la nature même du milieu d'élevage (milieu ouvert) restreignent de fait le potentiel d'action pour lutter contre le développement des parasites.

Afin de ralentir et de réguler la propagation de la maladie due à *Bonamia ostreae*, la bonamiose, et de prévenir son émergence dans les zones non encore contaminées, des mesures prophylactiques ont été mises en place. Pour cela, cette parasitose est devenue une maladie à déclaration obligatoire auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (anciennement Office International de Épizooties, OIE), ainsi qu'auprès de l'Union Européenne. Une réglementation en matière de transferts de coquillages a également été mise en place.

Dans le but de reconstituer les gisements naturels et de relancer la culture de *Ostrea edulis* en Europe, des recherches ont été menées afin d'isoler et de caractériser le parasite pour pouvoir reproduire la maladie en laboratoire, et ainsi mieux l'étudier.

Des programmes de sélection d'animaux naturellement résistants à la mortalité induite par *B. ostreae* ont été développés. Le programme de sélection instauré par IFREMER, dès 1985, a notamment permis de démontrer qu'il était possible d'améliorer la survie des huîtres plates et de diminuer la prévalence du parasite. Cependant, un déclin dans la résistance a été mis en évidence au bout de quelques générations de sélection. Ce phénomène a été relié à une diminution drastique de la diversité génétique, mais également à une potentielle accumulation d'allèles délétères, au fil des générations. Néanmoins, ces études ont permis d'identifier un potentiel caractère héritable de la résistance à la mortalité due au parasite *B. ostreae* ; héritabilité qui, par la suite, a été confirmée. Par la suite, de 2002 à 2004, un projet a cherché à évaluer la faisabilité technique et

économique d'une production commerciale d'huîtres plates résistantes à la bonamiose. Ce projet a notamment montré que la survie des huîtres résistantes était respectivement de 73 % et 89 %, au sol et en sur-élévation, contre 34 % et 40 % pour le naissain de captage naturel.

Afin de mieux comprendre le phénomène de résistance ainsi identifié, plusieurs études se sont focalisées sur la compréhension des mécanismes de réponse de l'huître plate, et sur l'identification de régions génomiques potentiellement impliquées dans les mécanismes de résistance à la maladie. Le présent travail de thèse se positionne dans ce contexte et consistait à améliorer la compréhension de la résistance de l'huître plate européenne à la bonamiose, mais également à mieux caractériser la ressource génétique et la structuration de ses populations naturelles.

L'aspect de résistance à la parasitose s'intègre dans le cadre du projet européen SEAFARE (Sustainable and Environmentally friendly Aquaculture For the Atlantic Region of Europe, 2010-2012; <http://www.seafareproject.eu/>). Ce projet transnational est financé par l'Union Européenne et regroupe des centres de recherches dispersés dans 5 pays européens de la côte Atlantique (Angleterre, Espagne, France, Irlande, Portugal). Il a pour but de fournir aux entreprises aquacoles et aux pouvoirs publics des outils pour le développement durable de l'aquaculture, dans le respect de l'environnement. Les principaux objectifs consistent à promouvoir la diversification de l'aquaculture en fournissant un plus large éventail d'espèces et de systèmes alternatifs de production. Il s'agit aussi de développer de nouveaux systèmes de production dans les zones humides sensibles, en minimisant l'impact de l'aquaculture, et également d'évaluer les dangers associés à l'introduction de nouvelles espèces à des fins aquacoles.

L'aspect de caractérisation de la ressource génétique s'intègre dans le cadre du projet ANR Hi-Flo (2009-2011; <http://hi.flo.free.fr/>). Ce projet, financé par l'Agence Nationale de la Recherche, regroupe quatre équipes de recherche (A.D.2M Roscoff, IFREMER La Tremblade/Brest, I.S.E.M Montpellier/Sète, L.E.S. La Rochelle) travaillant chacune sur un ou plusieurs modèles biologiques : la cione (*Ciona intestinalis*), l'huître creuse japonaise (*Crassostrea gigas*), l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), la crépidule (*Crepidula fornicata*), la moule (*Mytilus* spp.), la telline *Macoma baltica*. Les principaux objectifs sont d'étudier les bases génétiques et l'histoire de la différenciation adaptative chez les espèces marines à fort flux génique, d'un point de vue théorique mais également expérimental. Il s'agit notamment de mieux comprendre les processus d'invasion ou de prolifération en milieu marin, afin d'apporter des clés pour une meilleure anticipation de ces phénomènes dans la gestion du littoral.

Ce manuscrit s'organise en six parties :

La première partie est consacrée à la présentation générale des connaissances indispensables à l'aboutissement de cette thèse. Successivement, les caractéristiques biologiques de l'organisme hôte, l'huître plate européenne *Ostrea edulis*, puis de son parasite *Bonamia ostreae* sont développées. Par la suite, les mécanismes de réponses des mollusques bivalves sont présentés succinctement. Puis, les méthodes développées afin d'étudier et d'améliorer la résistance de l'hôte à la bonamiose sont détaillées. Cette première partie se termine sur la présentation des objectifs du présent travail de thèse.

La seconde partie est consacrée à la présentation et à l'acquisition du matériel biologique d'étude. Le premier point présente les méthodes zootechniques utilisées pour produire une nouvelle génération d'huître plate à l'écloserie de la station IFREMER de La Tremblade. Le deuxième point présente l'origine des huîtres des différentes populations naturelles étudiées.

La troisième partie est consacrée à l'obtention de cartes génétiques de liaison, indispensables pour la suite des travaux de cette thèse. Après une présentation succincte de la disponibilité en marqueurs génétiques, un second point est consacré au développement de nouveaux outils moléculaires. Le troisième point présente l'utilisation de ces nouveaux outils afin de générer les nouvelles cartes génétiques qui seront utilisées dans la partie suivante.

La quatrième partie est consacrée aux expérimentations d'infection avec le parasite *Bonamia ostreae*. Les choix méthodologiques sont tout d'abord précisés. Par la suite, les phénotypes de réponse à la bonamiose sont successivement étudiés à trois échelles : 1- à l'échelle inter-familiale ; 2- à l'échelle à intra-familiale ; 3- à l'échelle inter-populationnelle.

La cinquième partie est consacrée à la caractérisation de la diversité et de la structure génétique des populations naturelles de l'huître plate européenne. Après un rappel des particularités démographiques des mollusques bivalves marins, ces deux points sont successivement présentés.

Enfin, la sixième partie rappelle les principaux résultats acquis dans le cadre du présent travail de thèse, et présente des perspectives.

## Première partie

# Contexte de la thèse

## I.1 Présentation de l'huître plate européenne

### I.1.1 Biologie de l'huître

#### I.1.1.1 Anatomie et systématique

L'huître plate européenne *Ostrea edulis* (Linné, 1758) est un mollusque bivalve appartenant à l'ordre des Filibranches et à la famille des Ostréidés :

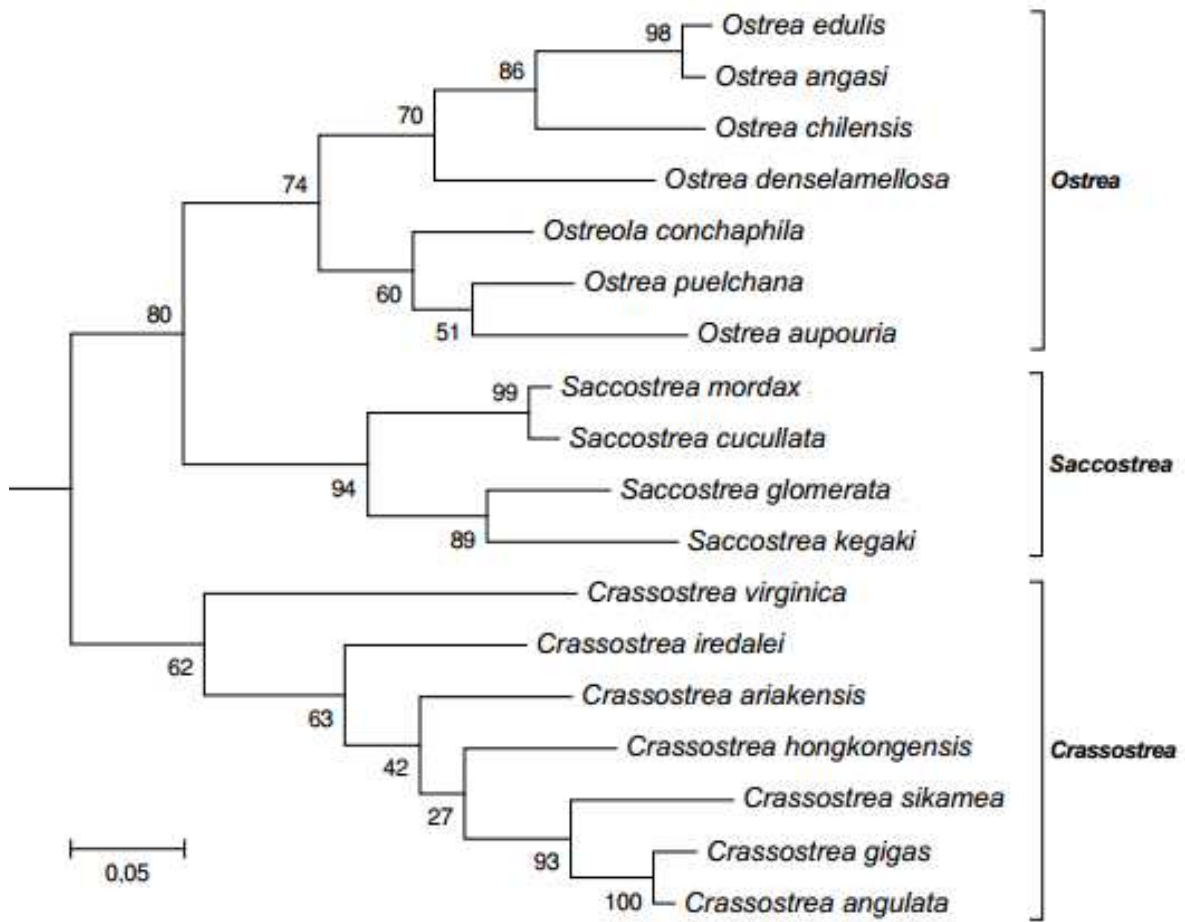
<b>Règne</b>	<i>Animalia</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Mollusca</i>
<b>Classe</b>	<i>Bivalva</i> (ou <i>Lamellibranchia</i> )
<b>Ordre</b>	<i>Filibranchia</i>
<b>Sous-ordre</b>	<i>Anisomyaria</i>
<b>Super famille</b>	<i>Ostreoidea</i>
<b>Famille</b>	<i>Ostreidae</i>
<b>Genre</b>	<i>Ostrea</i>
<b>Espèce</b>	<i>edulis</i>

Étant donné la grande plasticité de forme et d'aspect de la coquille, il est parfois difficile de distinguer morphologiquement les différentes espèces d'huîtres. Plusieurs classifications ont ainsi été proposées, notamment une classification à partir des caractéristiques morphologiques de la prodissoconque (coquille larvaire) (Ranson, 1967).

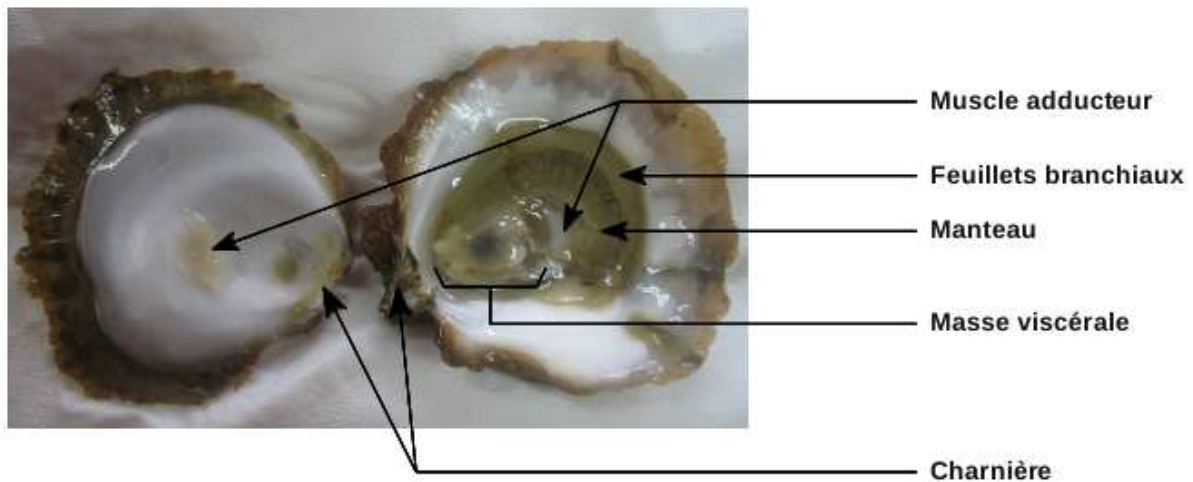
Selon les données moléculaires disponibles chez la famille des Ostréidés, *Ostrea edulis* est phylogénétiquement proche de l'huître plate australienne *Ostrea angasi* [Figure 1].

Comme tous les mollusques bivalves, l'huître plate présente un corps mou non segmenté composé d'un pied (au stade larvaire) et d'une masse viscérale recouverte d'un manteau qui sécrète une coquille calcaire. Cette coquille, constituée de deux valves reliées par une charnière, protège le corps de l'huître et la cavité palléale. Un muscle adducteur permet l'ouverture des deux valves. L'huître possède quatre feuillets branchiaux en lamelles, reliés deux à deux par des septa branchiaux transverses. La coquille de l'individu adulte est ovale et présente des stries de croissance sur sa partie extérieure [Figure 2].





**Figure 1** – Arbre phylogénétique basé sur une portion du génome mitochondrial de 19 espèces appartenant à la famille des Ostréidés (modifié d'après Danic-Tchaleu *et al.*, 2011).



**Figure 2** – Anatomie de l'huître plate européenne *Ostrea edulis*.

### I.1.1.2 Aire de distribution géographique

Le genre *Ostrea* regroupe plus de 40 espèces différentes réparties sur l'ensemble du globe, dans les eaux chaudes et tempérées.

L'huître plate européenne *Ostrea edulis* est une espèce endémique des côtes européennes. Elle vit

dans les eaux salées et peu turbides. Son aire de distribution géographique s'étend de la Mer du Nord aux côtes Atlantique de la péninsule ibérique, et de la Mer Méditerranée à la Mer Noire (**Figure 3**; Ranson, 1967; Jaziri, 1990).



**Figure 3** – Aire de distribution de l'huître plate européenne *Ostrea edulis*. Modifiée d'après Jaziri (1990). En rouge, le trait des côtes où l'espèce est présente.

À des fins aquacoles, *Ostrea edulis* a été introduite aux États-Unis dans les années 40 et 50 (Jaziri, 1990). Des populations naturelles ont par la suite été observées sur la côte Est des États-Unis, du Maine à Rhode Island, ainsi qu'au Canada (Vercaemer *et al.*, 2006).

### I.1.1.3 Particularité sexuelle et cycle de vie

#### Particularité sexuelle de l'huître plate

L'huître plate *O. edulis* présente un hermaphrodisme asynchrone et alternatif. C'est-à-dire que les individus mâles et femelles ne mûrent pas de façon synchrone et que plusieurs inversions du sexe, chez un même individu, peuvent se produire au cours d'une même saison de reproduction (Marteil, 1976). À l'heure actuelle, malgré de nombreuses recherches (Revue dans Marteil, 1976), on ne connaît que peu de choses sur les mécanismes qui régissent les changements de sexe chez l'huître et *a fortiori* chez l'huître plate.

Cycle de vie de *Ostrea edulis*

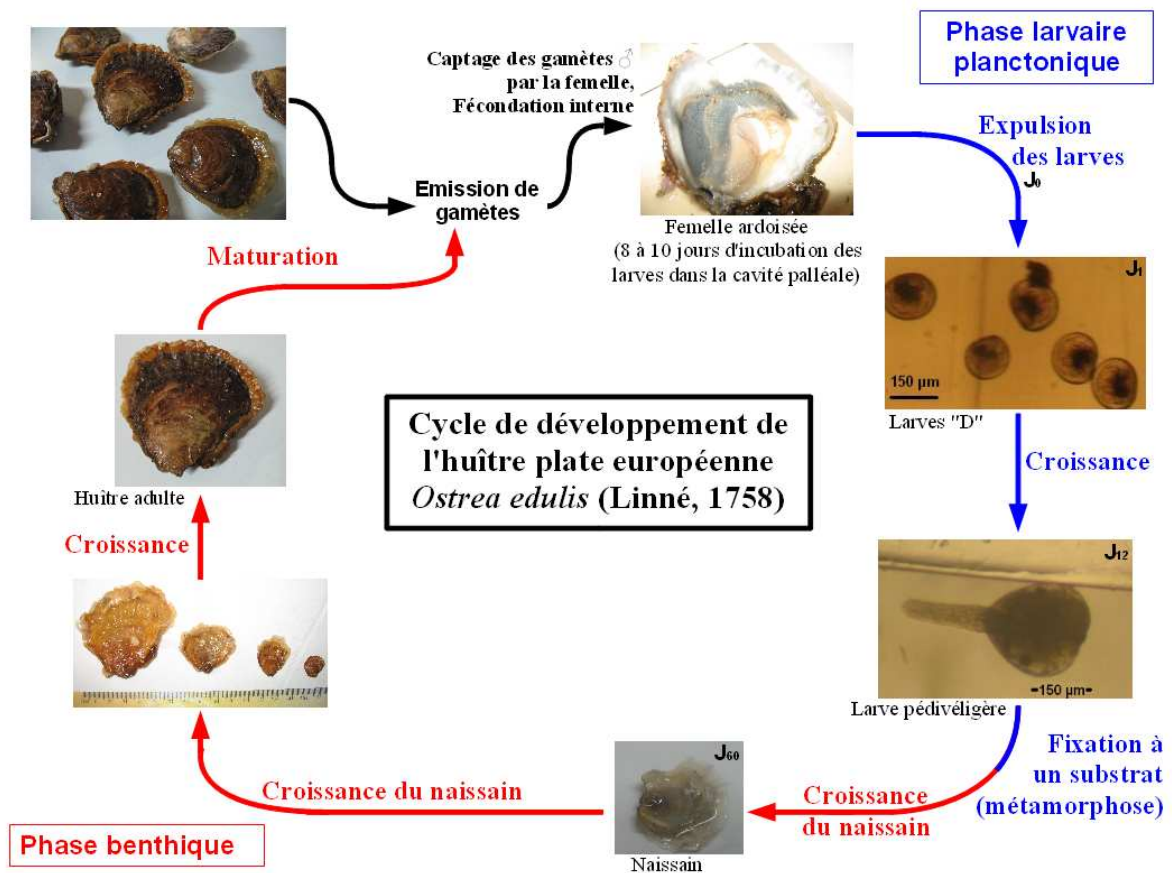


Figure 4 – Cycle de développement de l'huître plate européenne *Ostrea edulis*. Photos : E. Harrang.

En milieu naturel, la période de reproduction de l'huître plate se situe du printemps à l'automne. Contrairement à l'huître creuse *Crassostrea gigas* qui est ovipare, l'huître plate *Ostrea edulis* est larvipare. C'est-à-dire que l'individu mâle va émettre ses gamètes dans le milieu extérieur où l'individu femelle va les capter, puis les stocker dans sa cavité palléale où se déroule la fécondation [Figure 4]. La femelle produit en moyenne de 500 000 à 1 500 000 œufs à chaque épisode de ponte. Après 8 à 10 jours d'incubation dans la cavité palléale, les larves sont expulsées dans le milieu extérieur. Elles possèdent désormais une coquille constituée de deux valves égales (larves « D ») et entament alors la première phase de leur développement, la **phase larvaire planctonique**. Un velum les rend mobiles et leur permet de se nourrir de petites algues phytoplanctoniques (3-4 µm). En milieu naturel, la larve D, bien que mobile, subit les courants marins dispersifs. Environ 12 jours après l'expulsion, un pied se développe ainsi qu'un organe photosensible formant une tâche noire. Les larves sont devenues œillées et pédiveligères. Désormais, elles vont chercher à se fixer sur un substrat et vont réaliser une métamorphose. Une fois fixée, la jeune huître (stade naissain) entame la dernière phase de son développement, la **phase benthique**. L'huître se fixe généralement dans la zone de balancement des marées (zone intertidale) ou à l'étage infralittoral. Désormais, si les conditions physico-chimiques de l'environnement le permettent, l'huître ne cesse de croître. Lorsque les conditions du milieu le permettront, sa gonade subira sa première maturation. L'huître sera alors devenue un individu adulte et pourra

à son tour produire des gamètes.

Parmi les particularités démographiques de l'huître plate, on distingue une très forte fécondité, un fort potentiel de dispersion des larves, et une grande taille des populations adultes.

## I.1.2 Histoire mouvementée de l'huître plate sur les côtes européennes

### I.1.2.1 Une succession d'épisodes de mortalités

Bien que l'huître plate *Ostrea edulis* soit consommée depuis l'antiquité, elle a pendant longtemps souffert de l'absence de réglementation des pêches. Dès le XVIII<sup>ème</sup> siècle, des constatations relatent un affaiblissement des gisements naturels sur les côtes françaises dû à la sur-exploitation, qui semble conduire à une diminution du renouvellement naturel des gisements, voire à leur disparition (Coste, 1861 dans Gouletquer and Héral, 1997). De 1853 à 1859, un programme de repeuplement à partir du captage de naissain est développé pour renflouer les bancs naturels (Gouletquer and Héral, 1997); c'est le début de l'ostréculture moderne. Cependant, cette technique prometteuse se révèle vite insuffisante face à l'essor de la consommation des huîtres, suite au développement des chemins de fer.

Et c'est en 1860 que les premières importations d'huîtres creuses portugaises *Crassostrea angulata* (ou *Gryphea angulata*) sont organisées, à Arcachon, afin de subvenir aux besoins de l'aquaculture naissante. En quelques années l'huître portugaise se répand naturellement sur l'ensemble de la côte Atlantique française et cohabite avec *O. edulis* l'huître indigène (Gouletquer and Héral, 1997).

S'ensuivent trois épisodes de mortalités touchant principalement l'huître plate (Marteil, 1976). Tout d'abord, en 1877 une mystérieuse « maladie du pied » sévit en France, probablement due au champignon *Ostracoblabe implexa*. L'huître portugaise devient alors l'espèce majoritairement cultivée. Vers 1920-1922, une autre épizootie d'origine inconnue touche l'huître indigène. Dès lors, la production aquacole de *O. edulis* ne survit plus que grâce à l'importation d'huîtres âgées de 3 ans en provenance de Bretagne. Vers 1930, une « maladie de la coquille », probablement due au champignon *Ostracoblabe implexa*, s'attaque ensuite conjointement à *O. edulis* et à *C. angulata*.

Vers 1955, pour repeupler les stocks de *C. angulata*, le gouvernement français autorise alors le développement d'importantes filières commerciales avec l'Espagne et le Portugal. Le repeuplement fut si important que les bassins de culture furent surchargés, ralentissant la croissance des huîtres et fragilisant l'état de santé des cheptels (Héral, 1989; Héral and Deslous-Paoli, 1991; Gouletquer and Héral, 1997).

La croissance des huîtres portugaises étant ralentie, en 1966, un ostréculteur décide d'importer des huîtres creuses japonaises afin de comparer leurs performances de croissance avec celles de *C. angulata*. Deux nouvelles épizooties se déclarent alors rapidement, la « maladie des branchies » due à un Iridovirus (Comps, 1976; Marteil, 1976) et une maladie hémocytaire (Comps, 1983) éliminant progressivement *C. angulata* des côtes françaises. En 1967, pour ralentir la propagation de ces épizooties, le gouvernement français décide un embargo à l'encontre des importations en provenance du Japon (Andrews, 1980).

Auparavant, des huîtres *C. gigas* ont également été importées pour être élevées en Bretagne dans l'Aber Wrach (Andrews, 1980). À partir de 1968, la Bretagne (Aber Wrach, Finistère) signale de nouvelles mortalités de *O. edulis*, cette fois dues à une « maladie de la glande digestive » (maladie des Abers ou marteiliose), causée par le parasite *Marteilia refringens* (Comps, 1970; Herrbach, 1971; Grizel *et al.*, 1974; Marteil, 1976). De 1968 à 1975, cette maladie s'étend progressivement à la majorité des sites de culture de *O. edulis* (Marteil, 1976).

Malgré l'absence de preuve scientifique, l'apparition de la « maladie des branchies » chez *C. angulata* et de la marteiliose chez *O. edulis*, coïncident temporellement et géographiquement (Marteil, 1976; Andrews, 1980) avec les premières introductions de l'huître creuse japonaise sur les côtes françaises.

L'ostréiculture étant de nouveau mise à mal [Figure 5], le plan « Résur » est instauré en 1971. Ce plan d'urgence lève alors l'embargo sur l'huître creuse japonaise *C. gigas* et autorise une introduction en masse de naissain afin de remplacer *C. angulata* dans la production aquacole (Grizel and Héral, 1991). Dès l'année suivante, un captage naturel de *C. gigas* fut observé, témoignant des grandes capacités d'adaptation de cette espèce. Le captage étant suffisant, les importations cessent à partir de 1975 (Andrews, 1980).

Suite à l'épizootie de la marteiliose, les pratiques culturales ont évolué notamment par le développement de l'ostréiculture en eau profonde. En effet, sous la zone de balancement des marées la température moins élevée et la salinité plus forte semblent défavorables à *Marteilia refringens*. De plus, les volumes d'eau oscillante étant plus importants, ils permettent une dispersion des parasites (Fouche, 1997). Cependant, à partir de 1979, un nouveau parasite de *O. edulis* est signalé en Bretagne. Il s'agit de *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980; Comps *et al.*, 1980; Comps, 1983) responsable de la maladie appelée bonamiose. Les huîtres plates malades se reproduisent toujours mais meurent avant d'atteindre une taille suffisante pour la commercialisation. Dès 1981, en Bretagne, tous les centres importants d'élevage sont touchés par la maladie (Tige *et al.*, 1982). Depuis l'émergence de la bonamiose, moins de 2 000 tonnes d'huîtres plates sont produites par an, en France [Figure 5 et Figure 6].

En 1981, un plan national de sauvegarde de *O. edulis* est mis en place. Il vise à interdire le transfert des huîtres contaminées en obligeant leur commercialisation ou leur destruction et impose de fermer à l'élevage les zones fortement parasitées. Bien que peu efficace, ce plan de sauvegarde a eu au moins le mérite de rétablir des conditions d'élevage plus favorables aux animaux. En parallèle, des sites expérimentaux voient le jour, en eau profonde, afin de tester de nouvelles pratiques d'élevages notamment une réduction de la densité (Fouche, 1997).

Actuellement, en Europe, environ 140 000 tonnes d'huîtres creuses, et environ 5 500 tonnes d'huîtres plates sont produites par an (Eurostat / 2004, CNC, France ; <http://www.cnc-france.com>). En France, la production d'huîtres plates s'élève à 1 300 tonnes pour la période 2010/2011, ce qui correspond à 1 % de la production conchylicole totale [Figure 6].

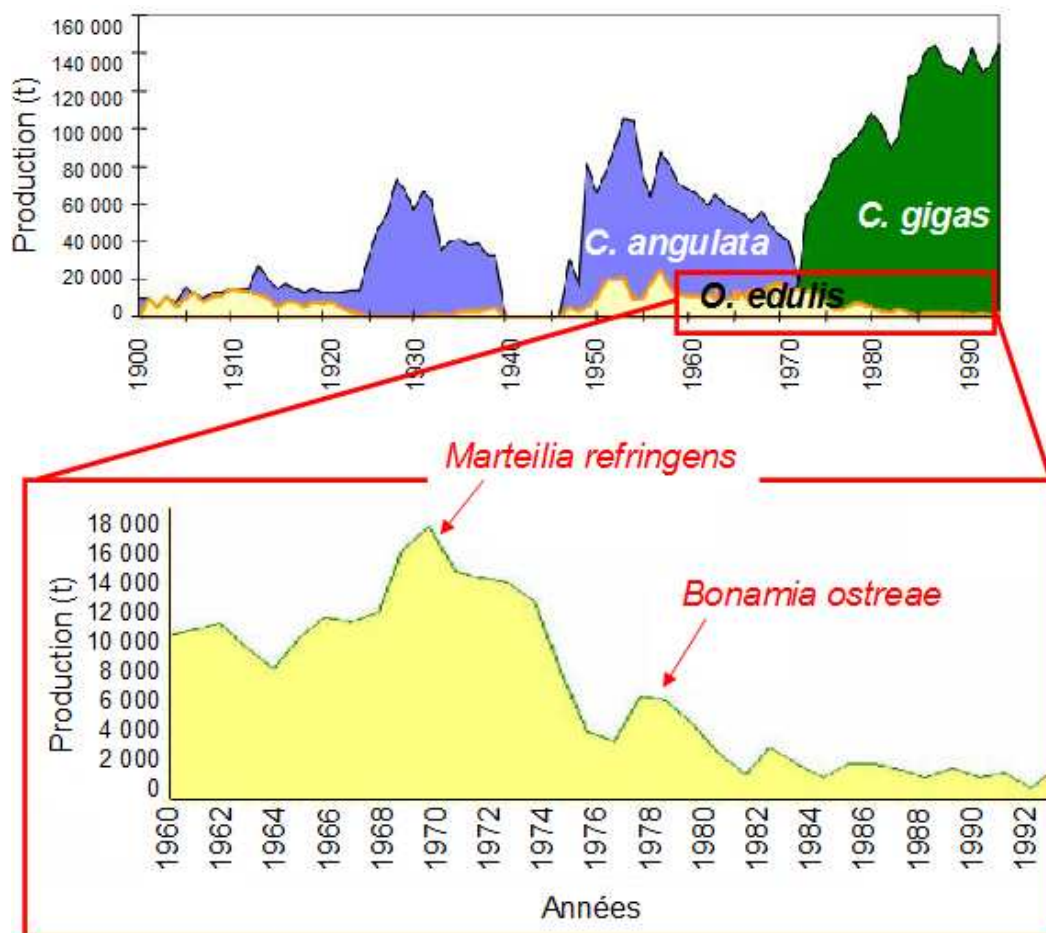


Figure 5 – Production ostréicole française au cours du XXème siècle.

### Répartition de la production nationale par coquillage

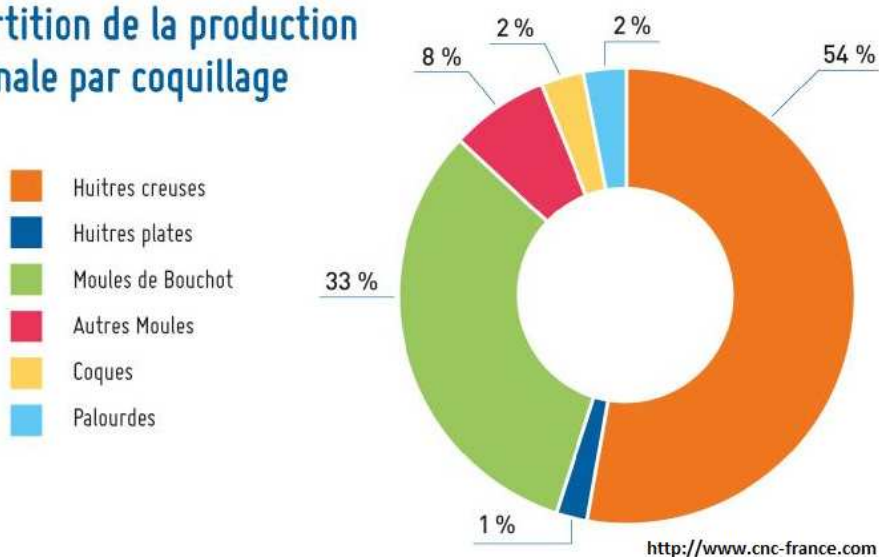


Figure 6 – Production française de coquillage pour la période 2010/2011. La production d'huîtres plates s'élève à 1300 tonnes.

### I.1.2.2 Les transferts de coquillages et leur réglementation

#### Les transferts

La distinction des zones de captage et des zones d'élevage a conduit au développement de ce que l'on appelle les « transferts ». Il s'agit généralement de déplacements d'huîtres d'une région côtière à une autre, pour des raisons commerciales.

Mais ces transferts ont également lieu à une plus grande échelle géographique. En effet, des huîtres peuvent également être « transplantées » d'un pays à un autre. Ces transplantations ont tout d'abord eu lieu de façon anecdotique pour renforcer les élevages suite à de très faibles recrutements naturels survenus certaines années de grand froid hivernal. Ainsi, les pays du Nord de l'Europe, tels que la France, la Grande-Bretagne, la Hollande et le Danemark (ICES, 1972 dans [Andrews, 1980](#)), ont été les premiers à transplanter l'huître plate européenne sur leurs côtes en support aux productions locales. Par le passé, des épisodes de mortalités ont également été suivis par des importations massives d'huîtres plates en provenance de la Mer Adriatique, de Grèce, d'Espagne et du Portugal.

De plus, pendant sa période faste, l'huître plate européenne représentait un atout majeur pour l'aquaculture. À cette fin, elle a été introduite au Canada, aux États-Unis, au Japon et en Afrique du Sud ([Newkirk and Haley, 1982](#); [Elston \*et al.\*, 1986](#); [Vercaemer \*et al.\*, 2006](#)).

Au début de l'ostréiculture, les introductions et mouvements de coquillages n'étaient régis par aucune réglementation, même locale. Ainsi, de nombreux transferts d'huîtres ont précédé l'émergence de mortalités massives chez les populations natives, suite à l'introduction de nouveaux pathogènes dévastateurs ([Renault, 1996](#)).

#### Réglementation européenne en matière de transferts

Pour faire face à l'émergence et à la propagation d'un certain nombre d'épizooties (**cf. Partie I.1.2**), plusieurs réglementations zoo-sanitaires ont été établies à l'échelle de la France mais également de l'Europe. Ces mesures visent notamment à renforcer la traçabilité des lots d'huîtres, et rendent illégal leur transport sans un certificat sanitaire d'accompagnement.

La Directive 2006/88/CE définit un cadre réglementaire pour les transferts de coquillages en fonction du statut des zones concernées, vis-à-vis des maladies à déclaration obligatoire. Afin de ne pas mettre en péril le statut sanitaire des animaux aquatiques présents aux sites de destination, il n'est ainsi plus possible d'exporter des huîtres d'une zone considérée comme à risque vers une zone qualifiée indemne. Pour le transfert de lot de coquillages vers un pays tiers (hors UE), il est également indispensable de disposer d'un certificat d'exportation.

Les règlements No 708/2007 et No 1251/2008 prévoient également des mesures de restrictions, des conditions de police sanitaire ainsi que des exigences de certification applicables aux importations dans la Communauté Européenne. Ils imposent aux États membres de prendre des mesures appropriées afin d'éviter tout effet néfaste sur la biodiversité, et particulièrement sur les espèces, les habitats et les fonctions des écosystèmes, qui sont susceptibles de résulter de l'introduction ou

du transfert à des fins aquacoles d'organismes aquatiques ou d'espèces non visées ainsi que de la propagation de ces espèces dans la nature.

Afin de coordonner les mesures zoo-sanitaires à l'échelle de l'Europe, la directive européenne 2006/88/CE prévoit l'établissement d'un Laboratoire de Référence pour l'UE. Elle prévoit également que chaque État membre dispose d'un Laboratoire National de Référence pour les maladies des mollusques bivalves, avec notamment pour mission la surveillance de routine du statut zoo-sanitaire des coquillages. En France, cette mission est remplie depuis décembre 2009 par le Laboratoire de Génétique et de Pathologie d'IFREMER La Tremblade, en coordination avec le réseau REPAMO (REseau de PAtologie des MOllusques) créé en 1986.

Pour les mollusques, cette directive concerne toutes les maladies émergentes et importantes, et propose une surveillance pour certaines maladies à déclaration obligatoire (annexe IV, partie II). Les maladies répertoriées qui affectent l'huître plate européenne sont : les maladies exotiques *Bonamia exitiosa* et *Microcytos mackini*, et les maladies non exotiques à déclaration obligatoire *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*.



## I.2 Focus sur la bonamiose

La bonamiose est une maladie parasitaire létale des huîtres plates due aux parasites du genre *Bonamia* sp. Cette maladie n'altère pas les qualités gustatives de l'huître, et n'entraîne aucun méfait chez l'homme (Perraudin, 1984 dans Blanchet, 2005).

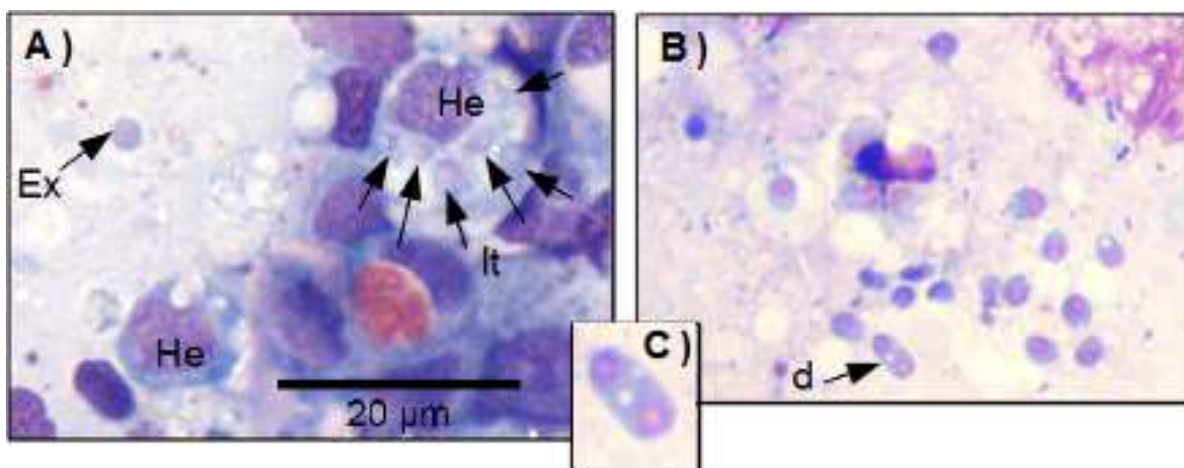
### I.2.1 Structure cellulaire et taxinomie

#### Structure cellulaire

Le parasite *Bonamia ostreae* est identifié à une forme dense de petite taille, présente à l'intérieur des hémocytes (Pichot *et al.*, 1980).

D'un point de vue ultra-structural, deux types de cellules parasitaires ont été décrits. Tout d'abord, une « forme dense » de 2 à 3  $\mu\text{m}$ , qui semble correspondre au type cellulaire le plus fréquent dans les tissus infectés. Et une cellule de « forme claire » de taille plus variable (2,5 à 7  $\mu\text{m}$ ) qui présente quelques différences au sein de ses organites, notamment un cytoplasme moins dense en particules ribosomales, un noyau comportant un nucléole volumineux à sa périphérie, un simili d'appareil de Golgi et des mitochondries comportant davantage de replis membranaires. Le cytoplasme des deux types cellulaires présente également des particules denses structurées (PDS) assimilées à des haplosporosomes.

Le parasite peut être observé à l'intérieur ou à l'extérieur des hémocytes [Figure 7].



**Figure 7** – Observations au microscope photonique d'appositions de branchies d'une huître *Ostrea edulis* infectée par *Bonamia ostreae*. **A)** Le parasite peut être extracellulaire (Ex) ou intracellulaire (It) à l'intérieur des hémocytes (He). **B)** Observation de la forme extracellulaire des cellules du parasite *Bonamia ostreae*. En bas de la photographie on peut remarquer une cellule en division (d). **C)** Agrandissement de la division binaire de *Bonamia ostreae*. Photos : E. Harrang.

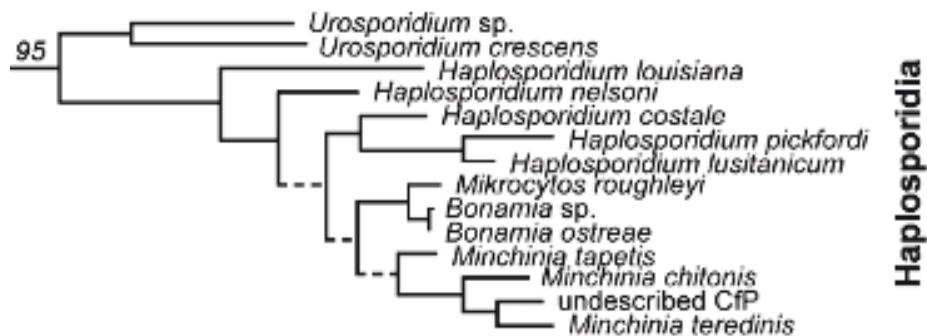
Dans la cellule hôte, le parasite présente une phase de multiplication de type schizogonique, par divisions binaires simples (Pichot *et al.*, 1980, et Figure 7). Cependant, parfois, la division cellulaire ne se produit pas après la répllication du matériel génétique et la cellule se présente sous forme d'un plasmode plurinucléé (Pichot *et al.*, 1980).

## Taxinomie de *Bonamia ostreae*

*Bonamia ostreae* est un protozoaire (organisme unicellulaire) appartenant à l'embranchement des Cercozoaires (Cavalier-Smith and Chao, 2003) et au sous-embranchement des *Endomyxa*. La présence des particules denses structurées intra-cytoplasmiques, assimilées à des haplosporosomes, permet de classer ce parasite dans l'ordre des *Haplosporididae* [Figure 8] malgré l'absence de la formation de spores (Comps *et al.*, 1980; Pichot *et al.*, 1980). Il est à noter que des spores ont été observées chez un autre parasite du genre *Bonamia*, *B. perspora* (Carnegie *et al.*, 2006).

Cette classification phylogénétique est confirmée sur la base d'analyses moléculaires de l'ADN ribosomal (Carnegie *et al.*, 2000; Reece *et al.*, 2004) et du gène de l'actine (López-Flores *et al.*, 2007).

Néanmoins, l'absence de la formation de spores chez certaines espèces classées dans l'ordre des *Haplosporidium* tend à considérer qu'il s'agit d'un groupe paraphylétique (Hine *et al.*, 2009).



**Figure 8** – Détail de l'embranchement des Haplosporididae selon la classification phylogénétique établie par Reece *et al.* (2004) à partir du séquençage de la petite sous-unité ribosomale de l'ADNr.

## I.2.2 Spectre d'hôtes et distribution géographique actuelle

### Spectre d'hôtes

*Bonamia ostreae*, inféodé à l'huître plate européenne *Ostrea edulis*, n'est pas la seule espèce du genre *Bonamia* à provoquer la maladie de la bonamiose. Cette maladie est aussi déclenchée chez d'autres espèces de la famille des Ostréidés par *Bonamia exitiosa*, *Bonamia perspora* et *Bonamia roughleyi*.

*B. exitiosa* a été détecté chez *Ostrea chilensis* en Nouvelle-Zélande et au Chili (Hine *et al.*, 2001; Berthe and Hine, 2003; Cranfield *et al.*, 2005; Lohrmann *et al.*, 2009) mais également chez *Ostrea angasi* en Australie (Corbeil *et al.*, 2006), *Ostrea puelchana* en Argentine (Kroeck and Montes, 2005) et *Crassostrea ariakensis* en Caroline du Nord, à l'Est des USA (Burreson *et al.*, 2004). Récemment, *B. exitiosa* a également été détecté chez *O. edulis* sur la côte Atlantique de Galice en Espagne (Abollo *et al.*, 2008), sur la côte Adriatique d'Italie (Narcisi *et al.*, 2010) et en Corse (Guichard *et al.*, 2010). Il est également suspecté chez *Ostrea stentina* sur les côtes de Tunisie (Hill *et al.*, 2010).

*B. perspora* et *B. roughleyi* ont été détectés respectivement chez *Ostreola equestris* en Caroline du Nord (Carnegie *et al.*, 2006) et chez *Saccostrea glomerata* en Australie (Farley *et al.*, 1988; Cochenec-Laureau *et al.*, 2003a).

D'autre part, afin de repeupler les bancs naturels d'huîtres plates, des tests d'acclimatation ont été réalisés sur d'autres espèces d'huîtres plates. Après importation, ces huîtres ont été mises en quarantaine avant d'être testées sur les côtes contaminées par *B. ostreae*. Ces tests ont mis en évidence une sensibilité à *B. ostreae* chez *Ostrea chilensis* (Grizel *et al.*, 1982), *Ostrea angasi* (Bougrier *et al.*, 1986) et *Ostrea puelchana* (Pascual *et al.*, 1991).

### Distribution géographique

*Bonamia ostreae* fut pour la première fois observé, l'été 1979, sur des huîtres mortes provenant de l'île Tudy, en Bretagne sud (Comps *et al.*, 1980).

En une dizaine d'années après sa première détection, le parasite s'est rapidement propagé, lors des transferts de lots de coquillages, sur l'ensemble de la façade Atlantique ainsi que sur la côte Méditerranéenne française (Projet DIPNET, <http://www.revistaaquatic.com/DIPNET/>, Cameron *et al.*, 2006; Culloty and Mulcahy, 2007; Arzul *et al.*, 2010) et la côte Adriatique italienne (Tiscar *et al.*, 2002; Narcisi *et al.*, 2010). La **Figure 9** présente les traits de côtes où le parasite a été détecté ainsi que les zones de côtes où il n'a pas été détecté chez l'espèce hôte *Ostrea edulis*. Chaque année, la réunion des Laboratoires Nationaux de Référence (LNRs) en matière de pathologie des mollusques permet d'actualiser la carte des zones contaminées (cf. Arzul *et al.*, 2010).



**Figure 9** – Aire de distribution de l'huître plate européenne *Ostrea edulis* sur les zones côtières infectées par le parasite *Bonamia ostreae* (en rouge) et les zones où le parasite n'a pas été détecté (en vert). La chronologie de la propagation de l'épizootie est indiquée au moyen de l'année de première détection (en bleu).

Un organisme pathogène, de structure identique à *B. ostreae* mais connu sous le nom de « microcell » avait déjà été observé chez des huîtres plates *O. edulis* de la Baie de Morro, aux États-Unis (Katkansky *et al.*, 1969).

Des analyses effectuées sur des isolats de parasites provenant de diverses zones infectées à travers l'Europe, et également d'une zone située aux États-Unis (Mialhe *et al.*, 1988b; Carnegie *et al.*, 2000), ont permis de conforter l'hypothèse d'Elston et collaborateurs (1986) à savoir une provenance américaine du parasite *B. ostreae*. Ainsi, *B. ostreae* proviendrait d'un site sur la côte Pacifique d'Amérique du Nord (the Elkhorn Slough, California site), qui aurait contaminé la Californie puis le reste de l'Amérique du Nord (région du Maine, Friedman and Perkins, 1994) et l'Europe (Elston *et al.*, 1986).

### I.2.3 Symptômes et facteurs influençant la maladie

#### Symptômes de la maladie

Le parasite est principalement observé à l'intérieur des hémocytes, les cellules circulantes du système immunitaire inné. Des hémocytes infectés ont été identifiés dans différents tissus : manteau, branchies, tissu conjonctif de la glande digestive, épithélium du tractus digestif (revue dans Blanchet, 2005).

La présence du parasite a été associée à des lésions tissulaires telles qu'une indentation des tissus branchiaux (Comps *et al.*, 1980). Chez les individus parasités, des infiltrations d'hémocytes sont fréquemment observées entre les cellules épithéliales et les tissus conjonctifs, traduisant une importante réaction inflammatoire de l'hôte.

La mortalité des individus est positivement corrélée à la présence du parasite, mais elle n'est pas constante. Beaucoup d'individus meurent avec un niveau d'infection faible, d'autres avec une infection forte (revue dans Blanchet, 2005).

#### Facteurs influençant le développement de la maladie

Le sexe et l'âge des huîtres ne semblent pas influencer la maladie (Culloty and Mulcahy, 1996; Lynch *et al.*, 2005). L'infection peut se produire chez les stades juvéniles (y compris les larves) (Lynch *et al.*, 2005; Arzul *et al.*, 2011) et adultes. En milieu naturel, les mortalités apparaissent sur les individus âgés d'au moins deux ans (Balouet *et al.*, 1983; Grizel, 1985).

Le cycle de développement et la cinétique d'infection du parasite *Bonamia ostreae* ne sont pas complètement élucidés malgré les nombreuses études réalisées sur le sujet.

L'observation de lésions sur les feuillets branchiaux (Comps *et al.*, 1980) semblerait montrer que le parasite puisse pénétrer dans l'huître par voie branchiale (Bucke, 1988; Montes *et al.*, 1994). Une fois traversé la barrière de l'épithélium branchial, le parasite serait phagocyté par les cellules circulantes du système immunitaire inné, les hémocytes. Le parasite présenterait ensuite une phase de multiplication de type schizogonique, par divisions binaires simples des formes parasitaires claires, assimilées à des cellules végétatives, situées dans les hémocytes (Pichot *et al.*, 1980). Les

formes denses correspondraient quant à elles à une forme de résistance du parasite, voire à la forme infectante (Pichot *et al.*, 1980).

La mobilité des hémocytes favoriserait ensuite la dissémination des cellules parasitaires dans tous les tissus de l'huître (tissu conjonctif de la glande digestive, filaments branchiaux, etc.). Quand le parasite prolifère, les membranes des hémocytes se rompent et le parasite est ainsi libéré. Les lésions tissulaires se multiplient alors entraînant bien souvent la mort de l'hôte. De son vivant, l'hôte produit également des pseudo-fécès dans lesquels il relargue des cellules parasitaires (Culloty and Mulcahy, 2007) qui sont alors libres d'infecter un nouvel hôte. Par ailleurs, les parasites survivraient à la mort de leur hôte et seraient relargués dans le milieu extérieur, lors de la dégradation des tissus. Il semblerait que les parasites puissent survivre sans hôte, dans l'eau de mer, pendant au moins une semaine (Arzul *et al.*, 2009).

Ce cycle de développement hypothétique tend à être confirmé par un certain nombre d'observations et notamment par la possibilité d'infecter expérimentalement des huîtres saines par cohabitation avec des huîtres infectées (pour une revue, voir Lallias *et al.*, 2008).

Les premières études de transmission du parasite ont été réalisées par le transfert d'huîtres saines dans un environnement naturel contaminé. Par la suite, des huîtres malades ont été prélevées sur le terrain et mises au contact, au laboratoire, avec des huîtres naïves. Puis, avec le développement d'un protocole de purification de *B. ostreae* à partir d'huîtres infectées (Mialhe *et al.*, 1988a), des expériences d'infection par injection de parasites ont pu être réalisées (ex. : Hervio *et al.*, 1995; Culloty *et al.*, 1999; Lallias *et al.*, 2008).

Quels que soient le mode d'infection choisi et la saison de mise en contact, la maladie se développe après une période de latence qui varie d'environ quatre semaines à plusieurs mois (ex. : Poder *et al.*, 1983; Grizel *et al.*, 1988; Culloty and Mulcahy, 1996). En milieu naturel, bien que l'infection puisse avoir lieu toute l'année, deux pics de mortalités des huîtres plates se produisent à la fin de l'hiver et à l'automne (Culloty and Mulcahy, 1996). Hine (1991) a ainsi élaboré un cycle de vie du parasite avec une phase d'incubation (septembre à novembre) suivie d'une phase de prolifération (décembre à mai) et d'une phase plasmodiale (juin à août). Cette hypothèse, bien que non confirmée, pourrait expliquer le fait que le parasite ne soit parfois pas détecté pendant la période estivale.

En milieu naturel, il semblerait que l'infection à *B. ostreae* soit difficile à éradiquer. En effet, la maladie semble pouvoir se déclarer, avec toutefois une forte diminution de la prévalence, chez des huîtres saines ré-implantées dans une zone préalablement nettoyée de ses huîtres malades et abandonnée pendant plusieurs années (van Banning, 1987). Étant donnée l'absence d'observation de spore chez cette espèce, cette constatation suggère l'idée d'une espèce réservoir à la maladie, d'un éventuel hôte intermédiaire ou un vecteur de transmission. Bien que de précédentes études n'avaient pas permis de détecter *B. ostreae* chez d'autres espèces de bivalves (revue dans Culloty and Mulcahy, 2007), il semblerait que l'huître creuse *Crassostrea gigas* puisse transmettre la maladie (Lynch *et al.*, 2010). D'autre part, *B. ostreae* a été détecté chez plusieurs espèces de

macro-invertébrés et chez plusieurs espèces de zooplancton (Lynch *et al.*, 2007). Parmi ces espèces, il semblerait qu'une ophiure, *Ophiothrix fragilis*, soit capable de transmettre la parasitose. Cette ophiure étant prédatrice d'huîtres mortes, il est possible qu'elle ingère le parasite en se nourrissant d'individus morts de la bonamiose (Lynch *et al.*, 2007). Pour l'instant, rien ne prouve qu'elle soit impliquée dans le cycle de vie de *B. ostreae*.

#### I.2.4 Méthodes de détection

Étant donné qu'aucun signe clinique ne semble observé systématiquement en cas de bonamiose, il est nécessaire de recourir à des méthodes de diagnostic afin de confirmer la présence du parasite *Bonamia ostreae*.

Plusieurs méthodes de détection du parasite ont été développées. Les observations de coupes histologiques (Pichot *et al.*, 1980) ou d'empreintes de tissu cardiaque ou branchial en microscopie photonique permettent d'identifier la présence du parasite, mais également de distinguer différentes intensités de contamination (Bachère *et al.*, 1982; Hervio *et al.*, 1995; da Silva and Villalba, 2004).

Une méthode sérologique via l'utilisation d'anticorps a également été développée (Mialhe *et al.*, 1988b; Rogier *et al.*, 1991), mais n'est plus utilisée aujourd'hui.

Pour améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic de *Bonamia ostreae*, des méthodes moléculaires ont ensuite été développées. Une méthode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a notamment été développée sur le principe de la détection de la présence de la séquence conservée de la sous-unité 18S de l'ADN ribosomal du parasite (Carnegie *et al.*, 2000; Cochenec *et al.*, 2000; Flood, 2007).

Une méthode d'hybridation *in situ* a également été développée pour permettre l'identification des tissus infectés (Cochennec *et al.*, 2000; Carnegie *et al.*, 2003).

Des différences structurales ayant été observées entre des parasites du genre *Bonamia* provenant de différentes régions géographiques, il s'est avéré nécessaire de pouvoir distinguer d'un point de vue moléculaire les différentes espèces de *Bonamia* sp. À cette fin, une PCR RFLP a été développée à partir de la séquence 18S de l'ADNr du parasite (Cochennec *et al.*, 2000) et de l'utilisation de l'enzyme de restriction *BglII* (Hine *et al.*, 2001). Avec l'utilisation combinée de l'enzyme de restriction *HaeII*, cette méthode permet désormais de distinguer les trois espèces *B. ostreae*, *B. exitiosa* et *B. roughleyi* (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a); *B. perspora* n'étant pas distinguable de *B. exitiosa*. Il est également possible de distinguer ces espèces selon la séquence de leur région ITS (Corbeil *et al.*, 2006).

Ces méthodes ne permettant pas d'estimer l'intensité de l'infection, une PCR en temps réel a ensuite été développée spécifiquement pour quantifier la charge en *Bonamia ostreae* (Robert *et al.*, 2009).

Malgré les nombreuses études comparatives entre ces différentes méthodes de diagnostic (Diggle *et al.*, 2003; da Silva and Villalba, 2004; Balseiro *et al.*, 2006), il s'avère que chacune d'elle trouve

son champs d'application. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) recommande l'utilisation conjointe de plusieurs méthodes de diagnostic, suivant le statut sanitaire de la zone géographique échantillonnée (**Table 1** ; O.I.E., 2011).

**Table 1** – Recommandations d'utilisation des différentes méthodes de diagnostic de *Bonamia* sp. (modifié d'après O.I.E., 2011).

Méthode de diagnostic	Objectif(s) du diagnostic
Empreinte tissulaire	Surveillance, présomption de contamination
Histopathologie	Surveillance, présomption de contamination
PCR	Détection de <i>Bonamia</i> sp.
PCR-RFLP	Confirmation de l'espèce de <i>Bonamia</i>
Microscopie électronique	Confirmation de l'espèce de <i>Bonamia</i>
Hybridation <i>in-situ</i>	Confirmation d'infection à <i>Bonamia</i> sp.
PCR en temps réel	Quantification de la charge parasitaire en <i>B. ostreae</i>
Séquençage	Confirmation de l'espèce de <i>Bonamia</i>

### I.2.5 Contrôle et moyens de lutte contre la maladie

Les conditions de vie et le bagage génétique des organismes conditionnent leurs capacités de réponses aux agents pathogènes auxquels ils peuvent être confrontés. Aussi, les mollusques bivalves étant des organismes vivants en milieu naturel ouvert et ne disposant pas d'un système immunitaire acquis, il n'est pas possible de contrôler la maladie par l'utilisation de vaccins, comme cela est souvent le cas chez les vertébrés.

Dans ces conditions, afin de ralentir et de réguler la propagation de la bonamiose, et de prévenir son émergence dans les zones non encore contaminées, des mesures prophylactiques ont été mises en place.

Ces mesures dépendent du contexte environnemental, du statut de la zone, et de la pratique culturelle (Blanchet, 2005) :

- Protection des zones non infectées ;
- Diminution de la pression parasitaire dans les zones infectées, et recherche de l'éradication du parasite ;
- Favorisation des techniques d'élevage performantes malgré la bonamiose tout en maintenant la vigilance sanitaire.

Les mesures prophylactiques consistent principalement en une surveillance sanitaire et une restriction des transferts d'animaux [cf. **Partie I.1.2.2**].

Afin de diminuer l'impact de la maladie, il est nécessaire de mieux connaître le développement du parasite, et les mécanismes de réponses de l'hôte [cf. **Partie I.3**]. De plus, étant donné que des

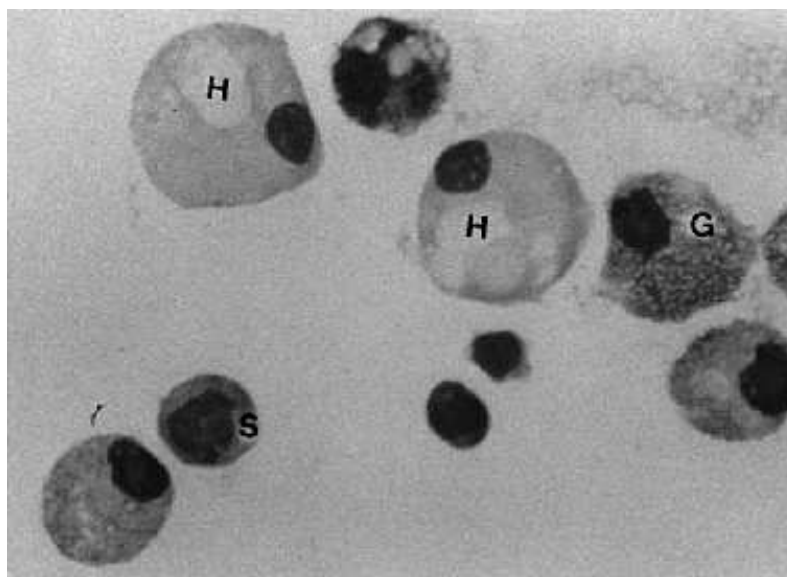
bancs naturels d'huîtres plates se maintiennent de façon localisée sur les côtes européennes, même en présence du parasite *B. ostreae*, il est également nécessaire de comprendre et d'améliorer ce phénomène de résistance à la maladie [cf. **Partie I.4**].



### I.3 Mécanismes de réponse aux agents pathogènes

Les mollusques marins bivalves possèdent un système immunitaire inné adapté à reconnaître et à distinguer les particules étrangères infectieuses de leurs propres particules endogènes. Ce système immunitaire inné est capable de déclencher des mécanismes cellulaires et humoraux de défenses (Bachère *et al.*, 1995; Rowley and Powell, 2007). Les principales cellules immunitaires déployées sont les hémocytes. Ce sont des cellules circulantes que l'on retrouve dans l'hémolymphe de tous les tissus de l'organisme invertébré. Ces cellules sont capables de reconnaître une particule exogène à l'hôte, de la phagocytter ou de l'encapsuler, et de la détruire. Les mécanismes de défense de l'huître reposent principalement sur la phagocytose et la dégradation oxydative des pathogènes potentiels.

Chez l'huître plate européenne, trois types de cellules hémocytaires ont été identifiées : les granulocytes, les cellules agranuleuses larges (ou larges hyalinocytes) et les cellules agranuleuses basophiles (ou petits hyalinocytes) (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003b, et **Figure 10**).



**Figure 10** – Hémocytes cytocentrifugés et colorés avec le Kit Hemacolor (grossissement x800). G : granulocyte; H : large hyalinocyte; S : petit hyalinocyte (d'après Xue *et al.*, 2000).

#### I.3.1 Mécanismes à médiation cellulaire

Suite à une agression physique, chimique ou biologique, la réaction inflammatoire de l'organisme se traduit par une élévation de la proportion d'hémocytes dans le système circulatoire, vers la région infectée ou endommagée. Chez l'huître plate, la présence du parasite *Bonamia ostreae* a souvent été associée à une augmentation des hémocytes circulants (Xue and Renault, 2000; Xue *et al.*, 2000; Cochennec-Laureau *et al.*, 2003b; da Silva *et al.*, 2008) ainsi qu'à l'observation d'une infiltration hémocytaire entre les cellules épithéliales et les tissus conjonctifs. Les hémocytes sont également capables de réparer des lésions par coagulation. Ces phénomènes de cicatrisation de

lésions ont effectivement pu être observés chez *O. edulis* dans le cadre d'une infection à *B. ostreae* (Marteil, 1976).

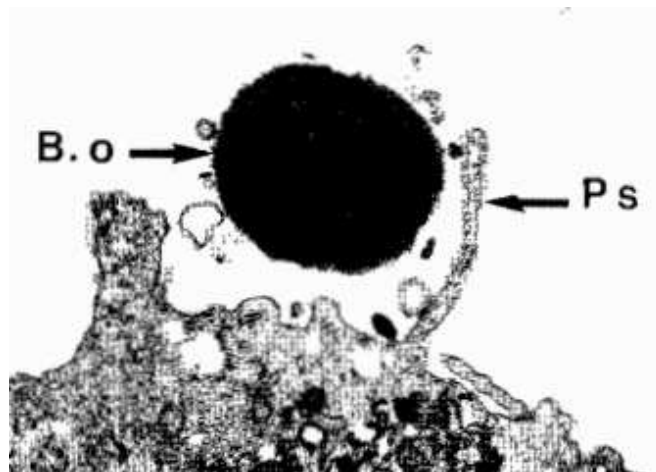
Après cette phase de recrutement, les hémocytes vont intervenir par phagocytose ou par encapsulation, afin d'internaliser le pathogène potentiel (virus, bactéries, champignons, protozoaires). Le mécanisme de phagocytose est constitué des phases de reconnaissance et d'adhésion, d'internalisation, puis de dégradation avant l'élimination des particules exogènes. Chez *Ostrea edulis*, les trois types cellulaires d'hémocytes participent à ce mécanisme (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003b). Il semblerait également que le parasite participe à sa propre internalisation (Chagot *et al.*, 1992). L'activité de phagocytose a notamment été étudiée chez *O. edulis* en présence de *Bonamia ostreae* (Chagot, 1989; Morga *et al.*, 2009, 2011b).

1- La reconnaissance et l'attachement des particules exogènes font intervenir des récepteurs membranaires tels que les lectines (Canesi *et al.*, 2002; Tasumi and Vasta, 2007). Ces protéines sont présentes dans l'hémolymphe, et dans tous les tissus et les cellules de l'organisme. Plusieurs types de lectines ont été identifiés chez les invertébrés (lectines de type C, galectines). Ces protéines reconnaissent les ligands exogènes de type glycannes ou  $\beta$ -galactosides présents à la surface des particules exogènes ou endogènes, et permettent l'immobilisation, l'opsonisation et la phagocytose de ces pathogènes potentiels (Tasumi and Vasta, 2007; Vasta, 2009). Chez les mollusques bivalves, l'expression de plusieurs lectines de type C ou de type galectines, ainsi que de protéines de liaison ont été identifiées modulées en présence de parasites (revue dans Morga, 2010). Un gène codant pour une galectine a notamment été trouvé sur-exprimé chez des huîtres plates infectées par la bonamiose (Morga *et al.*, 2011a,b).

D'autres types de protéines (protéines de liaison au LPS, récepteur Toll-like, MAP Kinase) peuvent intervenir dans les mécanismes de reconnaissance des pathogènes, et ont déjà été identifiés chez des mollusques bivalves (revue dans Morga, 2010).

2- L'internalisation des particules exogènes fait intervenir un remaniement du cytosquelette. Les mécanismes impliqués dans ce remaniement ne sont pas complètement élucidés, néanmoins trois modèles ont été proposés (Cheng, 1981; Morga, 2010). Le premier modèle propose une implication de filipodes puis une internalisation dans un phagosome. Le deuxième modèle propose une internalisation dans des vacuoles d'endocytose par invagination de la membrane cellulaire. Le troisième modèle propose une internalisation dans un phagosome par l'intermédiaire de pseudopodes.

Dans le cas de l'internalisation de *Bonamia ostreae* par les hémocytes de *Ostrea edulis*, ce troisième modèle semble privilégié. Le même mécanisme a été observé chez les hémocytes de *Crassostrea gigas* pour phagocyter *B. ostreae* [Figure 11].



**Figure 11** – Internalisation du parasite *Bonamia ostrea* (B.o) par un large hyalinocyte d'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ps : pseudopodes. Microscopie électronique x15 000 (Chagot *et al.*, 1992).

3- La dégradation des particules exogènes dans le phagolysosome fait intervenir des enzymes lysosomales anti-microbiennes, de l'oxyde nitrique et des espèces oxygénées réactives (EOR) (Canesi *et al.*, 2002).

Les EOR sont produits par le déclenchement d'une « flambée oxydative » (*respiratory burst*) suite à l'attachement des particules à la membrane cellulaire. Les composés formés sont l'hydrogène peroxyde ( $H_2O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), les radicaux hydroxydes ( $OH^{\cdot-}$ ) et l'anion hypochloride ( $OCl^{\cdot-}$ ). L'accumulation des radicaux oxygénés peut dégrader les membranes cellulaires. Ces radicaux en excès peuvent être transformés par plusieurs catalases ou oxydases, dont la Superoxyde dismutase (SOD) (Gonzalez *et al.*, 2005). L'expression de plusieurs SOD ont été identifiées modulées chez plusieurs bivalves en présence de parasite, dont *B. ostreae* chez *O. edulis* (Morga *et al.*, 2011a,b).

La production des EOR a été étudiée chez plusieurs mollusques bivalves (revue dans Morga, 2010) dont l'huître plate européenne où une modulation de cette activité a été associée à la présence de *B. ostreae* (ex. : Morga *et al.*, 2009, 2011b).

L'oxyde nitrique et les enzymes lysosomales sont des substances solubles faisant partie des mécanismes de l'immunité humorale [cf **Partie I.3.2**].

4- Les particules exogènes dégradées sont ensuite évacuées dans l'hémolymphe par l'intermédiaire de vésicules. Ce processus a notamment été décrit chez l'huître plate *O. edulis* (Auffret, 1985).

Malgré la mise en place de ces mécanismes de dégradation, certains pathogènes survivent à l'intérieur des hémocytes, sans être dégradés. C'est notamment le cas pour *Bonamia ostreae* (ex. : Chagot *et al.*, 1992; Mourton *et al.*, 1992). En effet, il semblerait que *B. ostreae* produisent des vésicules parasitophores au sein des cellules de l'hôte. La membrane de ces vésicules ne semble pas subir la lyse des enzymes lysosomales, permettant ainsi au parasite de se maintenir dans la cellule et de s'y multiplier. De plus, tout comme *Perkinsus marinus* un parasite de *Crassostrea virginica* (Schott *et al.*, 2003), *B. ostreae* semble être capable d'inhiber la production des EOR

(Hervio *et al.*, 1989; Morga *et al.*, 2009, 2011b), empêchant ainsi sa propre dégradation.

D'autre part, les cellules infectées de l'hôte peuvent également être conduites à l'apoptose. Ce mécanisme de mort cellulaire se caractérise notamment par la condensation et la fragmentation de l'ADN ainsi qu'un bourgeonnement des membranes cellulaires. Deux voies de signalisation peuvent activer ce mécanisme. La voie extrinsèque est activée par des récepteurs de la super-famille des TNF $\alpha$  (dont Fas ligand), alors que la voie intrinsèque est déclenchée par la mitochondrie. Ce mécanisme a été observé chez plusieurs espèces de bivalves dont l'huître plate européenne (revue dans Morga, 2010). L'expression d'un gène Fas ligand ainsi que celle d'un gène impliqué dans l'inhibition de ce mécanisme (IAP) ont notamment été identifiées modulées chez *O. edulis* en présence de *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2012).

### I.3.2 Mécanismes de l'immunité humorale

Les mécanismes de l'immunité humorale regroupent plusieurs types de substances solubles présentes dans l'hémolymphe (revue dans Morga, 2010) : les enzymes hydrolytiques lysosomales (Xue and Renault, 2000), les protéines de stress, la phénoloxydase, l'oxyde nitrique, les inhibiteurs de protéases, les peptides anti-microbiens (Rowley and Powell, 2007), ainsi que les cytokines (interférons, etc.).

Toutes ces substances ont été identifiées chez plusieurs espèces de bivalves (revue dans Morga, 2010).

Chez *Ostrea edulis*, une modulation des activités enzymatiques a été observée en présence de *Bonamia ostreae* (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003b; da Silva *et al.*, 2008; Morga *et al.*, 2009, 2011b).

## I.4 Étude et amélioration de la résistance à la bonamiose

Malgré la bonamiose, des gisements naturels d'huîtres plates européennes persistent dans le milieu naturel. Il s'avère ainsi important d'étudier cette résistance afin de tenter d'améliorer la survie des huîtres et ainsi raviver l'aquaculture de l'huître plate européenne. L'amélioration de la survie de *Ostrea edulis* consiste en la sélection d'animaux naturellement résistants à la mortalité induite par *B. ostreae*.

Dans tout le manuscrit, le terme « résistance » fait référence à des mécanismes permettant de diminuer l'infection, de réduire le développement du parasite ou d'éliminer l'infection (Lefèvre *et al.*, 2011). *A contrario*, le terme « sensibilité » fait référence à une moindre capacité à mettre en place de tels mécanismes.

Dans le cas des infections expérimentales [cf. **Partie IV**], le terme « résistance » sera employé pour désigner la survie d'un individu, et le terme « sensibilité » pour désigner la mort d'un individu.

### I.4.1 Sélection de lignées résistantes à la bonamiose

#### I.4.1.1 Premiers programmes de sélection de lignées « résistantes »

En partant de l'idée que, dans la plupart des relations hôte-parasite, l'organisme hôte développe un certain niveau de résistance au fil du temps (Ford and Haskin, 1987; Ford, 1988), de nombreuses études ont été menées afin d'identifier une ou plusieurs populations d'*O. edulis* potentiellement mieux adaptée(s) à survivre à la bonamiose.

Pour cela, des comparaisons sur sites et au laboratoire ont été effectuées entre des huîtres de plusieurs origines géographiques et de statuts sanitaires différents (Bachère and Grizel, 1985; Culloty *et al.*, 2001, 2004; da Silva *et al.*, 2005). L'objectif était d'identifier les populations avec le plus fort potentiel pour instaurer un programme de sélection contre la maladie. Ces essais multi-populations et multi-sites ont montré que, de façon générale, la population native d'un site-test présente moins de mortalités que les populations transférées (Culloty and Mulcahy, 2001; da Silva *et al.*, 2005). Pour le succès du programme de sélection, il semble donc que l'adaptation des huîtres au milieu environnemental local soit tout aussi importante que la capacité de survivre à la parasitose.

Ces mêmes auteurs invoquent également la possibilité d'existence de plusieurs types de *Bonamia*, avec différents degrés de virulence, présents sur les sites testés (Culloty and Mulcahy, 2007). Cette hypothèse rejoint l'observation que, chez *C. virginica* parasitée par *Perkinsus marinus*, les performances de survie dépendent de la durée d'exposition au parasite mais également de la virulence du parasite (Bushek and Allen, 1996). Cependant, chez *B. ostreae* aucune étude n'a encore été réalisée sur un éventuel différentiel de virulence entre les parasites de différentes régions.

Des études préliminaires portant sur la sélection de lignées, pour le caractère de la résistance à un pathogène, ont montré des résultats prometteurs chez plusieurs espèces d'huîtres dont *C. virginica* (Ford, 1988; Davis and Barber, 1999) et *C. gigas* (Beattie *et al.*, 1988). Chez *O. edulis*,

plusieurs programmes de sélection furent lancés pour lutter contre *B. ostreae*, à la fois sur la côte Californienne (Elston *et al.*, 1987), mais également en Europe et notamment en France (Martin *et al.*, 1992; Baud *et al.*, 1997; Naciri-Graven *et al.*, 1998) ainsi qu'en Irlande (Culloty *et al.*, 2001). L'exposition naturelle au parasite (*i.e.* sur le terrain) étant reconnue comme la meilleure méthode pour le développement d'un programme de sélection à grande échelle (Gaffney and Bushek, 1996), malgré les variations inhérentes aux conditions physico-chimiques du milieu naturel et les variations temporelles de pression de la parasitose, cette méthode fut privilégiée. De façon générale, les programmes de sélection de *O. edulis* ont permis une amélioration de la survie de l'hôte, ainsi que la diminution de l'infection et de la prévalence globale du parasite *B. ostreae*. Ces résultats préliminaires appuient ainsi la corrélation observée entre le taux d'infection et le taux de mortalités de la population hôte (Bédier *et al.*, 2001; Montes *et al.*, 2003).

#### I.4.1.2 Le programme français initié par Ifremer

##### I.4.1.2.1 Première partie (1985-1995)

Le programme français de sélection de lignées résistantes à la bonamiose a été instauré par Ifremer à partir de 1985. L'objectif était de prélever, dans une zone naturellement infectée par *B. ostreae*, des huîtres âgées de plus de 4 ans et donc supposées survivantes à la parasitose, puis de tester les performances de survie de leur descendance.

Deux lignées d'huîtres ont été produites en parallèle à partir de 1985 (lignée S85) et de 1989 (lignée S89), à partir d'huîtres en provenance de la Baie de Quiberon (Bretagne). Certaines huîtres provenant du milieu naturel, qui ont servi de géniteurs (génération  $G_0$ ) à la première ponte en masse (génération  $G_1$ ), ont été sur-infectées par inoculation de parasite purifié. Après 21 mois de grossissement, les performances de survie de la génération  $G_1$  de la lignée S89 ont ensuite été testées par trois méthodes, pendant 7 mois, et comparées aux performances de survie de naissain obtenu par captage naturel (Martin *et al.*, 1992). Les méthodes de test choisies reposent : 1- sur la mise en élevage en milieu naturel dans un secteur favorable au développement de *B. ostreae* ; 2- sur le maintien des huîtres en proximité d'huîtres fortement parasitées ; 3- sur l'inoculation de parasite purifié. Quel que fut le test, la génération  $G_1$  de la lignée S89 (S89- $G_1$ ) a montré une meilleure survie (72 à 94 %) que les huîtres témoins (48 à 66 %) (Martin *et al.*, 1992). Ces résultats ont permis de confirmer les résultats non publiés des tests effectués sur la descendance de la lignée S85 (S85- $G_1$ ), à savoir une augmentation de la survie (Naciri-Graven *et al.*, 1998) et une diminution de l'infection par le parasite (Martin *et al.*, 1992). Cette première étude a également permis de valider la méthode de sur-infection par inoculation de parasite purifié (Hervio *et al.*, 1995), en démontrant son efficacité pour accélérer la pression de sélection (Martin *et al.*, 1992). De plus, étant données les faibles mortalités qui ont eu lieu dans les jours suivant l'injection, les auteurs ont jugé cette méthode peu stressante pour les huîtres testées.

Les huîtres survivantes S85- $G_1$  et S89- $G_1$  ont ensuite été utilisées pour produire une seconde génération de sélection (génération  $G_2$ ). S85- $G_2$  et S89- $G_2$  ont, à leur tour, été testées sur le terrain

(Naciri-Graven *et al.*, 1998). Les individus survivants de la  $G_2$  (44 % de survie) ont ensuite servi à produire une nouvelle génération d'huîtres, par croisements bi-parentaux. Trois types de descendance  $G_3$  ont été produites :

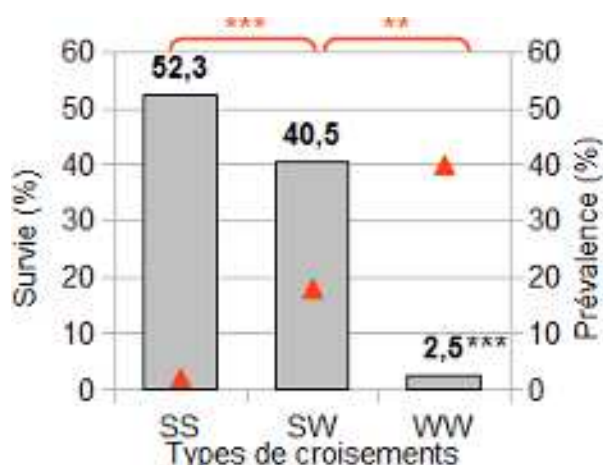
1- S85- $G_3$  obtenue à partir de S85- $G_2$  ; 2- une  $G_3$  dite « *back-cross* », obtenue par rétro-croisement entre S85- $G_2$  et une huître sauvage de même provenance ; 3- une  $G_3$  par croisement entre S85- $G_2$  et S89- $G_1$ . Toutes les  $G_3$  produites ainsi que S89- $G_2$  ont alors été testées sur le terrain entre 1993 et 1995 (Naciri-Graven *et al.*, 1998). Chacune des trois lignées  $G_3$  produites (S85- $G_3$ , S85- $G_2$  x S89- $G_1$ , *back-cross*) a présenté de meilleures performances de survie (facteur respectif de 4.38, 2.44 et 1.76) que la lignée sauvage utilisée comme témoin qui a subi les mêmes conditions expérimentales.

En parallèle, S89- $G_2$  a montré de moins bonnes performances de survie, laissant supposer un « déclin » dans la résistance. Naciri-Graven *et al.* (1998) émettent deux hypothèses pour expliquer ces plus faibles performances. Tout d'abord, la durée de l'expérience qui a duré moins longtemps que pour les  $G_3$ , avec un seul épisode d'infection pour S89- $G_2$  et son contrôle. Cet épisode n'aurait ainsi pas été suffisant pour permettre la détection de performances de survie différentes entre la lignée sélectionnée et la lignée témoin. L'autre hypothèse invoque une possible dépression de consanguinité ou une ségrégation d'allèles délétères par auto-stop génétique dus aux fortes pressions de sélection. C'est-à-dire qu'il s'agirait soit d'une diminution drastique de la diversité génétique par diminution de l'hétérozygotie, perte des allèles rares et augmentation du « fardeau génétique », soit de l'accumulation de mutations défavorables sur des gènes liés aux gènes ayant subi la pression de sélection. Des analyses ultérieures ont effectivement montré une forte dépression de consanguinité (Naciri-Graven *et al.*, 2000) liée au très faible nombre de géniteurs (de 3 à 10 individus) à l'origine de la lignée S89 (Launey *et al.*, 2001), même dans le cas présent d'une ponte en masse de plusieurs centaines d'individus. En effet, il a été montré par la suite que, même en présence d'un grand nombre d'huîtres sexuellement mûres et aptes à la reproduction, très peu d'huîtres sont véritablement impliquées dans la production de la descendance (Hedgecock *et al.*, 2007; Lallias *et al.*, 2010). La dépression de consanguinité est souvent invoquée chez les mollusques où le fardeau génétique semble très élevé (McGoldrick and Hedgecock, 1997; Launey *et al.*, 2001; Launey and Hedgecock, 2001). Ainsi, le mode de reproduction (ponte en masse) choisi au début du programme et les très fortes pressions de sélection appliquées aux générations produites auraient augmenté le « fardeau génétique » en éliminant progressivement la diversité génétique (Naciri-Graven *et al.*, 1998; Launey *et al.*, 2001).

#### I.4.1.2.2 Deuxième partie (1995-actuel)

Afin de rétablir un niveau de diversité génétique suffisant pour la suite du programme de sélection, de nouveaux croisements ont été réalisés à partir des individus survivants provenant de la première partie du programme de sélection. Les croisements sont désormais bi-parentaux, selon un schéma intra-familial (Bédier *et al.*, 2001). C'est-à-dire que chaque croisement met en jeu deux individus provenant de la même famille, ou lignée sélectionnée.

Ainsi, en 1995, le programme de sélection a basculé dans un contrôle du mode de production des nouvelles lignées. Les huîtres des familles S85- $G_2$  et S89- $G_1$ , testées sur le terrain dans le cadre du précédent programme de sélection et survivantes en 1995, ont été utilisées pour produire une nouvelle descendance. 35 familles ont ainsi été produites puis inoculées avec *B. ostreae* avant test multi-sites des performances de survie, pendant l'été 1997. En 1998, 5 familles d'huîtres survivantes ont été inter-croisées entre elles (type SS : croisement des lignées S85 et S89) et également rétro-croisées avec des huîtres sauvages (type SW : croisement entre les lignées sélectionnées et des huîtres sauvages). Les performances de survie de la descendance ont ensuite été testées sur une période de 3 ans, en milieu naturel. À l'issue des tests, il s'est avéré que la survie des familles sélectionnées (type SS ; 52,3 %) était significativement supérieure à celle des témoins d'écloserie non sélectionnés (type WW ; 2,5 %) mais pas significativement différente des familles rétro-croisées (type SW ; 40,5 %). Il s'est également avéré que la prévalence du parasite *B. ostreae* était significativement corrélée avec les performances de survie des différents types de croisements (**Figure 12** ; Bédier *et al.*, 2001). Cette corrélation inverse sera ultérieurement observée par (Montes *et al.*, 2003).



**Figure 12** – Performances de survie des lignées produites en 1998 dans le cadre du programme de sélection contre la bonamiose, à l'issue d'une expérience test de 3 ans (d'après Bédier *et al.*, 2001). SS : inter-croisement des familles sélectionnées des lignées S85 et S89 ; SW : rétro-croisement des familles sélectionnées (S85 ou S89) avec des huîtres sauvages ; WW : croisement d'huîtres sauvages en guise de témoins. Les triangles rouges indiquent la prévalence du parasite *B. ostreae*. \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\* :  $p < 0,005$ .

Les performances intermédiaires du croisement de type SW suggèrent que le caractère de résistance à la bonamiose est héritable et donc qu'il peut être transmis à la descendance. Ces résultats confirment l'intérêt de continuer le programme de sélection de lignées résistantes à *B. ostreae*, notamment en améliorant la compréhension de la composante génétique de la résistance.

À partir des années 2000, le programme de sélection mis en œuvre par Ifremer est rentré dans sa phase de transfert, avec des expérimentations à plus grande échelle en partenariat avec la profession (Lapègue *et al.*, 2004). Ainsi, de 2002 à 2004, le projet OFISTREA a eu pour objectifs de confirmer l'amélioration des performances de survie chez les familles sélectionnées en conditions d'exploitation commerciale, mais également d'évaluer la faisabilité technique de la production de



grandes quantités de naissain issu de familles sélectionnées, par les écloséries commerciales (Bédier *et al.*, 2005). En novembre 2002, 50 000 jeunes huîtres sélectionnées et 250 000 huîtres issues de captage naturel ont été semées ou déposées en filet dans la baie de Quiberon. En décembre 2004, les huîtres sélectionnées ont montré des performances de survie améliorées par rapport au naissain issu de captage naturel (73,4 % contre 33,6 % pour les huîtres semées et 89,2 % contre 39,8 % pour les huîtres élevées en filets); et ceci, sans différence significative de la masse des huîtres (Bédier *et al.*, 2005). La sélection pour le caractère de la survie à la bonamiose semble donc prometteur, et ne se fait pas au détriment de la croissance des huîtres sélectionnées. Ce projet expérimental, à l'échelle d'une exploitation commerciale, a permis de montrer la faisabilité du transfert du programme de sélection vers la profession ostréicole, malgré la difficulté à réaliser l'élevage des larves (1 % de la ponte survit jusqu'au stade naissain) et malgré la persistance de la dépression de consanguinité.

#### I.4.2 Recherche de régions du génome associées à cette résistance

Tout programme de sélection vise à favoriser un caractère visible qualitatif (présence / absence) ou quantitatif (caractère continu) que l'on appelle phénotype. La variance phénotypique d'un caractère d'intérêt, ici le caractère de la résistance à la bonamiose, se décompose en une variance génétique et une variance environnementale. Afin de s'affranchir de la part environnementale (conditions physico-chimiques du milieu d'élevage, nutrition, effets maternels lors de l'incubation des larves, etc.) pouvant expliquer l'éventuelle variation du caractère étudié, chaque étude expérimentale est effectuée sur du matériel biologique de même provenance. D'autre part, afin de ségréger les allèles chez la descendance et d'identifier l'origine de ces allèles, une généalogie sur trois générations ( $F_0$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ) est souvent utilisée.

En effet, le croisement d'individus issus de la même famille (croisement intra-familial) permet la ségrégation, chez la descendance, des différents allèles liés au caractère d'intérêt. Chaque allèle parental étant transmis différenciellement à la descendance par recombinaison des allèles lors de la méiose, chaque descendant possède donc une combinaison unique d'allèles. Le croisement de deux individus  $F_0$  ayant des phénotypes contrastés pour le caractère d'intérêt permet, après croisement de deux descendants  $F_1$ , de ségréger les phénotypes et les allèles chez la descendance  $F_2$ , afin d'identifier des associations.

La composante génétique de la variance phénotypique peut être décomposée en trois composantes :

- la variance génétique additive : il s'agit de la variance génétique héritable et transmise à la descendance ;
- la variance génétique de dominance : elle correspond à l'interaction entre les allèles de tous les loci. Elle est détruite au cours de la méiose, lorsque de nouvelles combinaisons d'allèles sont créées. Elle n'est donc pas héritable ;
- la variance génétique d'épistasie : elle correspond aux interactions des allèles entre tous les loci ; pour les mêmes raisons, elle n'est pas héritable.

Dans un programme de sélection, on s'intéresse à la transmission entre deux parents et leur

descendance de la part héritable du caractère, c'est-à-dire que l'on s'intéresse à la composante génétique additive. La recherche de régions du génome liées à l'expression d'un caractère phénotypique d'intérêt, qu'il soit qualitatif (ex. : survie) ou quantitatif (ex. : charge en parasites, taille, poids), constitue ce que l'on appelle la « recherche de QTL » (*Quantitative Trait Loci*). La détection de QTL consiste à rechercher, chez la descendance, une association statistique entre la distribution des performances phénotypiques et chacun des allèles aux marqueurs moléculaires génotypés. Pour identifier les régions QTL, les marqueurs moléculaires doivent être au préalable positionnés sur une carte génétique de liaison propre au modèle biologique étudié, c'est-à-dire propre à chaque croisement.

Une région QTL correspond à un segment de chromosome qui est délimité par deux marqueurs moléculaires localisant sa position au sein du génome (Erickson *et al.*, 2004). Une carte génétique de référence n'étant pas toujours disponible pour les espèces étudiées, les intervalles entre les marqueurs moléculaires génotypés et cartographiés sont souvent grands et englobent généralement plusieurs dizaines voire centaines de gènes. Dans les études de cartographie génétique, il s'avère donc crucial de diminuer ces intervalles afin d'affiner la localisation des régions QTL.

D'autre part, un caractère phénotypique présente généralement une architecture génétique complexe. En effet, un phénotype est souvent à déterminisme multigénique, c'est-à-dire qu'il est exprimé et régulé par une multitude de gènes, situés sur un même ou sur plusieurs segments chromosomiques. Cependant, la détection de ces régions ne présume en rien des interactions entre les gènes. Ceux-ci peuvent agir pour le même effet (contribution additive) ou pour un effet contraire (épistasie), en parallèle ou en cascade.

Dans le cas de la bonamiose de l'huître plate européenne, l'existence d'un lien entre le génotype des individus et leur capacité à survivre à l'infection a été démontré (Lallias *et al.*, 2009a). Deux individus présentant des performances contrastées pour le phénotype de survie (« résistance ») vis-à-vis d'une infection à la bonamiose ont été croisés. Leur descendants ont ensuite été croisés entre-eux, deux à deux. La troisième génération ainsi produite a été testée lors d'une expérience d'infection avec le parasite *Bonamia ostreae*. Le génotype des individus morts au cours de l'expérience et qui ont été détectés infectés par *B. ostreae* a été comparé, par une analyse de variance, au génotype des individus survivants à l'expérience, et pour lesquels le parasite n'a pas été détecté. Les marqueurs moléculaires génotypés ont ensuite été cartographiés afin de localiser les régions QTL sur la carte génétique de liaison. Cette étude a permis l'identification de cinq zones du génome liées à la survie ou à la mortalité de l'hôte dans le contexte de la bonamiose (Lallias *et al.*, 2009a).

## I.5 Objectifs du projet de thèse

Depuis 2003, l’huître plate européenne *Ostrea edulis* (L.), espèce patrimoniale des côtes européennes, est classée dans la catégorie des « espèces menacées et/ou en déclin » par la Commission OSPAR (2008). Pourtant, *O. edulis* a longtemps été la seule espèce d’huître exploitée en Europe. La caractérisation génétique des ressources naturelles de l’espèce et la compréhension de l’épizootie de la bonamiose, qui la touche depuis une trentaine d’années, ne sont pas seulement des enjeux environnementaux mais sont également des enjeux économiques majeurs pour une profession malmenée par la succession des épisodes infectieux. En effet, après le déclin de l’huître plate européenne et la disparition de l’huître creuse portugaise des côtes françaises, c’est au tour de l’huître creuse japonaise de subir les affres épizootiques. Depuis l’émergence de la bonamiose, une soixantaine d’études ont été menées à travers l’Europe afin de mieux comprendre l’étiologie de cette épizootie et d’essayer de relancer la culture de *O. edulis*.

Malgré la sur-exploitation et les épizooties successives, *O. edulis* semble se maintenir sur nos côtes de façon localisée, laissant penser à des phénomènes d’adaptation locale de l’huître vis-à-vis de son environnement biotique (proies, prédateurs, parasites) et abiotique (substrat, salinité, température, etc.). La confirmation du caractère héritable de la résistance à la mortalité induite par *B. ostreae* et le fait que ce caractère soit compatible avec de bonnes performances de croissance ont relancé la dynamique des programmes de sélection et l’espoir de la profession ostréicole. Dans ce contexte, l’enjeu scientifique demeure l’amélioration de la compréhension de la composante génétique de la résistance au parasite, ainsi que la caractérisation génétique des ressources naturelles de l’espèce à l’échelle de son aire de répartition.

Le **but** de cette thèse a consisté d’une part à **développer de nouveaux marqueurs moléculaires** permettant de **mieux caractériser**, à la fois, la **résistance de l’huître plate à la bonamiose** et la **ressource génétique de ses populations naturelles**, et d’autre part à **tester** ces nouveaux outils pour **améliorer la compréhension de cette résistance**, afin d’envisager une sélection assistée par marqueurs et de contribuer à une production durable de l’huître plate.

Pour atteindre ce but, plusieurs objectifs ont été définis. Tout d’abord, il s’agissait de mettre au point de nouveaux outils moléculaires afin d’augmenter la disponibilité en marqueurs génétiques pour cette espèce non modèle. Il s’agissait ensuite d’utiliser ces nouveaux marqueurs pour produire plusieurs cartes génétiques de liaison, indispensables pour la suite du travail de thèse, mais également pour augmenter la couverture et améliorer la résolution de la carte génétique de l’espèce. En parallèle, il s’agissait de produire une nouvelle génération d’huîtres afin de tester l’information apportée par ces nouveaux marqueurs ; ce nouveau matériel biologique étant ensuite soumis à plusieurs expérimentations d’infection à *B. ostreae*.

Trois expérimentations ont ainsi été réalisées afin de caractériser les phénotypes de réponse à la bonamiose à trois niveaux d’étude : 1- à l’échelle inter-familiale (comparaison des QTL détectés, entre plusieurs familles) ; 2- à l’échelle intra-familiale (analyse entre les individus d’une même

famille) ; 3- à l'échelle inter-populationnelle (comparaison entre plusieurs populations naturelles).

1- À l'échelle inter-familiale, il s'agissait de caractériser les différents génotypes des individus produits à l'écloserie, et soumis aux infections expérimentales, afin d'identifier de nouvelles régions du génome intervenant dans la résistance (survie, statut non-infecté) ou la sensibilité (mort, statut infecté) à la maladie parasitaire (approche QTL). Il s'agissait également de comparer les différentes régions détectées chez chacune des familles afin d'estimer la diversité et l'héritabilité de ces régions QTL.

2- À l'échelle intra-familiale, il s'agissait, pour une même famille ségrégeante, de relier des variations du génome avec l'activité fonctionnelle de réponse à une infection à *B. ostreae* (approche eQTL). Pour cela, les données génétiques ont été combinées avec une caractérisation des réponses immunitaires de l'huître. Deux types de réponses immunitaires ont été étudiées : l'activité des hémocytes, par la technique de cytométrie en flux, et l'expression de certains gènes d'intérêt, par la méthode de PCR en temps réel.

3- À l'échelle inter-populationnelle, il s'agissait d'identifier un éventuel différentiel de réponses fonctionnelles en fonction de l'origine géographique de plusieurs populations naturelles. Pour cela, des huîtres d'origines génétiques et écologiques distinctes ont été expérimentalement soumises à une infection à *B. ostreae*. Malheureusement, cette expérience qui était prévue pour une durée d'un mois, a dû être interrompue en raison de fortes mortalités des huîtres testées avec la solution parasitaire. Néanmoins, des profils de mortalités différents ont été observés entre les différentes populations testées. Malgré le fait que cette expérience ne soit pas totalement fructueuse, les résultats observés seront discutés dans cette étude préliminaire de la diversité de réponses à un même épisode infectieux.

D'autre part, dans le contexte de sélection de populations naturelles moins sensibles aux épi-zooties, et afin de mieux comprendre la co-évolution entre l'hôte (*Ostrea edulis*) et son pathogène (*Bonamia ostreae*), il s'avère important de connaître la variabilité génétique des populations naturelles de l'hôte. Ainsi, une étude a également été menée pour effectuer une nouvelle estimation de la diversité génétique de *O. edulis* à l'échelle de son aire de répartition, mais également pour estimer le degré de fragmentation de ses populations naturelles.

Pour répondre à ces objectifs, ce travail de thèse se structure en cinq parties :

**PARTIE 2 - Choix et acquisition du matériel d'étude**

**PARTIE 3 - Cartographie génétique comparée**

**PARTIE 4 - Caractérisation phénotypique et génétique en réponse à une infection expérimentale avec le parasite *B. ostreae***

**PARTIE 5 - Diversité et structure génétique**

**PARTIE 6 - Conclusion générale**

## Deuxième partie

# Choix et acquisition du matériel d'étude

## II.1 Production d'une nouvelle génération d'huîtres

Au cours de ma thèse, une nouvelle génération d'huîtres a été produite chez 22 familles issues de lignées sélectionnées. L'objectif de cette nouvelle génération était de produire de nouveaux assemblages génétiques pour tester la relation entre génotypes et phénotypes chez l'huître plate européenne (cf. Partie IV).

### II.1.1 Plan de croisement

Afin de disposer d'un panel important d'allèles chez la descendance et ainsi d'optimiser la détection de liaisons alléliques (on parle de déséquilibre de liaison), les individus parentaux ont été choisis parmi les descendants survivants d'un croisement entre deux individus présentant des performances contrastées pour le caractère d'intérêt. Un pedigree sur trois générations a ainsi permis de ségréger les allèles chez la descendance : 2 individus grand-parents ( $F_0$ ), 2 individus parents (génération  $F_1$ ) et  $n$  descendants (génération  $F_2$ ). Pour obtenir des performances contrastées, les individus grand-parents provenaient, pour l'un, d'une lignée sélectionnée ou d'une lignée consanguine ayant présentée de bonnes performances de survie vis à vis de la bonamiose et, pour l'autre, d'un individu sauvage.

Étant donné la nécessité de connaître le génotype des individus parents et grand-parents pour comprendre la transmission de la part héritable du caractère d'intérêt, ces familles ont été produites à partir de croisements bi-parentaux selon un schéma de production précis [Figure 13].

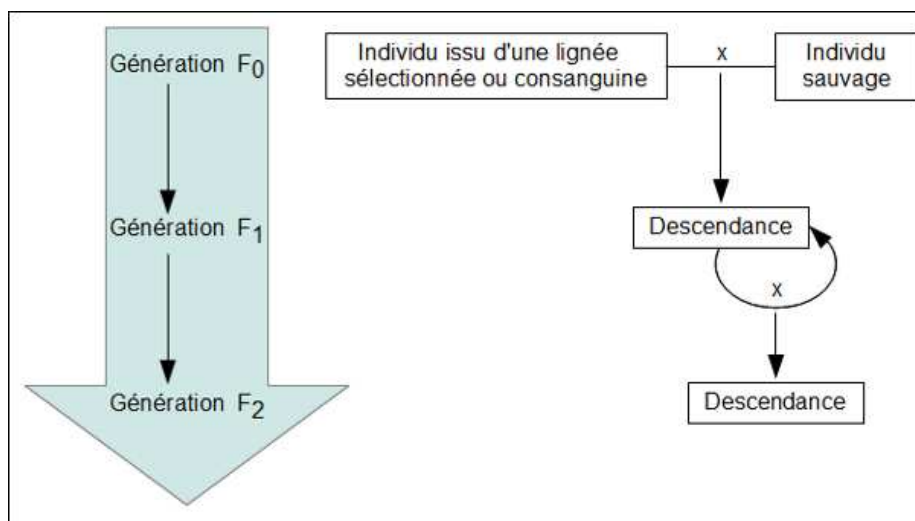


Figure 13 – Schéma bi-parental de production des générations  $F_1$  et  $F_2$ .

## II.1.2 Choix des familles ségrégeantes à produire

Les individus grand-parents choisis pour la production des familles ségrégeantes provenaient soit d'une lignée sélectionnée, soit d'une lignée consanguine, soit du milieu naturel. Le nom des familles produites se compose de quatre éléments : le nom de l'espèce (OE), suivi de la génération ou de la nature du croisement ( $F_1$  ou  $F_2$ , WL), puis des deux derniers chiffres de l'année de production, et enfin du numéro du lot produit. Par exemple, OE. $F_1$ .04.10 signifie qu'il s'agit d'une famille  $F_1$  d'*O. edulis* produite en 2004 et correspondant au lot numéro 10.

En 2004, une génération  $F_1$  a été produite à partir du croisement d'individus issus de la génération 1998 de la deuxième partie du programme de sélection [cf. **Partie I.4.1.2.2**] avec des huîtres sauvages prélevées dans la Baie de Quiberon. À l'issue de ce croisement, 7 familles ont été produites et ont, par la suite, été utilisées pour différentes expérimentations (Lallias, 2007). Des individus de seulement cinq de ces familles (OE. $F_1$ .04.10; OE. $F_1$ .04.15; OE. $F_1$ .04.25; OE. $F_1$ .04.29; OE. $F_1$ .04.59) ont survécu jusqu'à la fin de l'année 2008 et ont été choisis pour produire la future génération  $F_2$ .

En parallèle au programme de sélection, des lignées consanguines ont été produites à partir de 1995 selon un schéma bi-parental de croisements de pleins-frères. Ces lignées ont été initiées à partir du croisement d'un individu issu de la lignée sélectionnée S89 [cf. **Partie I.4.1.2.1**] et d'un individu sauvage. Au bout de 5 générations, une des familles ainsi produite, la famille Oe 1-5-2-3-1, a montré une absence de mortalités à *B. ostreae* lors de test expérimentaux en milieu naturel (Lallias, 2007). En 2003, cette famille, renommée OELL2000-set2, a été utilisée pour produire une nouvelle génération par croisement avec des huîtres sauvages (huîtres « W »). Quatre familles F1-L (« L » pour lignée) ont ainsi été produites : OE.WL.03.21; OE.WL.03.23; OE.WL.03.27; OE.WL.03.30.

## II.1.3 Zootechnie

Étant données les particularités sexuelles de l'huître plate européenne [cf. **Partie I.1.1.3**], il est impossible de distinguer les individus mâles des individus femelles. Dans le cadre de la production bi-parentale d'une nouvelle génération d'huîtres, l'unique alternative est de former des couples d'huîtres dans de petits aquariums en espérant obtenir le maximum de couples mâle-femelle au moment de l'émission des gamètes. De la même façon, il n'y a aucun contrôle possible du moment de la ponte (Gérard, 1998).

### II.1.3.1 Maturation des futurs géniteurs

Les huîtres adultes de génération  $F_1$  appartenant aux 9 lignées choisies [Table 2] ont été mises en maturation à partir de mi-décembre 2008. Pour cela, de mi-décembre à mi-mars la température de l'eau a été progressivement augmentée de 4 °C à 19 °C. Les huîtres ont été nourries au moyen de quatre algues phytoplanctoniques : *Isochrysis affinis galbana* souche Haiti (2,5 %), *Tetraselmis*

*suecica* (2,5 %), *Chaetoceros gracilis* (2,5 %), *Skeletonema costatum* (92,5 %).

**Table 2** – Récapitulatif des effectifs des futurs géniteurs disponibles dans les familles  $F_1$  pour la production de la nouvelle génération  $F_2$ .

Famille (génération $F_1$ )	Parent 1 ( $F_0$ )	Parent 2 ( $F_0$ )	Nombre d'animaux $F_1$ disponibles	Nombre d'animaux $F_1$ vivants après maturation
OE.WL.03.21	L002-48	W8	2	néant
OE.WL.03.23	L002-53	W102	8	6
OE.WL.03.27	L001-71	W91	2	néant
OE.WL.03.30	L002-55	W120	6	6
OE.F <sub>1</sub> .04.10	703-29	W31	39	32
OE.F <sub>1</sub> .04.15	504-21	W23	13	9
OE.F <sub>1</sub> .04.25	207-16	W24	7	6
OE.F <sub>1</sub> .04.29	703-6	W26	23	15
OE.F <sub>1</sub> .04.59	703-27	W41	29	29

Fin février, le statut de maturation des individus a été estimé grâce au sacrifice de quelques huîtres provenant d'une part de deux autres lignées d'huîtres rentrées à l'écloserie en même temps que les 9 familles du plan de croisement et, d'autre part, d'huîtres sauvages ayant passé l'hiver à l'intérieur de l'écloserie. Tous ces individus présentaient le même stade gamétique (peu de gamètes) et étaient encore trop maigres pour pouvoir réaliser le croisement des animaux  $F_1$ .

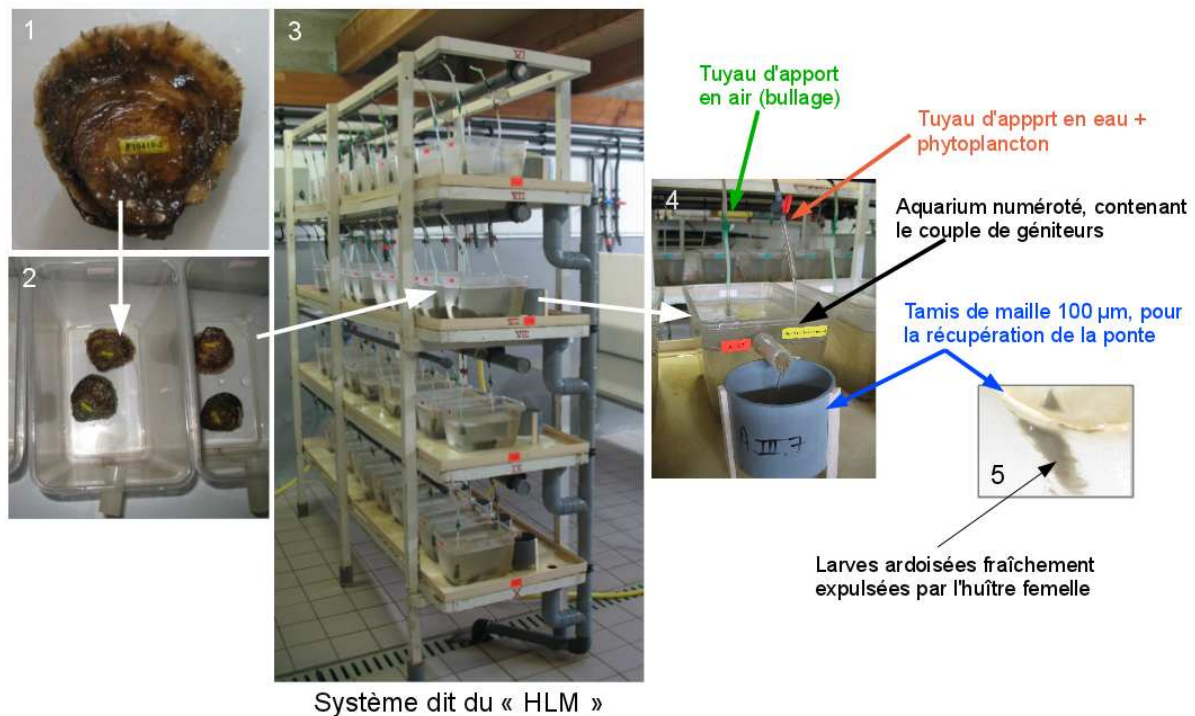
### II.1.3.2 Formation des couples

Dans le cadre du présent plan de croisement, afin de maximiser les chances de ponte pour une famille  $F_1$  donnée, un maximum de couples a été formé. À cette fin, à la mi-mars, chaque huître du plan de croisement a été identifiée individuellement par un numéro (ex. : OE.WL.03.23-1 ; OE.WL.03.23-2 ; etc.). Fin mars 2009, 36 couples d'huîtres ont été formés [Table 3] dans de petits aquariums et disposés sur un « HLM » permettant un approvisionnement égal en eau et en phytoplancton [Figure 14]. Les individus numérotés, et non encore positionnés dans les aquariums, ont servi de remplaçants pour pouvoir reformer des couples dans le cas d'éventuelles mortalités d'individus parents, avant la ponte. Dans ce cas, l'individu survivant dans l'aquarium était laissé seul pendant une dizaine de jours dans l'expectative d'une éventuelle ponte qui serait le fruit de la fécondation des gamètes de l'individu survivant et du parent mort. En l'absence de ponte, un individu remplaçant de la même famille  $F_1$  était ajouté dans l'aquarium.

**Table 3** – Plan de croisement des 9 familles. Les géniteurs  $F_1$  sont appelés «  $F_1$  Parent 1 » et «  $F_1$  Parent 2 ». \* signale un individu remplaçant; † signale un individu mort et qui n'a pu être remplacé. **XX** indique le numéro de la ponte. **XX / XX** indique qu'il y a eu deux pontes pour le même couple parental; **XX / XX / XX** indique qu'il y a eu 3 pontes pour le même couple parental.

Famille de la $F_1$	$F_1$ Parent 1	$F_1$ Parent 2	N° de l'élevage OE.F2.09.XX
OE.WL.03.23	OE.WL.03.23-3	OE.WL.03.23-5	OE.F <sub>2</sub> .09.28 / 30
OE.WL.03.23	OE.WL.03.23-1	OE.WL.03.23-4	OE.F <sub>2</sub> .09.09
OE.WL.03.30	OE.WL.03.30-1	OE.WL.03.30-6	OE.F <sub>2</sub> .09.67
OE.WL.03.30	OE.WL.03.30-3	OE.WL.03.30-4	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-6	OE.F <sub>1</sub> .04.10-12	OE.F <sub>2</sub> .09.10
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-7	OE.F <sub>1</sub> .04.10-15	OE.F <sub>2</sub> .09.04
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-1	OE.F <sub>1</sub> .04.10-5	OE.F <sub>2</sub> .09.11
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-2	OE.F <sub>1</sub> .04.10-8	OE.F <sub>2</sub> .09.58
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-4*	OE.F <sub>2</sub> .09.13
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-3	OE.F <sub>1</sub> .04.10-14	OE.F <sub>2</sub> .09.37
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-9	OE.F <sub>1</sub> .04.10-13	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-17	OE.F <sub>1</sub> .04.10-18	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>1</sub> .04.10-22*	OE.F <sub>1</sub> .04.10-20	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.15	OE.F <sub>1</sub> .04.15-1†	OE.F <sub>1</sub> .04.15-3†	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.15	OE.F <sub>1</sub> .04.15-4	OE.F <sub>1</sub> .04.15-7	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.15	OE.F <sub>1</sub> .04.15-2	OE.F <sub>1</sub> .04.15-8	OE.F <sub>2</sub> .09.02
OE.F <sub>1</sub> .04.15	OE.F <sub>1</sub> .04.15-5	OE.F <sub>1</sub> .04.15-9†	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.25	OE.F <sub>1</sub> .04.25-1	OE.F <sub>1</sub> .04.25-5†	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.25	OE.F <sub>1</sub> .04.25-2	OE.F <sub>1</sub> .04.25-3	OE.F <sub>2</sub> .09.46
OE.F <sub>1</sub> .04.25	OE.F <sub>1</sub> .04.25-6	OE.F <sub>1</sub> .04.25-4	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.29	OE.F <sub>1</sub> .04.29-2	OE.F <sub>1</sub> .04.29-10	OE.F <sub>2</sub> .09.40 / 66
OE.F <sub>1</sub> .04.29	OE.F <sub>1</sub> .04.29-3	OE.F <sub>1</sub> .04.29-11	OE.F <sub>2</sub> .09.12
OE.F <sub>1</sub> .04.29	OE.F <sub>1</sub> .04.29-6	OE.F <sub>1</sub> .04.29-12	OE.F <sub>2</sub> .09.03
OE.F <sub>1</sub> .04.29	OE.F <sub>1</sub> .04.29-7	OE.F <sub>1</sub> .04.29-9	OE.F <sub>2</sub> .09.08
OE.F <sub>1</sub> .04.29	OE.F <sub>1</sub> .04.29-13	OE.F <sub>1</sub> .04.29-14	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.29	OE.F <sub>1</sub> .04.29-8*	OE.F <sub>1</sub> .04.29-4†	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-3	OE.F <sub>1</sub> .04.59-5	OE.F <sub>2</sub> .09.38
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-6	OE.F <sub>1</sub> .04.59-7	OE.F <sub>2</sub> .09.36
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-8	OE.F <sub>1</sub> .04.59-9	OE.F <sub>2</sub> .09.32 / 69
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-10	OE.F <sub>1</sub> .04.59-15*	OE.F <sub>2</sub> .09.20
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-13	OE.F <sub>1</sub> .04.59-14	OE.F <sub>2</sub> .09.33 / 61 / 70
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-1	OE.F <sub>1</sub> .04.59-12	OE.F <sub>2</sub> .09.25
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-2	OE.F <sub>1</sub> .04.59-11	OE.F <sub>2</sub> .09.07
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-19	OE.F <sub>1</sub> .04.59-20	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-17	OE.F <sub>1</sub> .04.59-18	<i>Pas de ponte</i>
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>1</sub> .04.59-21	OE.F <sub>1</sub> .04.59-22	<i>Pas de ponte</i>





**Figure 14** – Dispositif dit du « HLM », pour l'obtention de pontes bi-parentales chez l'huître plate. 1- Chaque huître plate de génération  $F_1$  faisant partie du plan de croisement a été numérotée individuellement. 2- Des couples d'huîtres ont été aléatoirement formés dans des aquariums. 3- Tous les aquariums ont été disposés sur un « HLM ». 4- Tous les aquariums ont bénéficié d'un approvisionnement égal en air, en eau et en phytoplancton. Un tamis a été disposé à la sortie de chacun des aquariums afin de récupérer les pontes. 5- Larves ardoisées fraîchement expulsées par l'huître femelle, visibles au fond d'un tamis. Photos : E. Harrang.

Au total, entre le 23 avril et le 27 juillet 2009, 27 pontes ont été récupérées à la sortie des aquariums au moyen de tamis de 100  $\mu\text{m}$  [Figure 14]. Ces pontes concernaient 22 couples différents sur les 36 couples formés (61 %), dont 3 couples qui ont pondu 2 fois et 1 couple qui a pondu 3 fois [Table 3]. Les couples d'individus ayant produit une descendance ont été sacrifiés et un prélèvement de branchies a été effectué et stocké dans de l'éthanol à 70 % afin d'avoir accès ultérieurement au génotype des parents.

### II.1.3.3 Élevage et fixation des larves

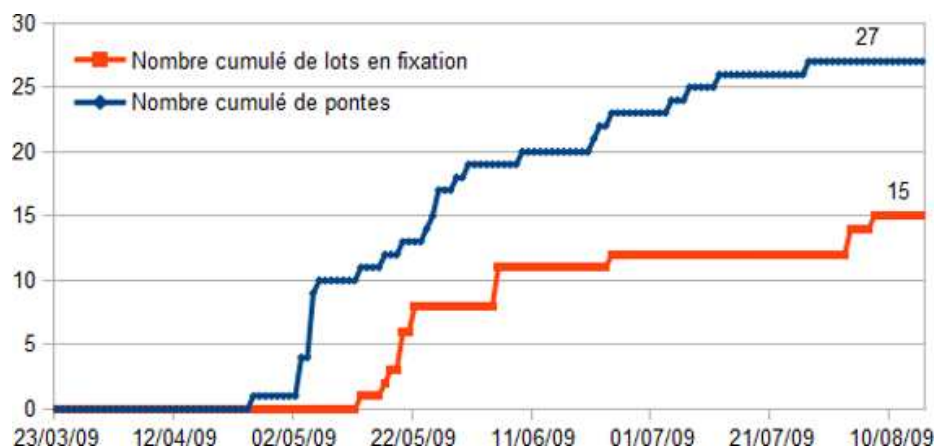
Les pontes récupérées ont ensuite été transvasées dans des scobalites [Figure 15] de 30 L placés dans la salle d'élevage larvaire afin d'être maintenues dans des conditions optimales de températures (20-25 °C). Un bullage constant a permis de maintenir les larves en suspension. Le développement des jeunes larves a été suivi tous les deux jours. À chaque suivi, les scobalites ont été nettoyés et les effectifs des larves ont été dénombrés. Afin d'optimiser la croissance des jeunes larves, les effectifs ont été réduits par tamisages successifs (mailles de 100  $\mu\text{m}$  à 220  $\mu\text{m}$ ) afin de ne conserver que les têtes et corps de lot (les individus ayant la plus grande croissance). Un approvisionnement en phytoplancton a été assuré chaque jour à partir des cultures de microalgues (*Isochrysis affinis galbana* souche Tahiti, *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica*) produites à l'écloserie. La température de l'eau ainsi que la salinité ont été mesurées de façon ponctuelle, sans détection d'une variation importante. Étant donné la lourdeur du protocole, les autres paramètres

environnementaux (pH, oxygène, etc.) n'ont pu être mesurés.



**Figure 15** – Scobalites utilisés en élevage larvaire pour le développement des larves, de la ponte jusqu'au stade de larves pédivéligères. Photo : E. Harrang.

Malgré l'utilisation d'antibiotiques (Érythromycine, Flumisol;  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) lors de l'élevage larvaire, les larves ont eu des difficultés à se développer correctement et beaucoup de lots ont dû être dédoublés pour essayer de les sauver. Au final, parmi les 27 pontes ayant entamé un élevage larvaire, seules 15 d'entre elles ont vu leurs larves se développer jusqu'à la phase de fixation [Figure 16].



**Figure 16** – Distribution des pontes (en bleu) et des lots de larves fixées (en rouge) entre le jour de formation des couples (23 mars 2009) et la fin de la période de fixation de la nouvelle génération d'huîtres produites (mi-août 2009).

Les lots de larves pédivéligères ont ensuite été transférés sur tamis (maille de  $150 \mu\text{m}$ ) où l'on a déposé de la microbrisure (coquille d'huître concassée) en guise de substrat pour la fixation des larves et permettre la métamorphose. Cette phase de fixation s'est déroulée dans des raceways disposés en salle quarantaine [Figure 17].



**Figure 17** – Dispositif de fixation des jeunes larves dans des tamis recouverts de microbrisure et disposés dans des raceways. Photos : E. Harrang.

Au fur et à mesure de la croissance du naissain (larves fixées), des tamisages successifs (maille de 150  $\mu$ m à 1 mm) ont permis de séparer les têtes de lot et les queues de lot afin d'optimiser la croissance de toutes les jeunes huîtres.

L'eau qui approvisionnait les élevages provenait directement du milieu extérieur, après décantation des vases. Aussi, des développements d'algues ou d'invertébrés marins se sont produits dans les bacs. Comme les larves en fixation sont extrêmement fragiles et de très petite taille, il n'a pas été possible de nettoyer les tamis. Ainsi, comme la période de fixation des larves coïncide avec le développement d'autres organismes marins tels que les ascidies (*Ascidacea*), un grand nombre de tamis a été envahi et les larves fixées n'ont pas pu survivre. Le dédoublement des lots en fixation a néanmoins permis de sauver 9 lots différents d'huîtres de la génération  $F_2$ , d'effectifs assez disparates [Table 4].

**Table 4** – Inventaire des lots d'huîtres de génération  $F_2$  survivants au-delà de l'étape de fixation des larves. Les proportions entre parenthèses indiquent les pourcentages de survie.

Famille de la $F_1$	Numéro de l'élevage de la $F_2$	Effectifs de la ponte	Effectifs de larves pédivéligères	Nombre de jours d'élevage jusqu'à la fixation	Effectifs survivants au-delà de la fixation
OE.F <sub>1</sub> .04.15	OE.F <sub>2</sub> .09.02	350000	70 000 (20 %)	18	5 (0,001 %)
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>2</sub> .09.04	1030000	15 000 (1,46 %)	17	591 (0,06 %)
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>2</sub> .09.07	660000	30 000 (4,55 %)	15	93 (0,01 %)
OE.WL.03.23	OE.F <sub>2</sub> .09.09	880000	15 000 (1,70 %)	20	1265 (0,14 %)
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>2</sub> .09.10	355000	2 500 (0,70 %)	15	37 (0,01 %)
OE.F <sub>1</sub> .04.10	OE.F <sub>2</sub> .09.13	460000	20 000 (4,35 %)	17	264 (0,06 %)
OE.F <sub>1</sub> .04.59	OE.F <sub>2</sub> .09.36	80000	15 000 (18,75 %)	13	66 (0,08 %)
OE.F <sub>1</sub> .04.25	OE.F <sub>2</sub> .09.46	350000	8 000 (2,29 %)	15	28 (0,01 %)
OE.WL.03.30	OE.F <sub>2</sub> .09.67	230000	2 000 (0,87 %)	29	333 (0,14 %)

Quand la taille des huîtres fut suffisante, les lots d'huîtres produits ont ensuite été placés dans des poches afin d'optimiser la croissance du naissain [Figure 18]. Les huîtres de génération  $F_2$  ont ensuite été stabulées dans l'écloserie jusqu'à leur utilisation.



**Figure 18** – Stabulation des individus produits dans des poches ostréicoles. Photo : E. Harrang.

#### II.1.4 Choix des familles ségrégeantes pour les expérimentations

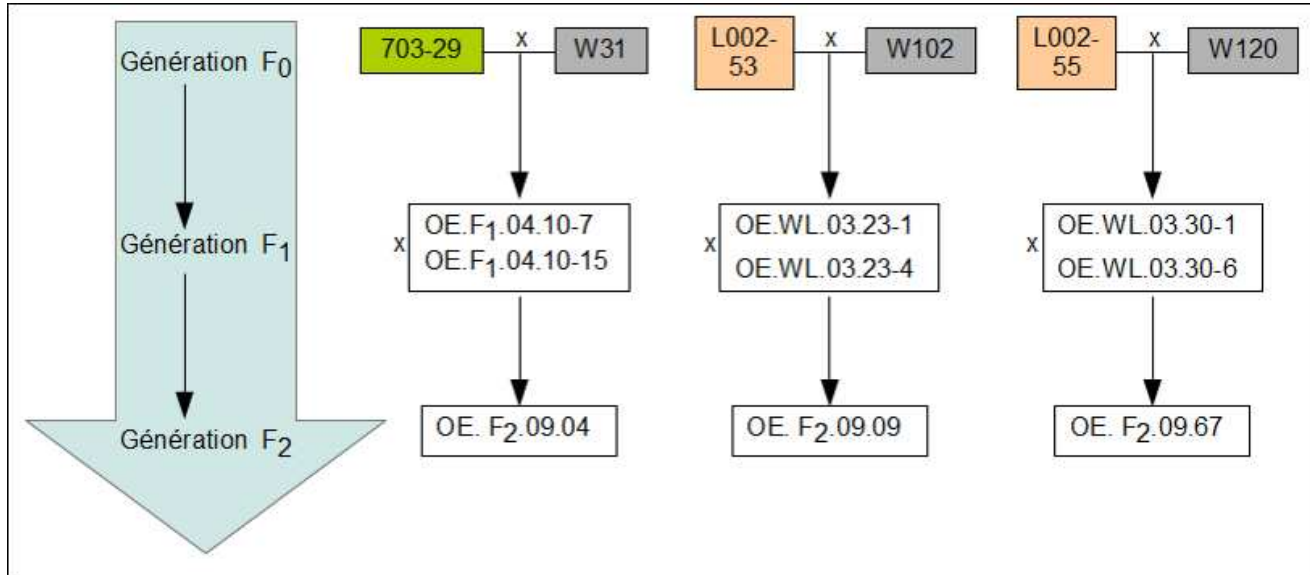
Étant donné les problèmes de mortalités rencontrés au cours de la production de la nouvelle génération, le nombre d'individus survivants par famille [Table 4] a été le principal facteur limitant le choix des familles ségrégeantes pour les expérimentations. En effet, il s'agissait d'avoir suffisamment d'individus d'une même famille pour réaliser plusieurs expérimentations [cf. Partie IV].

À l'issue de la fixation, 4 familles  $F_2$  présentaient des effectifs dépassant les 250 individus ; dont deux d'entre-elles sont descendantes de la même famille  $F_1$  (OE. $F_1$ .04.10). Les deux autres familles  $F_2$  sont descendantes de la famille OE.WL.03.23 pour la première et de la famille OE.WL.03.30 pour la seconde.

Les familles parentales OE. $F_1$ .04.10 et OE.WL.03.23 ont par le passé déjà produit des descendants qui ont été utilisés lors d'expérimentations d'infection à *Bonamia ostreae* (Lallias, 2007). Les descendants produits en 2009 (lots OE. $F_2$ .09.04, OE. $F_2$ .09.10, OE. $F_2$ .09.13 et OE. $F_2$ .09.09) de ces 2 familles sont donc des individus cousins de ceux utilisés auparavant. Ce fait ajoute une nouvelle dimension aux expérimentations lancées à partir des individus  $F_2$  en permettant une comparaison directe de la position des QTL.

Après vérification de la bi-parentalité des familles produites, le choix des familles ségrégeantes pour les deux expérimentations d'infection par *B. ostreae* [cf. Parties IV.2 et IV.3] s'est naturellement porté sur les descendants des familles OE. $F_1$ .04.10 qui appartiennent au lot de plus grands effectifs (OE. $F_2$ .09.04), ainsi que sur les descendants des familles OE.WL.03.23 (OE. $F_2$ .09.09) et OE.WL.03.30 (OE. $F_2$ .09.67). La dernière famille correspond à une nouvelle famille qui n'a pas encore été testée vis-à-vis de *B. ostreae*.

Les généalogies des trois familles ségrégeantes choisies pour les expérimentations sont récapitulées dans la Figure 19. Dans la suite du manuscrit, ces familles sont désignées par l'année de production et le numéro de lot, soit : 09.04, 09.09 et 09.67.



**Figure 19** – Généalogie sur trois générations ( $F_0$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ) des trois familles ségrégeantes choisies pour les expérimentations d'infection par *B. ostreae*. Les individus grand-parents proviennent soit d'une lignée sélectionnée (en vert), soit d'une lignée consanguine (en orange) ayant présentée de bonnes performances de survie vis à vis de la bonamiose, soit d'un individu sauvage (en gris). La génération  $F_1$  est produite par croisement bi-parental intra-familial de deux individus pleins-frères.

## II.2 Choix des populations naturelles d'étude

Les huitres plates utilisées pour les études présentées en **Partie III**, **Partie IV** et **Partie V** ont été choisies de façon à maximiser la couverture de l'aire de distribution de l'huitre plate européenne, tout en diminuant l'effort d'échantillonnage à fournir sur de nouveaux sites. En effet, les bancs naturels étant relativement fragmentés et peu garnis, il est parfois difficile d'identifier les gisements (en plongée sous marine), ou d'atteindre un effectif de 50 individus sur un unique site. Pour ces raisons (comm. pers. Cyrille François), certains sites supplémentaires qui devaient faire partie du jeu de données (Graveline, Dieppe, Leucate, etc.) n'ont pu être échantillonnés et utilisés pour les présents travaux.

Les huitres échantillonnées proviennent majoritairement de gisements naturels. Dans le cadre des espèces d'intérêt aquacole, il est particulièrement délicat d'identifier de tels sites. Une des raisons majeures réside dans la proximité géographique souvent très importante avec les exploitations ostréicoles. Par conséquent, les transferts d'animaux, entre bassins aquacoles et zones de captage du naissain, sont responsables d'une homogénéisation des géotypes entre les différents sites d'élevage et les bancs naturels situés à proximité. D'autre part, l'huitre plate européenne a subi la sur-pêche ainsi que plusieurs épisodes infectieux successifs qui ont déclenché d'importants programmes de repeuplement à travers l'Europe [cf. **Partie I.1.2**]. Des huitres de provenances diverses ont alors été introduites dans de nouvelles régions, ou transplantées sur des bancs particulièrement affaiblis, ce qui a provoqué des mélanges génétiques entre les différentes populations, notamment sur la côte Atlantique (Magennis *et al.*, 1983; Johannesson *et al.*, 1989).

Pour l'huitre plate européenne, l'activité aquacole française est actuellement restreinte à la Région Bretagne, la Région Normandie, ainsi qu'à l'étang de Thau (Languedoc-Roussillon), et l'étang de Diane (Corse).

Les échantillons utilisés pour ce travail de thèse proviennent en grande partie des collections de tissus (branchies, manteau, muscle) acquis dans le cadre de collaborations avec des partenaires français ou étrangers. Ces échantillons sont également issus d'animaux vivants apportés au LGP dans le cadre du suivi sanitaire des bancs naturels français (réseau REPAMO, coordination IFREMER La Tremblade).

Des animaux vivants en provenance de Quiberon, de Corse et du Danemark ont également été utilisés pour les expérimentations présentées en **Partie IV** du présent manuscrit.

La localisation géographique, les effectifs totaux utilisés dans le cadre de ce travail de thèse, la date d'échantillonnage, le(s) partenaire(s) ayant fourni les échantillons ainsi que l'utilisation qui a été faite de ces échantillons, sont présentés dans la **Table 5**.

**Table 5** – Caractéristiques des différents lots d'huîtres utilisés en **Partie III**, **Partie IV** et **Partie V** du présent manuscrit. \* : abréviation utilisée en **Partie V**.

Origine géographique	Localisation	Abréviation	Coordonnées GPS		Effectifs	Date d'échantillonnage	Fournisseur	Utilisation
<i>Ostrea edulis</i>		OE						
Mer du Nord								
Norvège	Oslofjorden	No	59°27'32.42"N	010°32'37.16"E	48	-	Collection du LGP	Partie 5
Danemark	Esbjerg	Dk	55°28'51.37"N	008°22'46.98"E	450	Avril 2010	Lasse Fast Jensen	Partie 4, Partie 5
Danemark	Nissum Bredning		56°36'54.99"N	8°23'59.68"E	4	2005	Morten S. Porisin	Partie 3
Pays-Bas	Lake Grevelingen	PB	51°42'23.17"N	004°2'12.06"E	50	Juin 2005	Pauline Kamermans	Partie 3, Partie 5
Océan Atlantique								
France	La Rance	LR	48°32'47.40"N	001°58'08.77"O	50	Mars 2009	Daniel Gerla, Gilbert Moullard, dans le cadre du suivi REPAMO	Partie 3, Partie 5
Angleterre	River Fal, South Cornwall	GB	50°12'1.14"N	005°2'14.96"O	23	2005	Ian Laing	Partie 5
	River Fowey, South Cornwall		50°19'59.11"N	004°38'4.69"O	32	2005	Ian Laing	Partie 5
France	Quiberon, banc de Penthièvre		47°32'37.79"N	3°8'22.80"O	350	Octobre 2009	Aimé Langlade	Partie 4
France	Quiberon, banc de Carnac		47°33'55.96"N	3°50'21"O	1060	Décembre 2009	Rémi Le Port, Aimé Langlade	Partie 4
France	Quiberon		-	-	3	-	Collection du LGP	Partie 3
France	Larmor Baden, Morbihan	LB	47°34'53.07"N	002°54'0.19"O	50	Avril 2009	Ets Pottier & Soulard, Aimé Langlade, Edouard Bedier, dans le cadre du suivi REPAMO	Partie 5
France	Île d'Aix	Aix	46°01'04.14"N	001°09'17.93"O	50	Avril 2009	Stephane Robert, Olivier Courtois, JM Chabirand, Alain Fillon, dans le cadre du suivi REPAMO	Partie 5
Portugal	Ria Formosa	Po	36°58'38.81"N	007°52'20.12"O	30	-	Delphine Lallias, Alexandra Leitao	Partie 5
Mer Méditerranée								
Espagne	Murcia, Mar Menor	Es	37°43'55.14"N	000°47'55.54"O	45	Juillet 1999	Collection du LGP	Partie 3, Partie 5
France	Fos-sur-Mer	FsM	43°25'10.01"N	004°56'25.75"E	50	Mai 2009	Christophe Ravel, dans le cadre du suivi REPAMO	Partie 3, Partie 5
France	Étang de Diane, Corse	Co	42° 7'56.09"N	009°32'16.38"E	48	2008	Collection du LGP	Partie 5
France	Corse		-	-	300	Mai 2010	Ifremer Corse	Partie 4
Italie	Pellestrina, lagune de Venise		45°14'26.85"N	12°17'35.77"E	4	Novembre 1996	Nicoletta Riccardi	Partie 3
Italie	Lagune de Venise	It	45°28'9.83"N	012°19'46.65"E	48	Janvier 2009	Luca Bargelloni, Pierre Boudry	Partie 3, Partie 5
Turquie	-	Tq	36°46'5.02"N	030°41'7.77"E	30	2005	Aynur Lok	Partie 5
Grèce	Maliakos Bay	Gr	40°36'21.17"N	022°54'19.63"E	48	Novembre 2005	John Theodorou	Partie 3, Partie 5
Mer Noire								
Ukraine	Donouzlav	Uk	45°20'23.99"N	033°0'30.70"E	22	Juin 1999	Collection du LGP	Partie 3, Partie 5
	Sebastopol		44°36'52.73"N	033°21'21.85"E	36	Juin 1999	Collection du LGP	Partie 5
<i>Ostrea angasi</i>								
	Batemans Bay	OA	35°43'35.61"S	150°13'34.60"E	30	2005	David Hurwood	Partie 5
	Port Philip Bay		38°42'6.07"S	144°52'50.55"E	20	2005	David Hurwood	Partie 5
	Tasmania		41°52'8.23"S	148°18'1.95"E	16	2005	David Hurwood	Partie 5
<i>Ostrea chilensis</i>								
	-	OC	-	-	50	-	Collection du LGP	Partie 5

## Troisième partie

# Cartographie génétique comparée

### III.1 Introduction

Dans l'objectif de cartographier des régions QTL liées à un phénotype d'intérêt, il est fondamental de disposer d'une carte génétique de référence, propre à l'espèce étudiée. Cependant, dans le cas d'une espèce non modèle, où un projet de séquençage complet du génome n'est pas encore envisagé, une carte de référence reste souvent inaccessible et la disponibilité en marqueurs moléculaires est relativement limitée. Ceci est notamment le cas de la plupart des bivalves marins et *a fortiori* de l'huître plate européenne. L'alternative réside alors dans la construction d'une carte génétique de liaison ayant la plus grande densité possible en marqueurs moléculaires afin d'optimiser la couverture du génome, et ce, pour chaque croisement à étudier (Vignal *et al.*, 2002).

Chez *Ostrea edulis*, une première carte de liaison a été initiée à partir de 14 marqueurs microsatellites et allozymiques (Launey, 1998). Malgré le faible nombre de marqueurs typés, cette première cartographie a néanmoins permis d'identifier sept groupes de liaison parmi les dix groupes attendus chez cette espèce ( $N = 10$ , Thiriot-Quévrevre and Ayraud, 1982). Par la suite, plusieurs cartes de liaison regroupant davantage de marqueurs moléculaires (Lallias, 2007; Lallias *et al.*, 2009a) ont permis d'augmenter la couverture du génome, et d'identifier un nombre de groupes de liaison correspondant au nombre haploïde de chromosomes de *O. edulis*. Ces cartes, construites à partir du typage de 98 à 127 marqueurs AFLP et microsatellites ont par la suite été utilisées pour une première cartographie de régions QTL liées à la résistance ou à la sensibilité à la bonamiose (Lallias *et al.*, 2009a). Cependant, malgré leur grand nombre et la relative facilité d'obtention des AFLP, leur typage est techniquement peu répétable. Il est ainsi difficile de comparer les études se basant sur des cartes construites à partir de ces marqueurs. Les AFLP sont aussi des marqueurs anonymes et aléatoires à travers le génome. Ils restent ainsi très difficilement identifiables, et les cartes de liaison ainsi construites se révèlent difficilement utilisables pour une approche plus précise de la localisation des régions QTL, c'est-à-dire l'identification des gènes. De plus, malgré une relative bonne couverture du génome (de 69,4 % à 84,1 %) grâce à la combinaison des AFLP et microsatellites, des intervalles de grandes tailles ( $> 20$  cM) persistent au sein de plusieurs groupes de liaison. Pour combler ces lacunes et améliorer la densité en marqueurs ainsi que la précision de la carte génétique, il s'est donc avéré nécessaire de cartographier de nouveaux marqueurs moléculaires.

Comme chez beaucoup d'espèces non modèles, très peu de marqueurs moléculaires sont disponibles chez l'huître plate européenne. Au début de ce travail de thèse, on pouvait ainsi dénombrer chez *O. edulis* :

- 51 marqueurs microsatellites (Naciri *et al.*, 1995; Launey, 1998; Morgan *et al.*, 2000; Morgan and Rogers, 2001; Sobolewska *et al.*, 2001; Launey *et al.*, 2002; Lallias *et al.*, 2009b) ;



- 18 allozymes (Saavedra *et al.*, 1993; Launey, 1998);
- 246 AFLP (Lallias, 2007);

Étant donnée la faible disponibilité en marqueurs moléculaires et la nécessité d'augmenter la résolution de la carte génétique de liaison, notre choix s'est porté sur l'étude du polymorphisme le plus répandu à travers les génomes, mais également le plus facile à génotyper. Il s'agit du polymorphisme d'une seule paire de bases. Ce type de polymorphisme, nommé SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), correspond au changement d'un nucléotide (A, T, C ou G) entre deux individus. Il existe trois catégories de SNP : les transitions (C/T ou A/G), les transversions (C/G, A/T, C/A ou T/G) et les courtes insertions/délétions (indels). Ce polymorphisme généralement bi-allélique est moins informatif que le polymorphisme multi-allélique (ex. : les microsatellites). Cet inconvénient est cependant compensé par sa relative abondance qui permet d'obtenir une forte densité de marqueurs (Duran *et al.*, 2009).

En effet, avec 1 SNP toutes les 40-60 paires de bases (pdb) chez *Crassostrea gigas* (Curole and Hedgecock, 2005; Sauvage *et al.*, 2007) ou toutes les 20 pdb chez *C. virginica* (Zhang and Guo, 2010), ces marqueurs sont particulièrement répandus chez les huîtres comparativement à la plupart des espèces où ils sont distribués toutes les 200 - 500 pdb (Morin *et al.*, 2004). Avec la caractéristique de co-dominance, ils se présentent comme d'excellents marqueurs candidats pour augmenter la densité en marqueurs de la cartographie génétique et ainsi pouvoir cartographier les QTL dans des intervalles suffisamment restreints pour rendre possible l'identification d'un gène (Shifman *et al.*, 2006).

Plusieurs méthodes existent pour identifier un polymorphisme de type SNP. Chez les espèces pour lesquelles des banques de données de séquences sont disponibles, la méthode de détection dite *in silico* est souvent privilégiée. Cette méthode consiste à identifier des SNP en alignant, de façon automatisée, des séquences publiées sur les bases de données publiques (pour une revue, voir Duran *et al.*, 2009) ou des séquences EST (*Expressed Sequence Tag*) issues d'études du transcriptome (ex. : Marth *et al.*, 1999; Quilang *et al.*, 2007).

Malgré l'intérêt aquacole de *O. edulis*, encore peu de séquences sont disponibles pour cette espèce dans les banques de données publiques telle que GenBank<sup>®</sup> (Benson *et al.*, 2012), comparé à d'autres espèces, notamment de mollusques bivalves. Ainsi, pour ce qui est des séquences EST disponibles chez quelques espèces de bivalves d'intérêt commercial, on pouvait par exemple trouver fin 2010 sur NCBI :

- 12 549 EST pour les *Veneridae*, dont 4 645 pour la palourde européenne *Ruditapes decussatus* ;
- 67 762 EST pour les *Mytilidae*, dont 5 084 pour la moule commune *Mytilus edulis* et 19 711 pour la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* ;
- 221 226 EST pour les *Ostreidae*, dont 14 857 pour l'huître creuse américaine *Crassostrea virginica*, 206 630 pour l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*, alors que seuls 2 EST

étaient publiés pour l'huître plate européenne *Ostrea edulis*.

Chez certaines de ces espèces, des banques de données publiques ont également été constituées (ex. : Gueguen *et al.*, 2003; Tanguy *et al.*, 2008) (pour une revue voir Saavedra and Bachère, 2006), et ont notamment permis d'identifier plusieurs centaines de nouveaux marqueurs moléculaires utilisables pour la cartographie génétique de liaison (Tanguy *et al.*, 2008).

Chez *Ostrea edulis*, plusieurs études faisant état de bibliothèques de séquences ont été publiées récemment. Parmi ces études, trois bibliothèques de séquences EST (330 contigs ou singletons, Morga *et al.* (2011a); 460 contigs ou singletons, Martín-Gómez *et al.* (2012); 909 contigs ou singletons, Morga *et al.* (2012)) ont été obtenues par Hybridation Soustractive et Suppressive (SSH), dans un contexte de recherche de gènes différentiellement exprimés entre des tissus sains et des tissus parasités par *Bonamia ostreae*. Ces séquences, potentiellement utilisables pour le développement de marqueurs moléculaires, n'ont cependant pas toutes été publiées sur GenBank®. Ainsi, malgré l'existence de ces trois banques de séquences et la disponibilité de la séquence complète du génome mitochondrial de *O. edulis* (16 320 pdb, Danic-Tchaleu *et al.*, 2011), aucun marqueur moléculaire n'a encore été développé de façon *in silico* sur ces ressources potentielles.

Lorsque la méthode *in silico* ne peut être appliquée faute de séquences disponibles pour un alignement, comme ce fut le cas chez *O. edulis* au début de mon travail de thèse, l'alternative réside dans le séquençage direct de portions d'ADN. Cette méthode est également privilégiée lors d'un développement de marqueurs sur des gènes candidats potentiellement impliqués dans l'expression d'un phénotype d'intérêt (par ex. : la survie), notamment pour la recherche ultérieure de QTL (par ex. : Sauvage *et al.*, 2007). Dans ce cas, les gènes ou portions de gènes choisis pour le séquençage proviennent souvent de bibliothèques de séquences EST issues d'une analyse différentielle des gènes exprimés (transcriptome) entre deux phénotypes (par ex. : statut sain / parasité). Ces marqueurs dits de type I, du fait de leur développement sur des gènes de fonction(s) connue(s), sont particulièrement importants dans les études de cartographie génétique de liaison et de cartographie QTL (Liu and Cordes, 2004). En effet, étant donné qu'ils sont souvent partagés entre les espèces, ils permettent d'effectuer des comparaisons avec des cartes génétiques plus complètes dans le but d'identifier spécifiquement et éventuellement de cloner un gène candidat compris dans un intervalle de marqueurs (Liu and Cordes, 2004). Par opposition, un marqueur positionné sur un gène anonyme, ou identifié de façon aléatoire dans le génome, est considéré comme un marqueur de type II. Cette catégorie de marqueurs moins informatifs regroupe les microsatellites, les AFLP et les SNP issus des Nouvelles Technologies de Séquençage à Haut-Débit (NGS).

Les SNP développés et utilisés dans le cadre de la présente étude ont été obtenus de deux façons différentes. Une première partie de ces SNP a été développée au laboratoire par séquençage direct de portions de gènes candidats potentiellement impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la bonamiose, provenant de deux bibliothèques de séquences EST (Morga *et al.*, 2011a, 2012). La deuxième partie des SNP a été obtenue, dans le cadre d'une collaboration avec un des partenaires du projet PopPhyl (*Population Phylogenomics*; <http://162.38.181.25/PopPhyl/>), par séquençage

NGS à partir de deux nouvelles technologies de séquençage : la Technologie Roche 454, et la Technologie Solexa/Illumina.

Suivant le contexte de l'étude et le type de séquences analysées (domaines conservés, génome nucléaire ou mitochondrial, régions codantes ou non codantes, gène candidat avec ou sans connaissance de la fonction du gène, etc.), un SNP peut avoir différentes significations. De la même façon, l'information peut être différente suivant le matériel biologique choisi : par exemple, s'il s'agit d'individus provenant d'une même famille (croisement contrôlé), de différentes populations naturelles de la même espèce, ou même de différentes espèces. Dans chacun des cas, l'étude de tels marqueurs permet une estimation du polymorphisme à plusieurs échelles d'étude : la variation génétique inter-individuelle, la diversité des populations ou celle des espèces.

Dans ce contexte, parmi tous les SNP ainsi développés, une portion d'entre eux a ensuite été choisie pour construire les cartes génétiques de liaison des familles  $F_2$  à cartographier [cf. **Partie III.3**] mais également pour la recherche de régions QTL liées à la résistance ou à la sensibilité à la bonamiose [cf. **Partie IV.2**], ou liées à l'activité immunitaire de réponse à une telle infection [cf. **Partie IV.3**].

Par ailleurs, ces marqueurs sont également très utiles pour l'étude des populations naturelles ainsi qu'en génomique comparative (Liu and Cordes, 2004). Ils ont ainsi également été utilisés pour estimer la diversité génétique d'*Ostrea edulis* [cf. **Partie V.2**], pour caractériser la structure de ses populations naturelles à l'échelle de son aire de répartition, mais également pour rechercher des traces de la sélection naturelle [cf. **Partie V.3**].

La présente partie de mes travaux, se compose tout d'abord d'une présentation de la méthodologie déployée pour l'obtention des nouveaux marqueurs moléculaires [**Partie III.2**], puis de leur utilisation pour la construction d'une carte génétique de liaison pour trois familles ségrégeantes différentes [**Partie III.3**].

## III.2 Développement de nouveaux outils moléculaire, les marqueurs SNP

### III.2.1 Les SNP *in vitro*

Afin d'optimiser la détection de régions QTL liées à la résistance ou à la sensibilité à la bonamiose, des SNP ont été développés spécifiquement sur des portions de gènes candidats potentiellement impliqués dans l'interaction entre *O. edulis* et son parasite *B. ostreae*. Ces SNP, développés au sein du laboratoire, sont nommés SNP *in vitro*.

#### III.2.1.1 Matériels et méthodes

##### III.2.1.1.1 Choix des séquences

Les portions de gènes, utilisées comme matrices pour le développement des SNP *in vitro*, sont des séquences EST obtenues chez *O. edulis* par Hybridation Soustractive et Suppressive (SSH), par Morga et collaborateurs (Morga *et al.*, 2011a, 2012). La technique SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*, en anglais; Diatchenko *et al.*, 1996) est une méthode de criblage différentiel qui a pour objectif de supprimer les ARN messagers (ARNm) communs à deux échantillons afin de créer des sous-populations simplifiées ne contenant que les ARNm exprimés différemment entre les échantillons de départ. Cette méthode met en œuvre une étape de normalisation entre les séquences abondantes et celles au contraire très rares, qui a pour but de favoriser la détection des ARNm peu abondants (Grenier, 2003). Les ARNm sont ensuite rétro-transcrits pour former des fragments d'ADN complémentaire (ADNc). Chaque ADNc constitue ce que l'on appelle un marqueur de séquence exprimée (ou EST, *Expressed Sequence Tag*, en anglais). Les bibliothèques ainsi obtenues sont ensuite blastées sur des banques de données moléculaires afin d'identifier les gènes auxquels les EST correspondent. Après vérification d'une homologie de la séquence chez des organismes supérieurs, ces gènes sont ensuite considérés comme autant de gènes candidats, potentiellement impliqués dans le phénotype d'intérêt étudié, de l'espèce considérée.

Parmi les EST retenus pour la recherche de sites polymorphes, 44 séquences proviennent de la bibliothèque obtenue entre des hémocytes infectés *in vitro* par *Bonamia ostreae* et des hémocytes sains (Morga *et al.*, 2011a), et 77 séquences proviennent de la bibliothèque obtenue entre des hémocytes d'huîtres résistantes et des hémocytes d'huîtres sauvages toutes deux infectées *in vitro* avec *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2012). Ces EST ont été choisis pour leur taille (> 120 nt), la qualité de la séquence (peu de bases indéterminées) ainsi que leur homologie chez des organismes supérieurs (ni algues, ni virus, ni bactéries) (comm. pers. Benjamin Morga).

Parmi ces 121 EST, un total de 114 séquences différentes (5,8 % de redondance) ont été identifiées, correspondant à 97 gènes de fonction connue (85 %) et 7 gènes de fonction inconnue (15 %). Ces 97 gènes se regroupent en sept grandes catégories selon leur(s) fonction(s) biologique(s) première(s) potentielle(s) (comm. pers. Benjamin Morga). En effet, étant donné la complexité des mécanismes de l'immunité, moins de 10 % des EST identifiés sont directement impliqués dans ces mécanismes

(Morga *et al.*, 2011a, 2012). Les six autres catégories fonctionnelles regroupent les EST ayant une homologie avec des gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification, dans la chaîne respiratoire, le cytosquelette, le cycle cellulaire, le métabolisme cellulaire, mais également des protéines ribosomales.

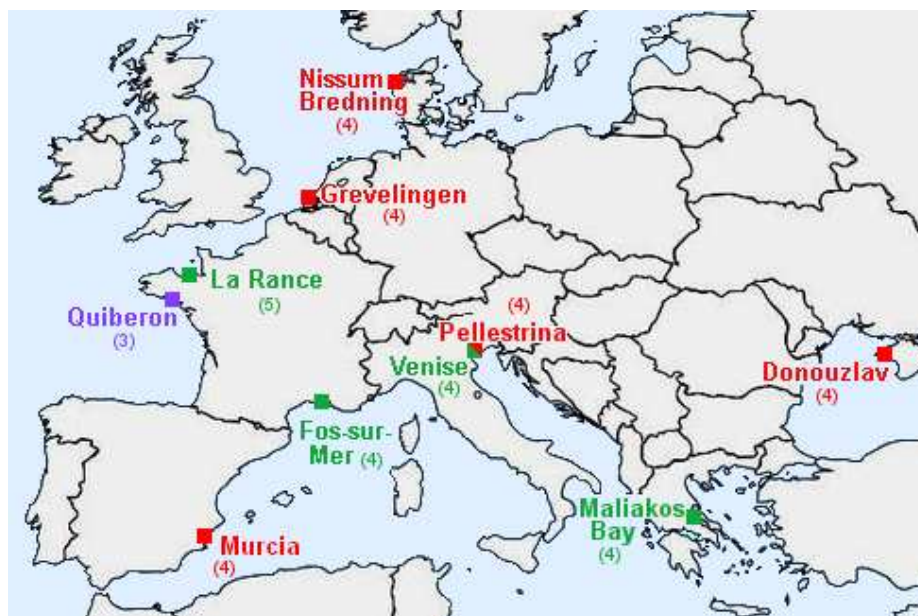
Quelle que soit la catégorie fonctionnelle de ces 114 EST, ils correspondent tous à des gènes candidats potentiellement impliqués dans la réponse de *O. edulis* à une infection à *B. ostreae*, et ont donc été choisis pour le développement de SNP.

### III.2.1.1.2 Choix du matériel biologique

Les SNP à développer devaient servir de marqueurs moléculaires à la fois pour la recherche de régions QTL chez plusieurs familles ségrégeantes [cf. **Partie IV.2 et IV.3**], mais également pour l'étude du polymorphisme des populations naturelles de *O. edulis* à l'échelle de son aire de répartition [cf. **Partie V**]. Pour avoir les moyens de répondre à ces deux objectifs différents, il était nécessaire de minimiser le biais de représentation des positions variables (*ascertainment bias*, Fisher, 1934; Nielsen, 2004). Ce biais consiste à choisir ou à exclure préférentiellement certains types de SNP ou d'individus à séquencer et ainsi de fausser en amont l'interprétation des résultats des analyses. Pour minimiser ce biais et favoriser la représentation des SNP dans les deux analyses (Rosenblum and Novembre, 2007; Garvin *et al.*, 2010), des huîtres provenant de plusieurs zones géographiques connues pour être génétiquement structurées chez *O. edulis* Launey2002 [**Figure 20**], ainsi que les deux individus  $F_0$  (individus Grand-parents : 703-29, L002-53, L002-55, W31, W102, W120) des trois familles ségrégeantes étudiées pour la recherche de QTL et/ou eQTL, ont été retenus pour le séquençage.

Pour réduire le coût et la charge du travail de séquençage, trois individus de la population de Quiberon ont été utilisés pour optimiser les conditions de PCR de chaque séquence à analyser. Une fois ces conditions définies, 4 individus provenant des populations du Danemark (Nissum Bredning), des Pays-Bas (Grevelingen), d'Espagne (Murcia), d'Italie (Pellestrina, dans la lagune de Venise) et d'Ukraine (Donouzlav) ont été séquencés. Il s'est vite avéré que, malgré une apparente qualité acceptable des ADN extraits, les résultats de séquençage n'étaient pas satisfaisants et ne permettaient pas d'identifier des séquences propres (*i.e.* superposition de pics de fluorescence) et *a fortiori* des SNP. Malgré une deuxième extraction des ADN, et des tests effectués sur d'autres individus de ces populations, les résultats de séquençage se sont avérés de même qualité. Les échantillons de tissus de ces 5 populations, échantillonnées de 1996 à 2005 et conservés dans de l'éthanol 70° ont probablement été dégradés au cours des manipulations successives puisqu'ils ont déjà fait l'objet de plusieurs analyses (par ex. : Launey *et al.*, 2002; Diaz-Almela *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, les 5 populations ont alors été remplacées par 4 nouvelles populations : 2 populations de France (La Rance et Fos-sur-Mer), une nouvelle population d'Italie (Venise) et une population de Grèce (Maliakos Bay).



**Figure 20** – Sites de provenance des huîtres utilisées pour le développement des marqueurs SNP *in vitro* par séquençage direct : Nissum Bredning (Danemark), Grevelingen (Pays-Bas), La Rance et Quiberon (France), Murcia (Espagne), Fos-sur-Mer (France), Pellestrina et Venise (Italie), Maliakos Bay (Grèce), Donouzlav (Ukraine). Les effectifs d’huîtres testées sont indiqués entre parenthèses. **Quiberon** : population utilisée pour la mise au point des conditions de PCR ; **sites en rouge** : populations abandonnées car n’ayant pas donné de résultats satisfaisants en séquençage ; **sites en vert** : populations utilisées en remplacement des 5 populations abandonnées.

### III.2.1.1.3 Extraction des ADN des populations naturelles

Suivant la disponibilité en tissus, l’extraction a été réalisée à partir d’un échantillon de 20 mg de tissu branchial, de manteau ou de muscle. L’ADN a été extrait suivant le protocole QIAamp<sup>®</sup> DNA mini-kit (Qiagen). À l’issue de l’extraction, l’ADN a été élué dans 100  $\mu\text{L}$  d’eau Milli-Q<sup>®</sup>.

La concentration en ADN a ensuite été mesurée à 260 nm et 280 nm au moyen d’un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Le rapport des valeurs d’absorbance 260/280 nm a permis d’estimer la pureté de l’extrait. Un ratio compris entre 1,6 et 1,8 dénote un extrait d’ADN de bonne qualité, c’est-à-dire sans contamination par des protéines ou par les produits utilisés pour l’extraction. La qualité des ADN a également été vérifiée par électrophorèse sur un gel d’agarose 2 %.

Les ADN extraits ont ensuite été dilués à  $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  pour le séquençage.

### III.2.1.1.4 Amplification totale d’ADN génomique

Les 6 individus  $F_0$  utilisés pour le développement des SNP ont été sacrifiés en 2006. Comme aucun échantillon de tissu ne subsiste de ces individus, les analyses ont été effectuées à partir des ADN extraits et conservés à  $-80^\circ\text{C}$ .

Cependant, étant donné le faible volume (quelques  $\mu\text{L}$ ) et la faible concentration disponible de ces ADN ( $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), il a été nécessaire d’amplifier la totalité de l’ADN génomique de ces individus avec le Kit Illustrat<sup>™</sup> amplification d’ADN génomique GenomiPhi<sup>™</sup> V2 (GE Healthcare), pour

avoir assez de matériel pour effectuer les analyses. L'amplification a été réalisée par incubation à 30 °C, pendant 2 h, d'un mélange réactionnel composé de 10 ng d'ADN, de deux tampons de réaction et d'une enzyme. L'enzyme a ensuite été inactivée par incubation à 65 °C pendant 10 min.

À l'issue de l'amplification, une concentration en ADN de l'ordre de 670 à 1440 ng.µL<sup>-1</sup> a été mesurée, pour un volume disponible de 20 µL. La qualité des ADN amplifiés a été vérifiée par le rapport des valeurs d'absorbance 260/280 nm.

Les ADN amplifiés ont ensuite été dilués à 20 ng.µL<sup>-1</sup> pour le séquençage.

### III.2.1.1.5 Dessin des amorces, amplification et séquençage

Pour chacune des 114 séquences EST, un couple d'amorces de 18 à 25 pdb a été dessiné avec le logiciel Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000). Les amorces ont été définies pour une même température optimale d'amplification (T<sub>m</sub>) comprise entre 58 °C et 60 °C, et de façon à minimiser le risque d'auto-complémentarité et de non-spécificité. Elles ont également été choisies de façon à maximiser la longueur attendue des amplicons. En l'absence d'intron, la longueur attendue des fragments variait de 160 pdb à 660 pdb suivant les EST.

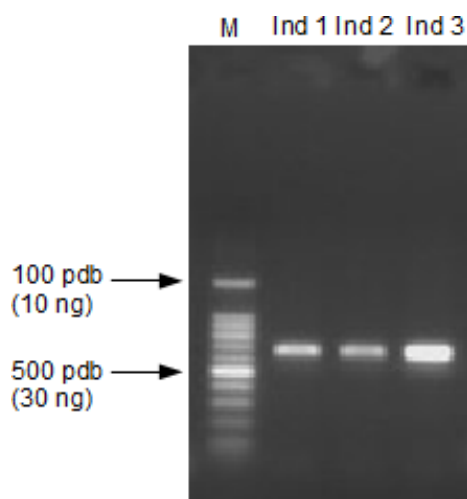
Une première réaction de PCR de type « Touchdown » a été testée afin d'augmenter la probabilité d'amplifier les fragments. La particularité de cette PCR réside dans l'enchaînement de plusieurs cycles d'amplification à des températures d'hybridation différentes. La gamme utilisée couvre des T<sub>m</sub> allant de 65 °C à 54 °C par paliers décroissants de 1 °C tous les 2 cycles. À l'issue de la PCR, les couples d'amorces n'ayant produit aucun amplicon ont été éliminés et un nouveau couple a alors été défini pour les EST concernés. En cas de profil multi-bandes, une PCR à température fixe a alors été testée. Si le test n'était pas concluant à 58 °C ou 60 °C, ce qui correspond à la T<sub>m</sub> optimale pour la plupart des couples d'amorces, d'autres T<sub>m</sub> ont été testées : 54 °C, 56 °C, 62 °C, 64 °C. Des gammes de concentrations en amorces et/ou en Chlorure de Magnésium ont également été testées. Malgré les différentes gammes testées, les couples d'amorces présentant un profil multi-bandes persistant ont été écartés de l'analyse.

Pour chaque PCR (Touchdown ou température fixe), la réaction de PCR a été préparée simultanément pour plusieurs couples d'amorces, dans une microplaque de 96 puits disposée dans un Thermocycleur ABI 2720 (Applied Biosystems). Pour chaque réaction, le mélange de réactifs contenait 40 ng d'ADN, 1 x de Tampon, MgCl<sub>2</sub> (2 mM), dNTP (0,2 mM, Eurogentec), chaque amorce du couple (0,4 µM), 1 U de GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polymérase (Promega), de l'eau Milli-Q<sup>®</sup> (q.s.p 25 µL).

Le profil thermique de la PCR de type TouchDown comprenait : 1 étape de dénaturation de 5 min à 94 °C, suivie de 12 segments à températures d'hybridation décroissantes (de 65 °C à 54 °C par paliers progressifs de 1 °C) constitués chacun de 2 cycles identiques de 3 étapes (30 s à 95 °C, 30 s à T<sub>m</sub>, 1 min à 72 °C), puis 1 étape finale d'élongation de 10 min à 72 °C.

Le profil thermique de la PCR à température fixe comprenait : 1 étape de dénaturation de 5 min à 94 °C, suivie de 25 cycles d'amplification composés de 3 étapes (30 s à 95 °C, 30 s à  $T_m$ , 1 min à 72 °C), puis 1 étape finale d'élongation de 10 min à 72 °C.

À l'issue de la PCR, la spécificité du couple d'amorces a été vérifiée par migration de 5  $\mu$ L de produits d'amplification par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 %. Le marqueur de taille 100 pdb DNA Ladder (Promega) a été utilisé pour vérifier la longueur du ou des fragments amplifiés par rapport à la longueur attendue. Dans le cas d'un signal mono-bande (couple d'amorces spécifiques), la quantité d'ADN amplifié était approximativement quantifiée par rapport à l'intensité de la bande principale (30 ng) et des bandes secondaires (10 ng) du marqueur de taille [Figure 21].



**Figure 21** – Profil électrophorétique et quantification des ADN amplifiés par PCR. La bande la plus intense du marqueur de taille (M) est de 100 bases à 30 ng, les autres bandes sont à 10 ng. Les profils des 3 individus amplifiés (Ind 1 à 3) sont mono-bandes pour le couple d'amorces testé. Le signal de migration des individus 1 et 2 correspond à une quantité d'environ 10 ng d'ADN ; celui de l'individu 3 correspond à environ 40 ng d'ADN.

Après quantification approximative, les produits d'amplification étaient (ou non) dilués pour obtenir une quantité équivalente à environ 10 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>. Cette quantité de produit a ensuite été purifiée par précipitation à l'éthanol, en présence d'acétate d'ammonium (5 M), de façon à éliminer tous les réactifs de PCR non incorporés (dNTP, amorces) et susceptibles d'interférer au cours de la réaction de séquençage. Les produits ont été remis en suspension dans 12  $\mu$ L d'eau Milli-Q®.

Après vérification de l'efficacité de la purification, par électrophorèse des produits de PCR sur gel d'agarose, la réaction de séquence a été réalisée individuellement pour chacune des deux amorces du couple. Pour cela, le mélange réactionnel contenait : 1 x de Tampon, 0,5  $\mu$ L de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), une des deux amorces ayant servi à la PCR (0,5  $\mu$ M), de l'eau Milli-Q® (q.s.p 10  $\mu$ L) et 10 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de produits de PCR purifiés.

Quelle que soit l'amorce utilisée, le profil thermique comprenait : 1 étape de dénaturation de 5 min à 96 °C, suivie de 25 cycles d'amplification composés de 3 étapes (10 s à 96 °C, 5 s à 55 °C, 4 min



à 60 °C).

À l'issue de la réaction de séquence, les produits d'amplification ont une nouvelle fois été purifiés pour éliminer les réactifs non incorporés au cours de la réaction. La méthode utilisée consistait à ajouter de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA, 125 mM) puis à réaliser une précipitation à l'éthanol. Après précipitation, les produits d'amplification étaient séchés dans un SpeedVac<sup>®</sup> (Thermo Scientific), avant d'être remis en suspension dans 10 µL de formamide puis incubés pendant 30 min à 4 °C et à l'obscurité.

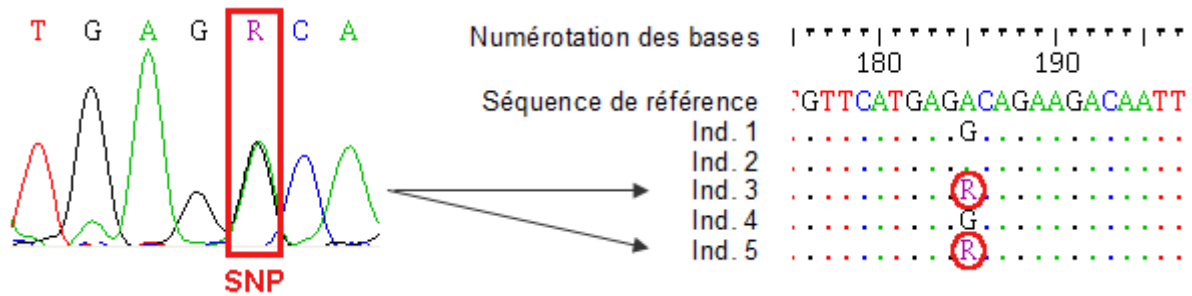
Les échantillons étaient ensuite dénaturés à 96 °C pendant 5 min avant transfert sur glace pour éviter la ré-association des deux brins complémentaires de l'ADN. Les séquences mono-brin, amplifiées et purifiées, étaient ensuite analysées via un séquenceur à 16 capillaires ABI 3130 XL (Applied Biosystems), selon les paramètres standard d'acquisition (polymère POP-4<sup>™</sup>, temps d'injection de 100 ms, voltage de 20 kV, temps de migration de 2500 s).

### III.2.1.1.6 Analyses des séquences et détection du polymorphisme

Les résultats de l'acquisition sont présentés sous forme d'un chromatogramme par séquence analysée. Chaque chromatogramme a ensuite été visualisé individuellement via le logiciel Chromas Lite v2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) pour une correction manuelle des erreurs de lecture. En effet, bien que le logiciel assigne un nucléotide (A, T, C ou G) à chacun des pics de fluorescence, il ne détecte pas le polymorphisme et attribue systématiquement un « N » (site indéterminé) lorsque deux pics sont superposés. De la même façon, il identifie un N lorsque l'intensité d'un pic est faible ou lorsqu'il y a un décalage dans la fréquence des pics. Ces corrections manuelles, bien que relativement longues et fastidieuses, ont été indispensables pour chacune des séquences à analyser. Il s'agissait de détecter le polymorphisme vrai de la mutation artéfactuelle produite par les réactions d'amplification ou par la lecture erronée du logiciel.

Afin de vérifier la validité de chacun des sites polymorphes détectés après la première lecture, pour un même EST, les séquences *Forward* et *Reverse* ont été systématiquement alignées et comparées. Pour chaque individu, une séquence consensus a ainsi été assemblée. En cas de doute chez un individu, la séquence a une nouvelle fois été amplifiée par PCR puis séquencée dans les deux sens (*Forward* et *Reverse*).

Après cette première correction, toutes les séquences consensus homologues ont été alignées via l'option ClustalW du logiciel BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999) afin de détecter le polymorphisme de base. Pour chaque site polymorphe, les chromatogrammes ont été systématiquement re-vérifiés afin de corriger d'éventuelles erreurs précédemment non détectées [Figure 22].



**Figure 22** – Détection d'un polymorphisme de type SNP par alignement de séquences consensus chez plusieurs individus (Ind. 1 à 5). Dans le cas présent, le nucléotide situé en position 185 à partir du début de la séquence de référence est polymorphe chez les individus 1, 3, 4 et 5. Le SNP se présente sous la forme homozygote de base G chez les individus 1 et 4, et sous la forme hétérozygote de bases A et G simultanées, codée par la lettre R, chez les individus 3 et 5. Le chromatogramme illustre la cas d'hétérozygotie des individus 3 et 5.

Les ADNc ayant servi au dessin des amorces ont été alignés afin d'identifier les éventuelles régions introniques. Une recherche d'homologie par BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) a été effectuée sur GenBank afin d'identifier les séquences homologues. Combinée à l'utilisation de ORF-Finder (Rombel *et al.*, 2002), cette recherche d'homologie a permis d'identifier les cadres de lecture (*Open Reading Frames*) et les régions UTR. Les annotations ont ensuite été vérifiées et confirmées via l'utilisation du logiciel Artemis (Rutherford *et al.*, 2009).

Chaque site polymorphe a ensuite été classé selon sa nature : transition, transversion, insertion / délétion (indel). Les indels n'étant pas considérés comme des vrais SNP (Brookes, 1999), leur nombre total est donné à titre indicatif, mais n'est pas inclus dans l'analyse du polymorphisme. Les SNP ont également été classés selon l'effet sur la séquence protéique : synonyme ou non-synonyme pour les sites localisés sur une région codante, et non-codant pour les sites localisés sur un intron ou une région UTR (*untranslated region*). Les SNP non-codants et synonymes ont été regroupés dans la catégorie des SNP silencieux.

La différence entre les ratios transition / transversion de chaque région (totalité de la séquence, région codante, région non-codante) a été testée au moyen du test du  $\chi^2$  d'homogénéité. La significativité du test a été établie pour une valeur de  $p < 0,05$ . Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R project version 2.1.4.1. (R Development Core Team, 2011).

Cette partie du manuscrit présente uniquement la description des résultats liés à la distribution du polymorphisme de bases. Les analyses de diversités ( $\pi$ ,  $\theta$ ) ont été effectuées sur les données des populations naturelles, exclusivement, et font l'objet d'une autre partie de ce manuscrit [Partie V.2].

### III.2.1.2 Résultats

Des amorces ont été dessinées sur un total de 114 séquences EST issues de deux bibliothèques de gènes candidats potentiellement impliqués dans la réponse de l'huître plate à la bonamiose.

Un signal d'amplification a été obtenu pour 101 séquences (88,6 %). Malgré plusieurs dessins d'amorces, 47 séquences (41,2 %) avaient un profil d'amplification multi-bandes, et donc non exploitable pour le séquençage. Les 54 autres séquences (47,4 %) avaient un profil mono-bande et ont pu être conservées pour les analyses. Parmi ces séquences, 10 d'entre-elles ont produit un chromatogramme illisible (multiples pics superposés) reflétant probablement la non spécificité des couples d'amorces ou des conditions de PCR non optimales, et 2 autres produisaient des séquences composées d'introns de très grandes tailles (> 700 pdb) impossibles à assembler.

Au final, 42 séquences (37,7 %) ont été assemblées avec succès. Cependant, 1 séquence n'a pas pu être alignée avec l'ADNc correspondant, traduisant un manque de spécificité de la part du couple d'amorces ou des conditions de PCR utilisées, et une autre séquence présentait un alignement de seulement 127 pdb avec son ADNc correspondant, traduisant un probable épissage alternatif des exons ou des introns.

Finalement, 40 séquences ont pu être utilisées pour la recherche de SNP [**Table 6**].

**Table 6** – Résultats du séquençage direct de 40 portions de gènes chez *O. edulis* pour la recherche de sites polymorphismes.

Gènes homologues	No accession EST GenBank*	Fonction biologique	L <sub>aa</sub> (pdb)	Région codante						Région non codante (5' – Intron – 3')					Polymorphisme total			No accession GenBank <sup>b</sup>
				P <sub>n</sub>	P <sub>s</sub>	Ts	Tv	Ts3	Tv3	N <sub>nc</sub>	L <sub>nc</sub> (pdb)	P <sub>nc</sub>	Ts	Tv	Pop.	Nat.	Familles	
Cytochrome b		1	390	0	3	2	1	2	1	0		15	15	0	18	0	JN680816	
Cytochrome oxydase 3		1	283	0	9	9	0	9	0	0		0			9	1	JN680817	
Omega glutation S transférase (GST)		2	1040	0	1	1	0	1	0	1	857	16	10	6	16	6	JN680818	
Stanniocalcin		3	628	4	0	0	4	0	2	1	388	5	4	1	9	0	JN680819	
Ribosomal protein L5		5	641	1	0	0	1	0	1	2	396	14	10	4	15	0	JN680820	
Ferritin		4	400	5	1	3	3	1	1	1	162	4	1	3	10	8	JN680821	
Actin		6	335	4	5	5	4	3	2	0		0			3	9	JN680822	
Tyrosine-protein kinase		7	677	0	0	0	0	0	0	1	466	9	4	5	9	0	JN680823	
Short-chain dehydrogenase		1	925	2	3	3	2	2	1	2	760	35	19	16	40	0	JN680824	
Hypothetical protein		8	283	1	1	0	2	0	2	0		0			2	0	JN680825	
ATP synthase F0 subunit 6		7	297	2	9	11	0	10	0	0		2	2	0	13	0	JN680826	
U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor		8	608	0	0	0	0	0	0	2	386	3	1	2	3	2	JN680827	
Trove domain family		7	343	2	0	1	1	0	0	0		0			0	2	JN680828	
Ribosomal protein L3		5	747	1	0	0	1	0	0	1	531	2	1	1	3	0	JN680829	
Tyrosyl-tRNA synthetase		7	432	4	2	3	3	2	0	1	220	13	2	11	19	10	JN680830	
Cholecystokinin A receptor		8	296	7	1	0	8	0	2	0		0			8	0	JN680831	
Growth arrest and DNA-damage-inducible protein		7	256	3	3	3	3	2	0	0		0			6	1	JN680832	
Tribbles-like protein 2		7	307	2	1	1	2	1	0	0		3	3	0	6	2	JN680833	
Bromodomain-containing protein 2		7	827	2	0	0	2	0	0	2	562	8	5	3	10	0	JN680834	
Ribosomal protein L19		5	362	2	0	1	1	0	0	1	128	2	2	0	4	0	JN680835	
Heat shock protein 90		2	200	1	0	0	1	0	0	0		0			1	0	JN680836	
Ribosomal protein L44		5	978	0	0	0	0	0	0	2	840	13	7	6	13	0	JN680837	
Heat shock protein 24		2	259	6	0	0	6	0	1	0		0			6	0	JN680838	
Galectin	GU320697	4	292	2	0	1	1	0	0	1	92	3	2	1	2	3	JN680839	
Hypothetical protein		8	245	5	0	1	4	0	0	0		0			5	0	JN680840	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GQ150762	3	658	4	3	5	2	3	0	0		0			7	0	JN680841	
Pol-like protein		7	333	5	1	2	4	1	1	0		0			6	1	JN680842	
cAMP-responsive element binding protein		4	396	3	1	2	2	1	2	1	111	1	1	0	5	1	JN680843	
Cysteinyln-tRNA synthetase		7	382	0	2	1	1	1	1	2	219	8	6	2	10	0	JN680844	
Cavortin		2	1624	0	0	0	0	0	0	2	>1254*	17	6	11	17	0	JN680845	
Heat shock protein 70		3	245	4	9	9	4	7	2	0		0			13	10	JN680846	
Ferritin		4	393	1	0	1	0	0	0	1	103	5	2	3	6	3	JN680847	
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1		3	229	0	1	1	0	1	0	0		0			1	1	JN680848	
Senescence-associated protein		8	302	3	2	1	4	0	2	0		4	2	2	5	4	JN680849	
MyD88 adaptor		4	868	7	2	3	6	1	1	2	332	4	2	2	13	0	JN680850	
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein		4	1064	9	3	8	4	4	0	1	581	0	0	0	9	11	JN680851	
Fas ligand-like protein		4	1313	3	1	2	2	1	1	3	635	6	3	3	10	0	JN680852	
Elongation factor 1 alpha	EU651798	3	311	1	0	0	1	0	0	1	149	2	2	0	3	0	JN680853	
Claathrin-associated adaptor complex AP-1		7	592	1	1	2	0	1	0	1	290	10	4	6	12	6	JN680854	
Tissue inhibitor of metalloproteinase		4	594	6	0	5	1	1	0	2	359	14	6	8	20	0	JN680855	
Total			21355	103	65	87	81	55	23	34	9821	218	122	96	367	81		

**Table 6** (suite) :

Gènes homologues	No accession EST GenBank <sup>a</sup>	Fonction biologique	L <sub>tot</sub> (pdb)	Région codante						Région non codante (5' – Intron – 3')					Polymorphisme total		No accession GenBank <sup>b</sup>
				P <sub>n</sub>	P <sub>s</sub>	T <sub>s</sub>	T <sub>v</sub>	T <sub>s3</sub>	T <sub>v3</sub>	N <sub>int</sub>	L <sub>int</sub> (pdb)	P <sub>nc</sub>	T <sub>s</sub>	T <sub>v</sub>	Pop. Nat.	Familles	
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1		3	229	0	1	1	0	1	0	0		0			1	1	JN680848
Senescence-associated protein		8	302	3	2	1	4	0	2	0		4	2	2	5	4	JN680849
MyD88 adaptor		4	868	7	2	3	6	1	1	2	332	4	2	2	13	0	JN680850
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein		4	1064	9	3	8	4	4	0	1	581	0	0	0	9	11	JN680851
Fas ligand-like protein		4	1313	3	1	2	2	1	1	3	635	6	3	3	10	0	JN680852
Elongation factor 1 alpha	EU651798	3	311	1	0	0	1	0	0	1	149	2	2	0	3	0	JN680853
Clathrin-associated adaptor complex AP-1		7	592	1	1	2	0	1	0	1	290	10	4	6	12	6	JN680854
Tissue inhibitor of metalloproteinase		4	594	6	0	5	1	1	0	2	359	14	6	8	20	0	JN680855
<b>Total</b>			<b>21355</b>	<b>103</b>	<b>65</b>	<b>87</b>	<b>81</b>	<b>55</b>	<b>23</b>	<b>34</b>	<b>9821</b>	<b>218</b>	<b>122</b>	<b>96</b>	<b>367</b>	<b>81</b>	

<sup>a</sup> : Numéro d'accèsion GenBank correspondant à l'EST utilisé pour le séquençage ; une absence de numéro indique que les EST n'ont pas été publiés.

<sup>b</sup> : Numéro d'accèsion GenBank correspondant à la portion de séquence utilisée pour l'estimation de la diversité nucléotidique [voir **Partie V.2**].

L<sub>tot</sub> : Longueur totale maximale de la portion séquencée.

P<sub>n</sub> : Nombre de sites polymorphes non-synonymes.

P<sub>s</sub> : Nombre de sites polymorphes synonymes.

T<sub>s</sub> : Nombre de mutations de type transition.

T<sub>v</sub> : Nombre de mutations de type transversion.

T<sub>s3</sub> : Nombre de mutations de type transition en position 3 des codons.

T<sub>v3</sub> : Nombre de mutations de type transversion en position 3 des codons.

N<sub>int</sub> : Nombre de régions introniques comprises dans la portion séquencée.

L<sub>int</sub> : Longueur totale cumulée des régions introniques.

P<sub>nc</sub> : Nombre de sites polymorphes non-codants (SNP en Intron et UTR).

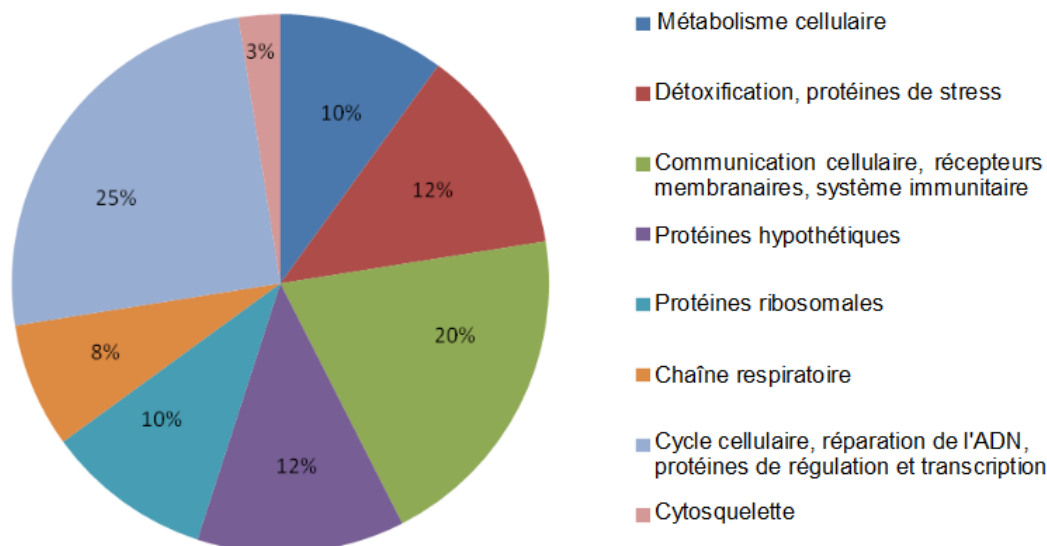
Pop. Nat. : Polymorphisme total rencontré chez les populations naturelles.

Familles : Polymorphisme total rencontré chez les familles ségrégeantes.

\* : Séquence Forward et Reverse non assemblées.

Fonction biologique (Gene Ontology) : **1** : Chaîne respiratoire ; **2** : Détoxification, protéines de stress ; **3** : Métabolisme cellulaire ; **4** : Communication cellulaire, récepteurs membranaires, système immunitaire ; **5** : Protéines ribosomales ; **6** : Cytosquelette ; **7** : Cycle cellulaire, réparation de l'ADN, protéines de régulation et transcription ; **8** : Protéines hypothétiques.

Ces 40 séquences se regroupent en huit grandes catégories [Figure 23] selon la ou les fonction(s) biologique(s) première(s) potentielle(s) de leur gène homologue, prédite(s) par NCBI via l'utilisation de l'outil GO (Gene Ontology) (comm. pers. Benjamin Morga).



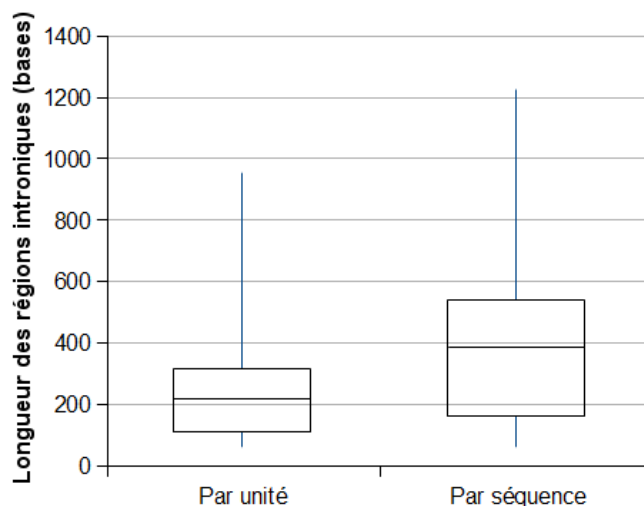
**Figure 23** – Distribution des séquences EST utilisées pour la caractérisation de SNP *in vitro* chez *Ostrea edulis* parmi huit grandes catégories fonctionnelles (comm. pers. Benjamin Morga).

Au total, ces 40 séquences représentent 21 355 bases du génome de l'huître plate européenne.

Parmi ces séquences, 23 (57,5 %) se composent d'au moins un intron, dont 9 séquences avec 2 introns et 1 séquence avec 3 introns. Les régions introniques représentent 46 % des bases séquencées (9821 bases). Leur longueur individuelle varie de 92 à 983 bases, avec une valeur médiane à 217 bases, et une longueur comprise entre 141 et 348 bases pour 50 % des introns. La longueur totale cumulée de ces régions varie de 92 à plus de 1250 bases par locus séquencé, avec une valeur médiane à 386 bases, et une longueur comprise entre 190 et 572 bases pour 50 % des loci. [Figure 24].

Au total, 420 sites polymorphes ont été identifiés, à raison de 209 transitions (49,8 %), 177 transversions (42,1 %), et 34 indels (8,1 %).

Parmi les 386 SNP (indel omis), 56,5 % sont situés en régions non-codantes (régions introniques et UTR). En région codante, 26,7 % des SNP sont des mutations non-synonymes et 16,8 % sont des mutations synonymes. Au total, 73,3 % des sites polymorphes sont silencieux (SNP non-codants et synonymes) [Table 6]. Dans chaque région (codante, non-codante), les transitions sont plus fréquentes que les transversions (54 % contre 46 %). Le ratio transition / transversion est égal à 1,2 sur la totalité des bases séquencées. Ce ratio est de 1,3 en région non-codante, de 1,1 en région codante, et de 2,4 en 3<sup>ème</sup> position des codons. Les ratios ne sont pas significativement différents les uns des autres ( $\chi^2 = 0,67$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,716$ ), excepté pour le ratio de la position 3 des codons ( $p < 0,05$ ).



**Figure 24** – Distributions quantitatives en boîte à moustaches de Tukey (minimum, 1<sup>er</sup> quartile, médiane, 3<sup>ème</sup> quartile, maximum) de la longueur des régions introniques pour chaque intron (par unité), et pour chaque locus séquencé (par séquence).

Sur les 386 SNP différents identifiés, 367 sont rencontrés chez les populations naturelles, et 81 chez les familles ségrégeantes. Au total, 16,1 % des sites polymorphes sont partagés entre les deux catégories de matériel biologique.

Une analyse de diversité a été réalisée sur un sous-échantillon du jeu de données (populations naturelles) et est présentée en **Partie V.2**.

### III.2.1.3 Discussion

#### III.2.1.3.1 Succès du séquençage

Le séquençage direct effectué sur les 114 EST, issus des deux bibliothèques de gènes potentiellement impliqués dans la réponse de *O. edulis* vis-à-vis de la bonamiose, a permis d'identifier plus de 400 sites nucléotidiques polymorphes. Pour optimiser la détection de SNP utilisables simultanément en cartographie de liaison et en génétique des populations, ces loci ont été séquencés chez des huîtres plates provenant de plusieurs populations naturelles génétiquement structurées et chez les individus grand-parents des huîtres utilisées pour la détection de QTL et eQTL.

Parmi les 114 EST analysés, seuls 37,7 % ont pu être amplifiés et séquencés avec succès. Cette faible proportion se rapproche des résultats de séquençage direct obtenus chez *Crassostrea gigas* (41 %, [Sauvage et al., 2007](#)), et de ceux obtenus chez *C. virginica* (46 %, [Zhang and Guo, 2010](#)). Chez toutes ces espèces d'huîtres, les raisons limitant le succès du séquençage résident dans l'amplification non-spécifique, dans la présence d'un polymorphisme au niveau du site d'accrochage des amorces et dans la présence d'introns de grande taille. En effet, la principale difficulté rencontrée chez *O. edulis* résidait dans l'identification de portions de séquence d'environ 20 paires de bases utilisables pour amorcer l'amplification et le séquençage des loci. Ainsi, malgré l'effort déployé pour la mise au point des amorces, 41,2 % des loci présentaient systématiquement un

profil multi-bandes reflétant la non-spécificité des amorces et des conditions de PCR testées. L'autre raison pouvant expliquer l'échec du séquençage réside dans la présence d'introns de très grande taille (jusqu'à 983 bases) voire de plusieurs introns, dans l'intervalle des couples d'amorces. Les séquences utilisées pour le dessin des amorces étant des EST, seule une portion issue de la transcription de l'ADN était disponible. Pour palier à l'éventualité de la présence d'introns au sein des séquences à analyser, les amorces ont été dessinées pour une taille moyenne attendue des amplicons de 280 paires de bases. Certaines séquences ayant été obtenues avec une longueur supérieure à 600 pb, il a parfois été nécessaire de dessiner de nouvelles amorces, intermédiaires au sein des séquences, pour pouvoir aligner les séquences *forward* et *reverse*.

Les invertébrés marins, particulièrement connus pour leur fort polymorphisme, sont souvent confrontés à un taux de succès de 45 à 55 % pour le développement de nouveaux marqueurs moléculaires (Kim *et al.*, 2011). Pour renforcer le taux de succès dans l'amplification de séquences, certains auteurs ont étudié l'importance du positionnement des amorces. Ainsi, en dessinant les amorces forward à l'extrémité 3' des séquences codantes et les amorces reverse au niveau des régions 3' UTR, 97 % des séquences EST choisies pour un séquençage direct ont été correctement amplifiées (Kim *et al.*, 2011). Cette stratégie, bien que prometteuse pour accroître le taux d'amplification, nécessite la connaissance préalable de la position des régions codantes et UTR ; ce qui n'est pas toujours le cas chez les espèces non modèles pour lesquelles peu de séquences sont publiées.

Chez *C. gigas*, cette méthode a permis de réduire de 72 % (Sauvage *et al.*, 2007) à 27 % (Kim *et al.*, 2011) la proportion d'amplicons contenant une ou plusieurs régions introniques. Bien que ce résultat favorise le succès de l'amplification des séquences, il omet une grande partie de la diversité nucléotidique. En effet, la majeure partie du polymorphisme se situe en région non-codante (56,5 % dans notre étude), où la présence d'un indel (insertion ou délétion) est souvent associée à un point chaud mutationnel (Dacheng *et al.*, 2008). L'élimination de ces régions dans le processus de recherche de SNP peut ainsi limiter le type de SNP pouvant être choisi (Garvin *et al.*, 2010).

Les 40 loci étudiés pour la recherche du polymorphisme de sites se regroupent en 8 catégories fonctionnelles différentes. Tous ces gènes homologues sont autant de gènes candidats potentiellement impliqués dans les mécanismes de réaction à une infection à *Bonamia ostreae*. Le séquençage des 40 loci correspond à une amplification de près de 21,5 kb du génome de l'huître plate européenne. Mis à part deux projets de séquençage d'un génome entier de bivalve (*Crassostrea gigas*, Hedgecock *et al.* (2005) ; *Pinctada fucata*, Takeuchi *et al.* (2012)), ce travail représente le plus grand effort, par séquençage direct, fourni chez un mollusque bivalve (10,5 kb chez *C. gigas*, Sauvage *et al.* (2007) ; 6,8 kb chez *C. virginica*, Zhang and Guo (2010)). Cependant, étant donnée la longueur de certaines régions introniques, les alignements de séquences consensus ne sont pas équivalents entre tous les loci, ni même au sein d'un même locus. Ainsi, l'analyse de diversité réalisée et présentée dans la **Partie V.2** du présent manuscrit a été effectuée sur un jeu de données plus restreint. Seules les données quantitatives liées à la distribution du polymorphisme sont présentées ici.



### III.2.1.3.2 Distribution du polymorphisme

Parmi les 420 sites polymorphes identifiés, 54 % des mutations sont des transitions contre 46 % de transversions ; ce qui correspond à un ratio transition / transversion égal à 1,2 chez l'huître plate européenne. Ce ratio global n'est pas significativement différent de ceux des régions codantes et non-codantes ( $\chi^2 = 0,67$  ;  $p = 0,716$ ). Il est également très proche de celui trouvé chez *C. gigas* (1,3 [Sauvage et al., 2007](#)) et chez trois espèces de Drosophiles (1,4 en moyenne, [Moriyama and Powell, 1996](#)). De plus, comme chez le moustique ([Morlais and Severson, 2003](#)), les transitions sont encore plus fréquentes en 3<sup>ème</sup> position des codons (70,5 % ;  $\chi^2 = 8,36$  ;  $p < 0,05$ ). La distribution inégale des SNP, en faveur des transitions, reflète l'apparition non aléatoire des mutations à travers le génome. En effet, la nature dégénérée du code génétique favorise l'apparition de mutations synonymes puisque la plupart des transitions survenant en 3<sup>ème</sup> position des codons sont de nature silencieuse.

Ainsi, dans la présente étude, 26,7 % des SNP sont des mutations non-synonymes contre 73,3 % de mutations SNP silencieuses. Comme attendu, la proportion de mutations non-synonymes est supérieure à celle rencontrée sur le jeu de données constitué exclusivement d'individus d'écloserie chez *C. gigas* (15,8 %, [Sauvage et al., 2007](#)). En effet, bien que ces auteurs ont utilisé un plan de croisement, pour produire les individus séquencés, qui maximise la diversité génétique, celle-ci n'est pas totalement représentative de la diversité attendue chez l'espèce. *A contrario*, la présente étude a été réalisée en partie sur des individus issus de plusieurs populations naturelles représentant les ressources naturelles de l'espèce. Nous avons donc un attendu supérieur en terme de diversité génétique, notamment de diversité sélectionnée. Pour aller plus loin dans l'étude de la diversité, il faut calculer la diversité nucléotidique selon la méthode de [Nei \(1987\)](#). Cette approche est développée dans la **Partie V** du présent manuscrit sur un sous-échantillon constitué uniquement des séquences obtenues chez les individus des populations naturelles.

### III.2.1.4 Choix des SNP *in vitro* pour le génotypage

Au total, 14,4 % des sites polymorphes sont partagés entre les familles et les populations naturelles étudiées. Les SNP sélectionnés pour le génotypage ont été préférentiellement choisis parmi ce polymorphisme partagé, afin d'optimiser leur utilisation et de réduire le biais de représentation ([Rosenblum and Novembre, 2007](#); [Garvin et al., 2010](#)).

Pour pouvoir être génotypés, il était indispensable que chaque SNP sélectionné soit isolé des autres sites polymorphes d'un minimum de 60 bases à la fois en 5' et en 3'. Cet isolement permet d'optimiser le dessin d'amorces spécifiques.

Parmi les 386 sites polymorphes de type substitution (indel omis), seuls 39 SNP (10,1 %) présentent cette double caractéristique. Afin d'optimiser la rentabilité en énergie déployée pour le génotypage, vis-à-vis de l'objectif de développer des marqueurs d'intérêt utilisables, 22 SNP ne répondant pas au critère d'isolement ont été choisis. Parfois, plusieurs SNP ont été choisis sur une même séquence afin d'optimiser la chance de détecter un site polymorphe utilisable en gé-

notypage. Pour ces SNP, les sites polymorphes compris dans les séquences flanquantes ont été remplacés par des bases dégénérées.

Ces 61 SNP ont été soumis à Illumina pour un test de qualité afin d'estimer le potentiel score en cas de génotypage. Ce test se base sur la composition nucléotidique des séquences flanquantes en 5' et en 3' du SNP, sur le même principe que le dessin d'une amorce pour PCR (spécificité, risque d'auto-complémentarité, etc.). Le résultat du test se présente sous la forme d'une valeur décimale comprise entre 0 et 1. Trois catégories de SNP sont alors distinguées :

- $0 < \text{score} < 0,4$  : score très faible, SNP à éliminer ;
- $0,4 < \text{score} < 0,6$  : score moyen, SNP à manier avec précaution ;
- $0,6 < \text{score} < 1$  : bon score.

Parmi les 61 SNP labo soumis à Illumina, 9 SNP ont dû être éliminés, 12 SNP de qualité moyenne et 40 SNP de bonne qualité ont été conservés pour leur intérêt. Ces 52 SNP sélectionnés pour le génotypage sont distribués sur un total de 35 loci différents. Leur intérêt réside soit pour le génotypage des familles ségrégeantes, soit pour celui des populations naturelles, soit pour les deux études.

### III.2.2 Les SNP *in silico*

La deuxième partie des SNP a été obtenue par séquençage Haut-Débit à partir de deux nouvelles technologies de séquençage : la Technologie Roche 454, et la Technologie Solexa/Illumina.

#### III.2.2.1 Présentation des deux technologies

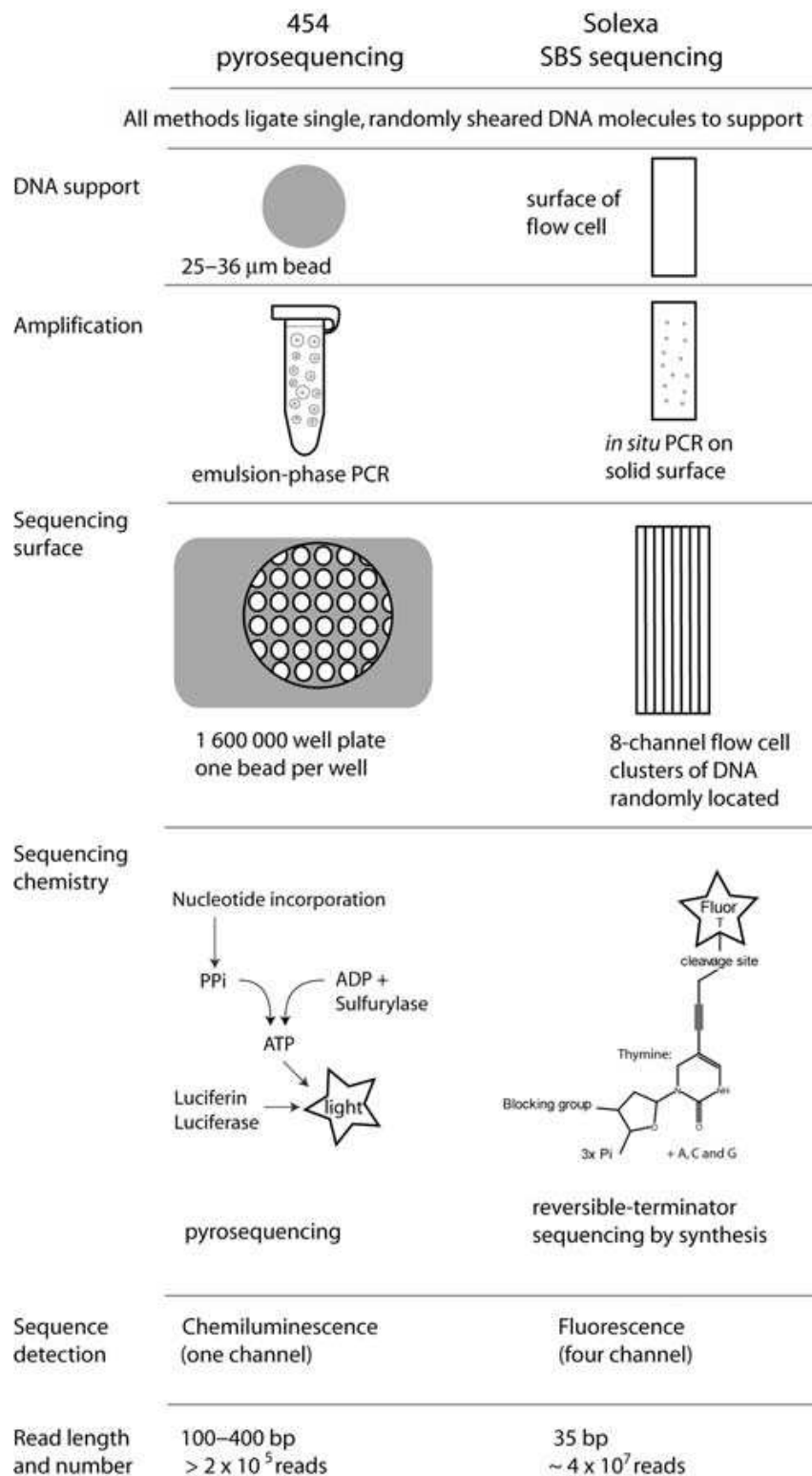
##### III.2.2.1.1 Pyroséquençage et séquençage 454 (Roche)

Développée par 454 Life Sciences (Branford, CT, USA ; <http://www.454.com/>), cette méthode de séquençage *de novo* est basée sur le principe de la détection des pyrophosphates libérés lors de l'incorporation des bases par la polymérase (pyroséquençage, Ronaghi, 2001). Contrairement au séquençage Sanger, elle ne requiert ni gel, ni capillaires pour séparer les produits d'extension par leur taille, et la détection se fait en temps réel.

Tout d'abord, l'ADN à séquencer est fragmenté en de courtes séquences mono-brin. Des adaptateurs sont ensuite positionnés en 5' et en 3' de chacun des fragments. Ces adaptateurs permettent la fixation d'un unique fragment sur une unique micro-bille de 28  $\mu\text{m}$ . Les micro-billes sont ensuite capturées dans des gouttelettes d'eau dispersées dans une solution d'huile (émulsion). Chaque fragment d'ADN est individuellement amplifié par PCR *in situ*, les 10 millions de copies néoformées se fixant alors à la micro-bille. L'émulsion est ensuite rompue et les micro-billes sont immobilisées dans une plaque pico-titrée en fibre optique, de 1,6 millions de puits ne pouvant contenir qu'une micro-bille chacun. Les réactifs nécessaires pour le pyroséquençage sont distribués dans chaque micro-réacteur. Les nucléotides sont ensuite ajoutés, l'un après l'autre. L'incorporation d'un nu-

cléotide sur le brin en cours de synthèse (élongation), par la polymérase, libère un pyrophosphate (PPi). Ce PPi, converti en ATP par une ATP sulfurylase, est ensuite utilisé par la Luciférase pour oxyder la Luciférine et produire une fluorescence. Ainsi, la fluorescence émise à la suite de l'incorporation d'un nucléotide connu, et captée par une caméra, permet de déterminer en temps réel la séquence de chaque fragment. Pour permettre l'ajout successif de chaque nucléotide, les dNTP non incorporés sont systématiquement dégradés par des enzymes.

En 2005, le premier appareil conçu pour le séquençage 454 (séquenceur GS20) permettait de réaliser près de 200 000 réactions simultanées pour environ 20 millions de paires de bases par run, et un coût de 5 000 \$ (**Figure 25**; Hudson, 2008). Actuellement, le système GS FLX Titanium XL+ permet de séquencer des fragments allant jusqu'à 1000 pdb.



**Figure 25** – Description des étapes clés, et des différences entre, les deux nouvelles technologies de séquençage haut-débit utilisées pour la détection de SNP : la Technologie Roche 454, et la Technologie Solexa/Illumina. Les étapes sont décrites dans l'ordre de la procédure. Les deux technologies partagent un même plan d'organisation mais diffèrent dans le type de support et de chimie utilisés pour déterminer la séquence ADN (D'après Hudson, 2008).

### III.2.2.1.2 Technologie Solexa/Illumina

Développée par Solexa / Illumina (San Diego, USA ; <http://www.illumina.com>), cette méthode de séquençage *de novo* est basée sur la technologie de séquençage par synthèse, avec utilisation de fluorochromes terminaux réversibles (Li *et al.*, 2003).

Le principe est le même que pour le séquençage 454. Il s'agit tout d'abord de fragmenter l'ADN en courtes séquences simple brin (30 à 50 pnb), puis de fixer des adaptateurs à chacune de leurs extrémités. Les fragments d'ADN sont ensuite immobilisés sur une surface solide par les adaptateurs fixés à leurs deux extrémités. Les ponts ainsi formés vont subir une amplification par PCR *in situ* (« ponts d'amplification »), avant d'être rompus lors de la dénaturation de l'ADN double brin. Chaque brin va alors individuellement former un nouveau pont d'amplification et ainsi augmenter la densité des brins d'ADN sur le support.

Après amplification, les bases sont successivement déterminées par synthèse d'ADN à partir de nucléotides munis d'un groupement réversible sous UV (photoclivage, à 340 nm). Chaque nucléotide incorporé par la polymérase émet alors une fluorescence qui est détectée dans un scanner à quatre capillaires (un pour chacun des 4 nucléotides marqués). L'élimination du groupement réversible restaure le groupement fonctionnel du nucléotide, permettant ainsi à la polymérase d'incorporer le nucléotide suivant.

En 2006, le premier séquenceur Solexa (Genome Analyzer) permettait de générer 1 gigabase (Gb) pendant un run de 3 jours (Figure 25 ; Hudson, 2008). Actuellement, la technologie Illumina permet de séquencer jusqu'à 600 Gb par run.

### III.2.2.2 Méthodologie et résultats

La découverte de SNP chez les organismes qui ont un génome complexe est relativement difficile car une faible proportion du génome peut être séquencée en une fois et la présence de séquences répétées ou dupliquées peut interférer avec l'alignement des séquences (Garvin *et al.*, 2010). Pour réduire la complexité du génome, une stratégie réside dans le séquençage du transcriptome (Vera *et al.*, 2008). En effet, celui-ci étant généralement 10 à 100 fois plus petit que le génome correspondant, son étude réduit d'autant le coût du séquençage (Gayral *et al.*, 2011). Le transcriptome inclut les séquences codantes et les régions régulatrices des gènes (5' et 3' UTR), ce qui représente probablement une grande partie des régions fonctionnelles d'un génome (Gayral *et al.*, 2011).

Dans le cas d'une espèce non-modèle pour laquelle il n'y a pas de séquence de référence pour effectuer un alignement, la solution pour diminuer les erreurs d'alignement et de détection de SNP consiste à combiner deux technologies de séquençage. Il s'agit alors de produire une séquence de référence, et d'aligner sur celle-ci des contigs de plus petite taille (Garvin *et al.*, 2010).

### III.2.2.2.1 Obtention des contigs

Dans le cadre du projet PopPhyl (comm. pers. Nicolas Bierne et Philippe Gayral), le transcriptome de l'huître plate (genre *Ostrea*) a été séquencé chez un individu par  $\frac{1}{2}$  run de séquençage 454 ( $\approx 500\,000$  séquences de  $\approx 400$  pdb de long). Après nettoyage des séquences (adaptateurs et amorces de PCR, poly-N, poly-nucléotides), le transcriptome a été assemblé avec le logiciel CAP3 (Huang and Madan, 1999).

En parallèle, le transcriptome de dix huîtres d'origines diverses a été séquencé par la technologie Illumina ( $\approx 4$  millions de séquences de 100 pdb par individu). Pour chacun des 10 individus, les courts fragments de séquences ont été nettoyés puis assemblés avec le logiciel AbySS (Simpson *et al.*, 2009). Ces 10 transcriptomes « Illumina » ont ensuite été assemblés avec CAP3.

Les contigs et les singletons ainsi obtenus par assemblage individuel des 11 transcriptomes (454 et Illumina) ont ensuite été fusionnés avec le même logiciel, afin d'obtenir le transcriptome de référence pour la recherche de SNP. Seuls les contigs ainsi obtenus ont été conservés pour les analyses.

L'assemblage final a permis d'obtenir un total de 43 688 contigs, d'une longueur moyenne de 728 nucléotides, et un total de 156 349 singletons non assemblés (comm. pers. Philippe Gayral).

### III.2.2.2.2 Traitement des séquences et choix des SNP

Afin d'aligner les séquences et de rechercher le polymorphisme, les 43 688 contigs ont été déposés sur le serveur Sigen@e de l'INRA. Après assemblage des 10 transcriptomes Illumina sur le transcriptome de référence, les SNP ont été identifiés selon plusieurs critères.

Afin de détecter du polymorphisme, il s'agissait tout d'abord de conserver uniquement les alignements d'un minimum de 20 séquences. Sur chacun de ces alignements de contigs, le SNP de meilleur score a été choisi. Pour cela, la qualité minimale du SNP a été choisie pour une valeur de 20 (1 % de risque que la base ait été mal lue). D'autre part, un isolement minimal de 60 bases de part et d'autre du SNP (à la fois en 5' et en 3'), par rapport aux sites polymorphes adjacents était nécessaire afin de permettre un dessin d'amorces spécifiques (amorce de 60 bases de longueur).

Les sites polymorphes de type indels ont également été éliminés de la sélection. Pour chaque séquence concernée par l'élimination d'un SNP de type indels, un autre site polymorphe a été choisi suivant les mêmes critères. Après application de ces critères, il restait un total de 15 700 SNP potentiellement utilisables.

Étant donné que nous ne pouvions utiliser que 332 SNP pour le génotypage (à cause du plan de charge), nous avons progressivement augmenté le critère de qualité minimale jusqu'à la valeur seuil 227 (à 228 il n'y avait plus de SNP), afin d'optimiser la qualité des SNP. À cette valeur, 1 305 SNP restaient utilisables.

Les 1 305 séquences correspondant aux SNP ont ensuite été extraites du jeu de données. Les 31 séquences pour lesquelles le SNP sélectionné était positionné à moins de 50 nucléotides d'un côté

ou de l'autre de l'extrémité de la séquence ont été éliminées de façon manuelle.

À l'issue de cette étape de sélection, 1 274 SNP potentiellement utilisables ont été soumis à Illumina pour le test du score (cf. **Partie III.2.1.4**).

Parmi ces SNP, 30 avaient un faible score (inférieur à 0,4), 110 avaient un score relativement moyen (compris entre 0,4 et 0,6) et 1133 avaient un score correct (supérieur à 0,6). Parmi ces 1133 SNP, les 332 SNP avec les meilleurs scores (score > 0,93) ont été sélectionnés pour le génotypage.

### III.2.3 Conclusion

Parmi les 386 SNP *in vitro* identifiés par séquençage direct de portions de gènes potentiellement impliqués dans la réponse de l'huître plate à la bonamiose, un sous-échantillon a été utilisé pour une étude de diversité génétique [cf. **Partie V.2**]. D'autre part, parmi les 386 SNP, seuls 52 marqueurs potentiels ont finalement été sélectionnés pour une validation par génotypage. À ces marqueurs, ont été ajoutés 332 SNP obtenus *in silico* à partir d'alignements de séquences de transcriptome, issues d'une combinaison de deux nouvelles technologies de séquençage haut-débit : la Technologie Roche 454, et la Technologie Solexa/Illumina.

Ces 384 marqueurs SNP ont par la suite été génotypés sur des individus de génération  $F_2$  afin de construire des cartes génétiques de liaison avec une importante résolution de marqueurs [cf. **Partie III.3**]. Ils ont également été utilisés pour la détection de régions QTL [cf. **Partie IV.2**] et eQTL [cf. **Partie IV.3**], mais également pour caractériser la diversité et la structure des populations naturelles de *O. edulis* [cf. **Partie V.3**].

## III.3 Cartographie génétique comparée

### III.3.1 Matériels et Méthodes

#### III.3.1.1 Carte d'identité des familles ségrégeantes

Les huîtres utilisées pour la construction des cartes génétiques de liaison proviennent de trois familles d'huîtres plates produites à l'écluserie de La Tremblade en 2009. Il s'agit de la descendance de 2<sup>ème</sup> génération (génération  $F_2$ ) de 3 familles ségrégeantes produites par croisements bi-parentaux intra-familiaux de deux individus pleins-frères (génération  $F_1$ ). Les individus grands-parents ( $F_0$ ) proviennent soit d'une lignée sélectionnée, soit d'une lignée consanguine ayant présenté de bonnes performances de survie vis-à-vis de la bonamiose, soit d'un individu sauvage [cf. **Partie II.1**].

Les familles utilisées sont les familles 09.04, 09.09 et 09.67.

#### III.3.1.2 Extraction ADN

Pour chacun des individus  $F_2$  et pour leurs parents  $F_1$  (total de 214 individus), l'ADN contenu dans 20 mg de tissu branchial a été extrait suivant le protocole QIAamp<sup>®</sup> DNA mini-kit (Qiagen). La qualité de l'extrait et sa concentration en ADN ont été mesurées. Les protocoles utilisés sont détaillés **Partie III.2.1.1.3**.

Les extraits d'ADN ont ensuite été dilués pour le typage des marqueurs moléculaires.

#### III.3.1.3 Génotypage des SNP

Les ADN extraits à typer avec les 384 SNP, issus de séquençage direct et de séquençage *in silico* [cf. **Partie III.2**], sont préalablement dilués à  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Le génotypage a été effectué à la plateforme génomique BeadXpress de Toulouse (GenoToul). Le génotypage GoldenGate (Illumina) utilise une méthode de détection oligo-ordonnée qui produit des composés fluorescents qui sont par la suite hybridés sur des billes de technologie VeraCode, puis scannés par un lecteur BeadXpress.

Sur place, les concentrations sont tout d'abord vérifiées sur un ABI 7900HT (Applied Biosystems), par dosage au picogreen avec le kit Quant-iT<sup>™</sup> dsDNA Broad-Range Assay (Invitrogen<sup>™</sup>). Pour la totalité du génotypage, 250 ng d'ADN par individu sont nécessaires. Un système de traçabilité permet de répertorier chacun des produits utilisés et chacune des étapes du protocole GoldenGate.

Les ADN sont tout d'abord dénaturés puis biotinylés (ajout de biotine sur l'ADN, par formation de liaisons covalentes). Une précipitation au propanol, en présence d'acétate d'ammonium, permet ensuite d'éliminer l'ADN non biotinylé. Après élution dans une solution tampon, l'ADN activé est hybridé avec les oligos spécifiques (amorces) des 384 SNP à typer.

Les ADN hybridés sont ensuite fixés sur des billes paramagnétiques grâce au groupement biotine précédemment ajouté. Après transfert sur un support magnétique pour capturer les billes, le



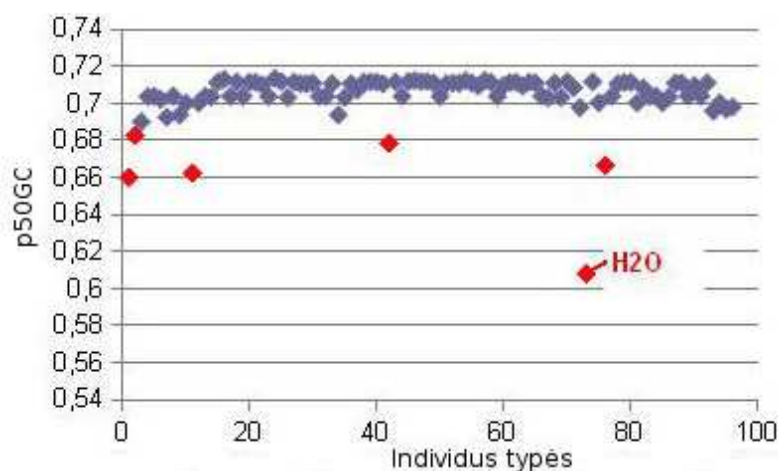
surnageant est éliminé. Les hybridations non-spécifiques et l'excédant d'oligo sont alors éliminés avec un tampon de lavage stringent contenant du SDS (dodécylsulfate de sodium). Les billes magnétiques sont ensuite lavées avec un tampon d'échange afin de préparer la réaction enzymatique d'extension et de ligation des ADN hybridés. Après la réaction enzymatique, les billes magnétiques sont séparées des ADN, et capturées.

Un mix réactionnel pour PCR, composé notamment d'une Taq Titanium<sup>®</sup> (Clontech Laboratories) ainsi que de 3 amorces universelles (2 amorces munies de fluorophores et 1 amorce biotinylée), est alors ajouté au produit d'extension et de ligation. L'amorce biotinylée permettra la capture du produit d'amplification qui contient le fluorophore. La réaction de PCR s'effectue dans un thermocycleur ABI 2720 (Applied Biosystems) suivant un profil thermique classique (dénaturation, amplification, élongation).

Les produits de PCR sont ensuite purifiés par fixation des produits d'amplification fluorescents sur des billes paramagnétiques, grâce à la reconnaissance du groupement biotine (ajouté lors de la PCR) sur la streptavidine qui recouvre les billes. Les produits de PCR sont ensuite lavés sur des filtres, et les produits simples brins fluorescents sont élués.

Les échantillons sont ensuite hybridés avec les cylindres Veracode. Après élimination des produits fluorescents non fixés, les génotypes sont lus sur le BeadXpress lors de l'excitation des deux fluorophores (cyanines Cy3 et Cy5) préalablement fixés sur les amplicons au cours de la PCR. Le BeadXpress effectue alors la lecture de l'Illumina code associé ainsi que l'enregistrement de la fluorescence émise.

L'analyse des données a été effectuée à distance sur un des ordinateurs d'analyse de la plateforme génomique de Toulouse (<http://genomique.genotoul.fr/intranet>). Le logiciel GenomeStudio (Illumina) a été utilisé pour faire la correspondance entre la fluorescence enregistrée, le code Illumina associé et chacun des 384 SNP typés. Tout d'abord, pour chacun des individus, la probabilité d'erreur de génotypage a été évaluée avec le score de l'indice « *GeneCall* ». Cet indice correspond au résultat de typage de l'échantillon pour chaque SNP, et est compris entre 0 (peu confiant) et 1 (très confiant). Pour chaque plaque de 96 échantillons analysés, les individus présentant un écart à la moyenne supérieur à  $|0,01|$  pour le p50 GC (*i.e.* Score du *GeneCall* pour 50 % des SNP) ont été exclus [**Figure 26**]. Il s'agissait d'équilibrer le jeu de données en excluant les individus présentant trop de génotypes manquants par rapport à la moyenne des individus. Ce déséquilibre a probablement été causé par un problème de génotypage dû à la qualité des échantillons d'ADN (concentration, pureté). Chez ces individus, le déséquilibre peut également remettre en cause la qualité des génotypes paraissant avoir été « correctement » identifiés ; il a donc été plus prudent de les écarter du jeu de données final. Il a également été vérifié que l'intensité de fluorescence des témoin  $H_2O$  (dépourvus d'ADN) était inférieure à celle des individus analysés.



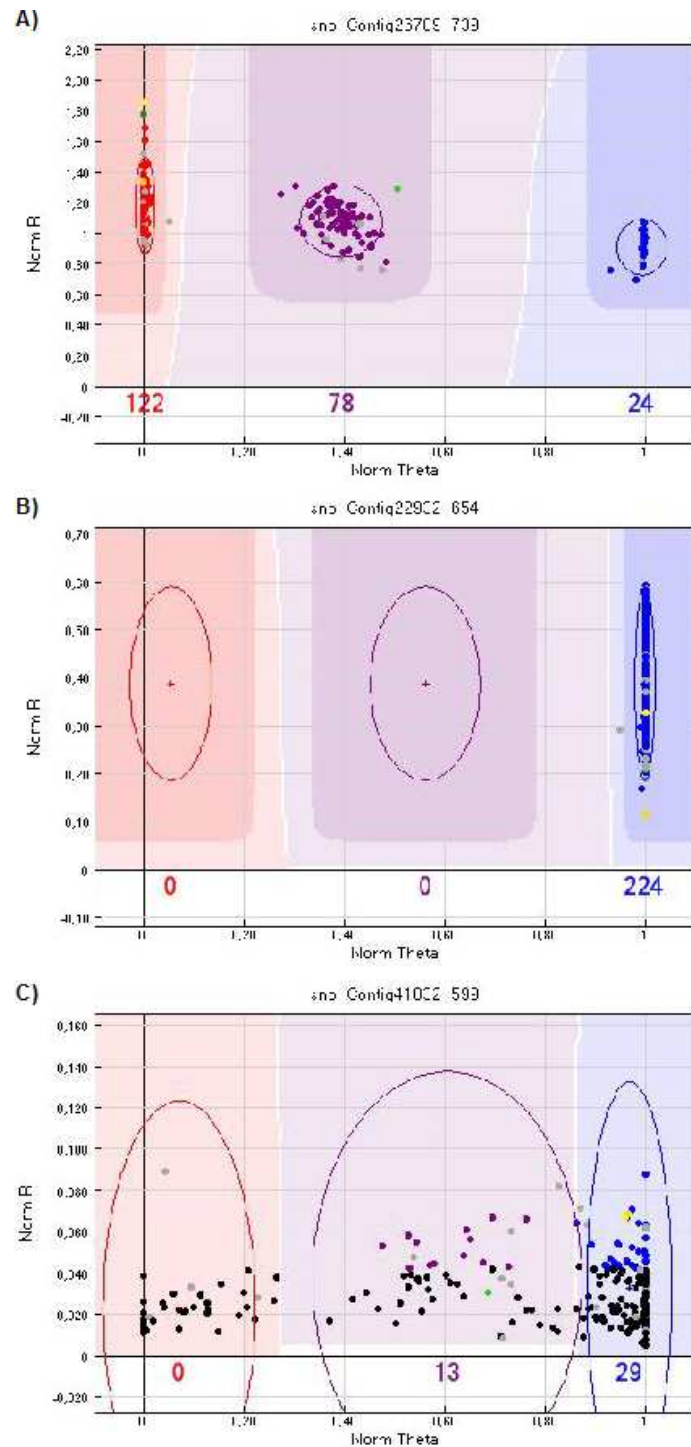
**Figure 26** – Exclusion des échantillons présentant un écart à la moyenne pour le p50 GC supérieur à  $|0,01|$ . Ici, le témoin  $H_2O$  ainsi que 5 individus (en rouge) ne se comportent pas comme les autres individus (en violet) et sont donc à exclure de la suite des analyses.

Avant de procéder à la vérification visuelle des clusters (agrégats) de génotypes, SNP par SNP, les individus appartenant au même type d'analyse (familles ou populations naturelles) ont été regroupés sur une même feuille de données (*sample-sheet*). Pour les familles, les génotypes des parents  $F_0$  et  $F_1$  étant connus, l'information sur les liens de parentés a été indiquée afin de vérifier les génotypes attribués aux  $F_1$  et  $F_2$ .

Pour chacun des 384 SNP typés, les résultats se présentent sous la forme d'un graphique sur lequel le génotype de chacun des individus typés pour ce SNP est représenté par un point. En vue polaire, après normalisation de l'intensité de la fluorescence détectée par le BeadXpress ( $Norm R$ ), 1, 2 ou 3 clusters de points sont visibles. Les clusters situés aux points "0" et "1" sur l'axe des abscisses ( $Norm Theta$ , intensité des fluorophores Cy3 et Cy5) correspondent respectivement aux génotypes homozygotes A et B, alors que le cluster en position intermédiaire (à proximité du "0,5") correspond aux génotypes hétérozygotes AB.

Suivant la qualité du SNP, on distingue [Figure 27] :

- les SNP informatifs : 2 ou 3 clusters identifiables ;
- les SNP non-informatifs : homozygotie, c'est-à-dire qu'il n'y a qu'un seul cluster regroupant les génotypes de tous les individus ;
- les SNP qui n'ont pas fonctionné : les génotypes se répartissent de façon continue entre les clusters.



**Figure 27** – Illustration de la qualité des SNP pouvant être rencontrée : **A)** SNP informatif, 3 clusters de génotypes sont nettement identifiables. 122 individus sont homozygotes pour l'allèle A, contre 78 individus hétérozygotes AB et 24 individus homozygotes pour l'allèle B ; **B)** SNP non-informatif, 1 unique cluster de génotypes est identifié : les 224 individus sont tous homozygotes pour l'allèle B ; **C)** SNP non-analysable, les génotypes se répartissent de façon continue entre les clusters, le génotypage n'a pas fonctionné. Les points noirs indiquent une fluorescence trop faible pour une analyse correcte. Il est possible d'identifier des individus d'intérêt en leur attribuant une couleur (jaune, vert, etc.). Les points de couleur grise correspondent aux individus exclus de l'analyse.

Lors de l'observation des clusters, le positionnement des répliqués d'individus témoins, dans le même cluster, est systématiquement vérifié. Pour cela, il est possible d'attribuer des couleurs afin de repérer visuellement des individus d'intérêt.

Les SNP sont ensuite catégorisés en fonction de la qualité des clusters. Pour cela, il est possible d'ajouter une valeur auxiliaire dans le tableau de données, afin d'ordonner les SNP pour les dénombrer et afin d'exporter une catégorie choisie de données.

Après vérification, les données de génotypes ont été exportées suivant le codage AB, c'est-à-dire que chacun des génotypes a été codé par les lettres AA, AB ou BB, et ceci quel que soit le polymorphisme de nucléotide (A, T, C ou G) situé sur la séquence d'origine.

### III.3.1.4 Génotypage des microsatellites

Dix neuf marqueurs microsatellites différents ont été utilisés. Ces marqueurs ont été génotypés uniquement chez la famille 09.09. Les caractéristiques de ces loci, telles qu'elles sont décrites dans la littérature (Naciri *et al.*, 1995; Launey, 1998; Launey *et al.*, 2002; Lallias *et al.*, 2009b,c), sont présentées **Table 7**. Pour chaque locus, un des trois marqueurs fluorescents (FAM, HEX, NED) était fixé en 5' de l'amorce Forward.

La réaction de PCR a été préparée dans une microplaque de 96 puits disposée dans un Thermocycleur ABI 2720 (Applied Biosystems). Bien que les conditions d'amplification de ces loci aient été optimisées par chacun des auteurs, celles-ci sont propres à la Taq polymérase ainsi qu'aux matériels de PCR et de génotypage utilisés.

Les 11 loci développés par Lallias *et al.* (2009b) ont été amplifiés suivant les conditions décrites par ces auteurs :

- Mix réactionnel : 100 ng d'ADN, 1 x de Tampon, MgCl<sub>2</sub> (2 mM), dNTP (80 µM), amorce Forward marquée à l'extrémité 5' (0,04 µM), amorce Reverse non marquée (0,1 µM), queue universelle marquée (0,17 µM), 1 U de GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polymérase (Promega), eau Milli-Q<sup>®</sup> (q.s.p 15 µL).
- Profil thermique de la PCR : 1 étape de dénaturation de 5 min à 96 °C, suivie de 30 cycles de 3 étapes (30 s à 96 °C, 45 s à T<sub>m</sub> [cf. **Table 7**], 45 s à 72 °C), puis 1 étape finale d'élongation de 30 min à 72 °C.

Pour les 8 loci développés par Naciri *et al.* (1995), Launey (1998) et Launey *et al.* (2002), il a été nécessaire d'adapter de nouvelles conditions de PCR :

- Paramètres communs à tous les loci : 1 x de Tampon, MgCl<sub>2</sub> (0,75 mM), dNTP (0,2 mM), 1 U de GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA polymérase (Promega), eau Milli-Q (q.s.p 10 µL).
- Les concentrations en ADN, amorces ainsi que le profil thermique de la réaction ont été modifiés [**Table 8**]. Les profils thermiques sont de type Touch-Down [cf. **Partie III.2.1.1.5**] avec une gamme de T<sub>m</sub> variant de 60 °C à 49 °C ou de 65 °C à 54 °C.

L'emploi de fluorochromes (FAM, HEX, NED) a permis une analyse simultanée de plusieurs marqueurs en multiplex.

**Table 7** – Caractéristiques des marqueurs microsatellites d'*Ostrea edulis* utilisés pour le génotypage. Label : Queue marquée fixée sur l'amorce F ; F : amorce Forward ; R : amorce Reverse ; Tm : Température optimale d'amplification.

Locus	No Accession GenBank	Motif	Label	Séquence des amorces (5' – 3')	Gamme de taille (pdb)	Tm (°C)
<b>Naciri et al., 1995</b>						
<i>Oedu</i> .B11		(TG) <sub>5</sub> (AC) <sub>22</sub>		F : GGA TTC TTA CTT ACC CAT C R : TTG CAT TCA CTA AAT ATA ACC	118 – 217	51
<i>Oedu</i> .C6		(TC) <sub>25</sub>		F : GTC AAC TCC CAA CAC TG R : GTA TTA ATG AAA ATT GCA AGG	104 – 175	53
<b>Launey, 1998</b>						
<i>Oedu</i> G9	AF310009	(AT) <sub>4</sub> (GT) <sub>35</sub>		F : GTT GAA CTG ACG ACC AAA TC R : GAT CTT TGA TAA AGT ATT ACA GG	119 – 279	50
<i>Oedu</i> T18	AF310015	(CT) <sub>21</sub>		F : TTT AGT TCA TAT TTA GAA TAA ATC R : CGC AAC TGA GTT ATG TAA AAT TG	110 – 140	50
<b>Launey et al., 2002</b>						
<i>Oedu</i> 12	AF310011	(GT) <sub>14</sub>		F : GCT GAT TTT OCA TCA ATT CGA G R : TCG TCA CCT CCC TCT CAG AG	216 – 272	50
<i>Oedu</i> O9	AF310012	(GA) <sub>35</sub>		F : ATT CAA TTG ATT TTA GGT TGG R : ACT TCA ATG TCT GTT CTA ATG G	140 – 176	53
<i>Oedu</i> T5	AF310014	(CA) <sub>15</sub>		F : CTT CGT TCT TGT ACG TAA GCG R : TAG TGA ATG GTC TTG CAT TCC	106 – 166	55
<i>Oedu</i> U2	AF310013	(AC) <sub>21</sub> (AG) <sub>7</sub>		F : ACC AAT GAA CAC AGA TCA CC R : GAA AGA AAT GGA GGC AAT AAC	146 – 206	50
<b>Lallias et al., 2009</b>						
Oed 144	JF236811	(GT) <sub>5</sub> (AT) <sub>6</sub> (GT) <sub>22</sub>	FAM	F : GTC GTT GAA AGT GCC TGG AT R : ACA ATA AAT CTG TAG CAA ATT TAG T	126 – 180	63
Oed 177a	JF236815	(AG) <sub>17</sub>	FAM	F : TGC AAG ATT AAA AGG CAG CA R : TCT GCA CCT AAT AGA CTG TTC TGA	170 – 194	60
Oed 181	JF236817	(AT) <sub>6</sub> (AG) <sub>31</sub>	NED	F : TGG TCA GCT GAA ACT GTT CAA R : TGA TGA ATC GAT TAA GAA GTA AAA ACA	176 – 222	63
Oed 199	JF236818	(CT) <sub>23</sub>	FAM	F : TTC GGG TCA AAT AAC GCA AG R : TGC CCG ACT ATG TCT TAG CA	184 – 250	60
Oed 202b	JF236819	(AG) <sub>22</sub>	FAM	F : GCG GGT ATT ACA TTA GCA ATC C R : TTG TAC ATG GAA GTA GGA CAG TCA	232 – 270	63
Oed 212b	JF236820	(GA) <sub>21</sub>	HEX	F : TTG AAA TGC CGA TGT CTG TC R : TGC CTC TTT GTA AAG TCT TTG TAT ATT	206 – 244	55
Oed 240	JF236823	(GA) <sub>30</sub>	NED	F : GAC TTA CAT AAG CAA ACT CTT R : ACT GGG CGG TCA CCA CCT TGG GCC	130 – 165	63
Oed 243	JF236824	(AG) <sub>21</sub>	HEX	F : GCC GCG AGC TGT AAT CAT A R : CGG CTG ACC GCT ATA TTT GT	243 – 273	60
Oed 269	JF236827	(TC) <sub>5</sub> (TG) <sub>14</sub> G(TG) <sub>5</sub>	FAM	F : GGG ATT GAG CGC AGT AAA GA R : ATT TTC GGA CGG AAC GTT TA	190 – 226	60
Oed 325	JF236832	(CT) <sub>27</sub>	HEX	F : GAG ACC TTG ATT CGA AAC TTC TTT R : CAC GAC ATA TCT AGC ACT TTT CA	154 – 188	63
Oed 327	JF236833	(TC) <sub>25</sub>	FAM	F : CCG TTA GCC CCA TCA GAT AA R : TGG GGT GTA AAG TAA TCT TCC AG	165 – 195	63

**Table 8** – Conditions de PCR pour l'amplification des marqueurs microsatellites d'*Ostrea edulis* utilisés pour le génotypage. F : amorce Forward ; R : amorce Reverse. TD : Touch-Down, avec une gamme de Tm variant de 60 °C à 49 °C ou de 65 °C à 54 °C.

Locus	ADN	Amorce (µM)	Profil thermique
<i>Oedu.B11</i>	300 ng	F : 0,22 R : 0,22	TD 60 à 49
<i>Oedu.C6</i>	200 ng	F : 0,15 R : 0,3	TD 60 à 49
<i>OeduG9</i>	300 ng	F : 0,22 R : 0,22	TD 65 à 54
<i>OeduT18</i>	300 ng	F : 0,22 R : 0,22	TD 60 à 49
<i>OeduJ12</i>	200 ng	F : 0,15 R : 0,15	TD 60 à 49
<i>OeduO9</i>	300 ng	F : 0,22 R : 0,45	TD 65 à 54
<i>OeduT5</i>	200 ng	F : 0,15 R : 0,15	TD 60 à 49
<i>OeduU2</i>	200 ng	F : 0,15 R : 0,3	TD 60 à 49

Les ADN amplifiés par PCR ont ensuite été typés sur un séquenceur à capillaires ABI 3130 XL (Applied Biosystems). Pour le génotypage, 1 µL de produit de PCR a été utilisé, auquel 10 µL de formamide et 0,25 µL de Rox Size Standard GS500 ont été ajoutés. Après dénaturation à 95 °C pendant 5 min, le mélange a été refroidi sur glace pour empêcher l'hybridation des brins ADN. La réaction d'électrophorèse a ensuite été lancée avec les paramètres standard d'acquisition (polymère POP-4™, temps d'injection de 15 s, voltage de 15 kV, temps de migration de 30 min).

Les résultats de génotypage ont été analysés sous le logiciel GeneMapper® version 3.7 (Applied Biosystems).

Malgré plusieurs tentatives de mise au point, le marqueur G9 n'a pu être amplifié en routine. Au final, 18 marqueurs microsatellites ont été utilisés.

### III.3.1.5 Construction des cartes génétiques de liaison

L'analyse de déséquilibre de liaison entre les différents marqueurs moléculaires a été réalisée avec le logiciel JoinMap® 4 (van Ooijen, 2006). Ce logiciel permet de calculer des groupes de liaison, d'ordonner les marqueurs au sein des groupes et d'estimer les distances de recombinaison entre eux. À l'issue de l'analyse, la représentation graphique des groupes de liaison constitue ce que l'on appelle une carte génétique de liaison. Le taux de recombinaison entre marqueurs étant propre à chaque événement de reproduction, chaque carte génétique de liaison est propre à la population étudiée. Ainsi, une carte de liaison a été construite pour chacune des trois familles  $F_2$ . Pour ce faire, les jeux de données de chacune des trois familles ont été analysés individuellement.

### III.3.1.5.1 Préparation des données de typage

Les génotypes des différents individus ont au préalable été transformés selon un code propre au type de la population étudiée. Dans le cas présent, nos populations d'étude ( $F_2$ ) proviennent de croisements entre deux individus parentaux ( $F_1$ ) diploïdes. Les individus  $F_1$  étant issus du croisement de deux individus  $F_0$  ne provenant pas de lignées pures, ils sont hétérozygotes ou homozygotes pour les marqueurs génotypés. Cette population est dite de type « CP » (*Outbreeder full-sib family*). Selon ce type de croisement, le mode de ségrégation des allèles varie entre les marqueurs moléculaires considérés (2 ou 3 ou 4 allèles). Il a donc été nécessaire d'appliquer un code précisant le type de ségrégation pour chacun des marqueurs. Pour chaque marqueur, chaque individu présente 2 allèles, et chaque allèle différent est codé par une lettre différente. Les lettres du code correspondent chacune à un type de ségrégation. Par exemple, pour un marqueur hétérozygote chez les deux individus  $F_1$ , on écrira : <abxcd> où a,b,c et d représentent 4 allèles différents et où l'individu parental n° 1 possède le génotype <ab> et l'individu parental n° 2 possède le génotype <cd>. Pour un même génotype, l'ordre des allèles n'a pas d'importance. Ainsi, on écrira indifféremment <ab> ou <ba> pour un génotype parental hétérozygote constitué des allèles a et b. Les différents codes que l'on peut rencontrer pour une population de type CP ainsi que le type de ségrégation mendélienne associé sont présentés dans la **Table 9**.

**Table 9** – Codes des génotypes pour une population de type CP et types de ségrégations mendéliennes associés.

Code	Description	Génotypes possibles de la descendance	Ségrégation mendélienne
<abxcd>	Locus hétérozygote chez les 2 parents, 4 allèles	ac, ad, bc, bd, --	1:1:1:1
<efxeg>	Locus hétérozygote chez les 2 parents, 3 allèles	ee, ef, eg, fg, --	1:1:1:1
<hcxhk>	Locus hétérozygote chez les 2 parents, 2 allèles	hh, hk, kk, h-, k-, --	(hh, k-) = 1:3 (h-, kk) = 3:1 (hh, hk, kk) = 1:2:1
<lmxll>	Locus hétérozygote chez le premier parent	ll, lm, --	1:1
<nnxnp>	Locus hétérozygote chez le deuxième parent	nn, np, --	1:1

Une fois codés [**Figure 28**], les génotypes sont reconnus par le logiciel et l'analyse peut commencer.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Markers>	144	177a	181	199	202b	212b	243	J12	C6	T5	U2
2	Segregation>	<hkxhk>	<abxcd>	<hkxhk>	<efxeg>	<hkxhk>	<hkxhk>	<efxeg>	<hkxhk>	<hkxhk>	<efxeg>	<hkxhk>
3	Individual											
4												
5	Ind_001	hk	ad	hk	ef	hk	kk	fe	hk	hk	eg	hk
6	Ind_002	hk	cb	hh	ef	hh	kk	fe	hh	hh	fg	hh
7	Ind_003	hk	ad	hk	ee	hk	hh	ee	kk	hk	--	hh
8	Ind_004	hh	bd	hh	eg	hh	hk	ge	hh	hh	fg	hh
9	Ind_005	hh	ca	hk	ee	hh	hk	ee	kk	hh	ee	hh
10	Ind_006	hk	bd	hk	ee	hk	hk	ee	kk	hk	ee	hk
11	Ind_007	hh	ca	hh	eg	hk	kk	ge	hh	hk	fe	hk
12	Ind_008	kk	cb	hk	fg	hk	hh	ge	hk	hk	fe	hk
13	Ind_009	hk	bd	hk	fg	hk	hk	gf	hk	hk	--	hk
14	Ind_010	hk	ad	hk	ee	hk	hk	ee	kk	hk	fg	hk
15	Ind_011	hk	cb	hk	eg	hk	kk	ee	kk	hk	fg	hk
16	Ind_012	kk	bd	kk	ef	kk	hk	ee	kk	kk	eg	kk
17	Ind_013	kk	ca	hk	eg	kk	kk	ge	kk	hk	--	hk
18	Ind_014	hk	bd	hk	eg	hk	hk	ge	kk	hk	fe	hk
19	Ind_015	hk	ca	hk	--	kk	kk	ge	hk	hk	fe	hk
20	Ind_016	kk	cb	hh	ee	hk	hk	ee	hh	hk	eg	hk

**Figure 28** – Exemple de fichier d’entrée pour le logiciel JoinMap 4. La portion de fichier présentée comporte 16 individus (ind\_001 à ind\_016) et 11 marqueurs moléculaires (144, 177a, 181, etc.). Le type de ségrégation mendélienne propre à chacun des marqueurs est également indiqué (<hkxhk>, <abxcd>, etc.). Les lettres a, b, c, d, e, f, g, h, k correspondent aux allèles. « -- » correspond à une donnée manquante pour un individu.

### III.3.1.5.2 Analyse de la distorsion de ségrégation

La première étape consistait à tester la conformité de la ségrégation des marqueurs chez la descendance vis-à-vis des lois de Mendel. Pour chacun des marqueurs moléculaires, cette analyse a été effectuée par un test du  $\chi^2$  :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(Obs - Att)^2}{Att}$$

où k correspond au nombre d’allèles parentaux. Comme nous l’avons vu **Table 9**, k peut correspondre à 2, 3 ou 4 allèles suivant que les parents sont hétérozygotes ou homozygotes pour les mêmes allèles. Ainsi, pour chaque génotype possible chez la descendance, le ratio des occurrences entre l’observation (Obs) et l’attendu (Att) a été calculé. Par exemple, pour des génotypes parentaux ab et cd, on attend les génotypes ac, ad, bc et bd dans la descendance à un ratio 1 :1 :1 :1. Dans ce cas, on aura k = 4 :

$$\chi^2_{1:1:1:1} = \frac{(n_{Obs(ac)} - n_{Att(ac)})^2}{n_{Att(ac)}} + \frac{(n_{Obs(ad)} - n_{Att(ad)})^2}{n_{Att(ad)}} + \frac{(n_{Obs(bc)} - n_{Att(bc)})^2}{n_{Att(bc)}} + \frac{(n_{Obs(bd)} - n_{Att(bd)})^2}{n_{Att(bd)}}$$

La significativité du test du  $\chi^2$  donnée par JoinMap a été interprétée pour caractériser chacun des marqueurs [**Table 10**]. Un test du  $\chi^2$  significatif traduit une distorsion de ségrégation.



**Table 10** – Table de correspondance entre la valeur de significativité donnée par JoinMap et l'interprétation de la conformité de la ségrégation des marqueurs chez la descendance vis-à-vis des lois de Mendel. NS : non significatif.

Significativité	P-value	Interprétation
-	NS	Marqueur mendélien
*	0,1	Marqueur peu distordu
**	0,05	
***	0,01	Marqueur fortement distordu
****	0,005	Marqueur très fortement distordu
*****	0,001	
*****	0,0005	
*****	0,0001	

### III.3.1.5.3 Analyse de liaison

Pour le calcul des groupes de liaison, un panel de groupes de liaison potentiels a été généré par le calcul de la force de liaison entre les marqueurs comparés deux à deux. Ce test de liaison attribue un LOD score (*Logarithm of the Odd ratio*, Morton, 1955) à chaque groupe de liaison potentiel en faisant l'hypothèse  $H_0$  qu'il y a une liaison entre les marqueurs par rapport à l'hypothèse inverse  $H_1$  de leur indépendance. Plus la valeur du LOD score augmente, plus l'hypothèse de liaison entre les marqueurs du groupe est élevée (ou vraisemblable). Par exemple, un LOD score égal à 3.0 correspond à une hypothèse de liaison 1000 fois supérieure à l'hypothèse d'indépendance. On considère généralement que cette valeur est le seuil minimum auquel on peut accepter des comparaisons multiples.

### III.3.1.5.4 Construction des cartes de liaison

Pour chacune des trois familles, deux cartes de liaison ont été construites : 1- une carte de liaison regroupant l'ensemble des marqueurs moléculaires typés et cartographiés ; 2- une carte de liaison regroupant uniquement les marqueurs mendéliens et ceux peu distordus.

Une fois les groupes de liaison définis, la carte de liaison a été calculée selon la méthode de Kosambi (1944). Cette méthode permet d'estimer la distance génétique entre les marqueurs moléculaires à partir de la fréquence de recombinaison entre les loci deux à deux (séparation physique des loci au cours de la réplication de l'ADN, ou méiose), et en tenant compte des interférences génétiques. C'est-à-dire que lors de la méiose, la probabilité d'occurrence d'un crossing-over (échange d'allèles entre brins chromosomiques) entre deux loci est proportionnelle à la distance qui les sépare et que, si il se produit, il réduit la probabilité qu'un deuxième crossing-over se produise dans son voisinage (interférence). Ainsi, si deux loci sont proches sur le même chromosome, ils ont peu de chance d'être séparés (recombinés) par un crossing-over. Leur taux de recombinaison sera alors faible et l'interférence sera maximale. Au contraire, si deux crossing-over se produisent de façon indépendante, il n'y aura pas d'interférence. La distance génétique calculée correspond au pourcentage de crossing-over pour 100 méioses ; elle est exprimée en centimorgans (cM).

L'ordre des marqueurs a également été testé par permutations, de façon à déterminer l'ordre le plus probable.

### III.3.1.5.5 Taille des cartes de liaison et couverture du génome

Après calcul des groupes de liaison, la taille théorique du génome a été estimée selon la formule de [Chakravarti \*et al.\* \(1991\)](#). Cette formule permet de calculer la longueur théorique (ou longueur attendue) de chacun des groupes de liaison en multipliant la longueur totale mesurée (ou longueur observée) du GL, estimée par la méthode de [Kosambi \(1944\)](#), par un coefficient  $L = (m + 1)/(m - 1)$ ; où  $m$  correspond au nombre total de marqueurs positionnés sur chaque GL. L'estimation de la couverture du génome a ensuite été obtenue en calculant le rapport de la longueur observée du génome par la longueur attendue.

### III.3.1.5.6 Cartographie comparée

Le logiciel JoinMap permet également des comparaisons et des assemblages entre plusieurs cartes ou plusieurs populations. Ainsi, il a été possible de comparer deux cartes génétiques obtenues avec deux populations différentes, sur la base de marqueurs communs. Il a également été possible de compléter, pour une même population d'étude, une carte de liaison avec de nouvelles données pour de nouveaux marqueurs.

## III.3.2 Résultats

Les analyses ont été effectuées individuellement pour les trois familles ségrégeantes de génération  $F_2$ . Pour chaque étape de l'analyse et de la construction des cartes de liaison, les résultats des trois familles sont comparés.

### III.3.2.1 Données de typage

Chez les trois familles, les individus  $F_2$ , les 2 parents  $F_1$ , les 2 grands-parents  $F_0$  ont été typés avec les marqueurs SNP. Pour les individus de générations  $F_2$ , le typage des 384 SNP a été effectué sur des effectifs de 115, 125 et 78 huîtres respectivement chez les familles 09.04, 09.09 et 09.67. D'autre part, afin d'optimiser la construction de la carte de liaison chez la famille 09.09, les individus  $F_0$ ,  $F_1$  ainsi que 260  $F_2$  (*i.e.*, 135 individus  $F_2$  supplémentaires) ont également été typés avec 18 marqueurs microsatellites.

Les résultats de typage sont présentés, pour chacune des familles, dans la [Table 11](#).

Au total, sur les 384 SNP typés sur les trois familles d'huîtres, 309 marqueurs (80,5 %) ont été typés avec succès. Parmi ces 309 SNP, certains marqueurs se sont révélés polymorphes uniquement chez les grands-parents  $F_0$  (respectivement 20, 13 et 34) ou uniquement en génération  $F_1$  (respectivement 2, 3 et 7). Étant donné que les individus de la génération  $F_2$  présentaient tous le même génotype pour ces marqueurs, ceux-ci n'étaient pas informatifs et n'ont donc pu être

utilisés.

Au total, chez les 3 familles d'huîtres, respectivement 121 (39,2 %), 115 (37,2 %) et 106 (34,3 %) SNP se sont avérés informatifs (*i.e.*, polymorphes) en génération  $F_2$ , et ont donc été utilisés pour construire les cartes génétiques de liaison. Parmi ces marqueurs polymorphes, respectivement 4, 4 et 3 SNP ont été mis au point au laboratoire à partir du séquençage de gènes d'intérêt (SNP *in vitro*).

D'autre part, parmi les 18 locus microsatellites typés chez la famille 09.09, 2 marqueurs (325 et 327) se sont révélés homozygotes uniquement chez les deux parents  $F_1$  et n'ont donc pu être utilisés chez les individus  $F_2$ . De même, les marqueurs 240 et 269, produisant respectivement un génotype de 3 allèles ou un allèle nul chez respectivement 20 % et 22 % de la descendance, ces 2 marqueurs n'ont pu être codés et n'ont donc pas été utilisés pour la suite de l'analyse. Finalement, chez cette famille, 14 marqueurs microsatellites ont été utilisés, en plus des SNP, pour la construction de la carte génétique de liaison.

**Table 11** – Résultats de typage des marqueurs moléculaires SNP et/ou microsatellites.

Famille	Génération	Effectifs individus	Effectifs marqueurs		
			typés	informatifs	dont SNP labo
09.04				143 (46,3%)	7
	$F_0$	2		20 <sup>a</sup>	3
	$F_1$	2	309	2 <sup>b</sup>	0
	$F_2$	115		121	4
09.09				131 (42,4%) / 16*	
	$F_0$	2 / 2*		13 / 2* <sup>a</sup>	
	$F_1$	2 / 2*	309 / 18*	3 / 0* <sup>b</sup>	
	$F_2$	125 / 260*		115 / 14*	4
09.67				147 (47,6%)	7
	$F_0$	2		34 <sup>a</sup>	4
	$F_1$	2	309	7 <sup>b</sup>	0
	$F_2$	78		106	3

<sup>a</sup>, <sup>b</sup> : Nombre de marqueurs SNP informatifs uniquement chez les individus  $F_0$  et  $F_1$  respectivement.

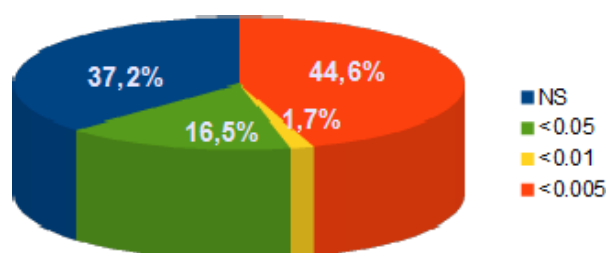
\* : Résultats pour les : SNP / microsatellites.

En **bleu** : Nombre de marqueurs utilisés pour la construction des cartes génétiques de liaison.

### III.3.2.2 Distorsion de ségrégation

#### III.3.2.2.1 Famille 09.04

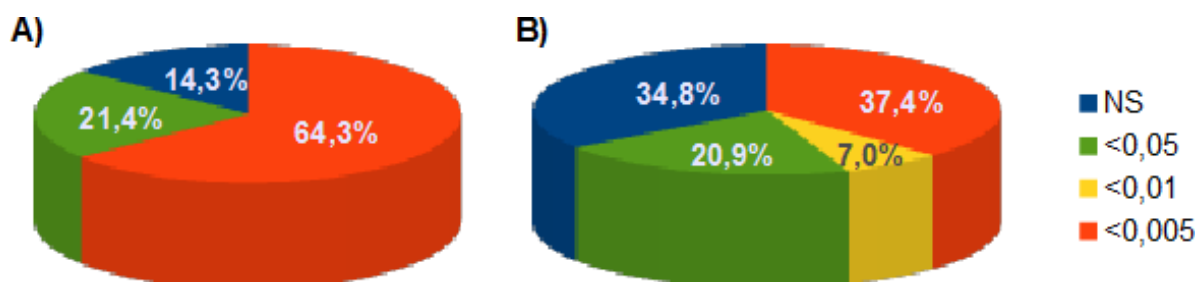
Parmi les 121 SNP typés chez la famille 09.04, 45 marqueurs (37,2 %) ségrègent en conformité aux lois de Mendel et ne sont donc pas distordus contre 20 marqueurs (16,5 %) légèrement distordus, 2 marqueurs (1,7 %) fortement distordus et 54 marqueurs (44,6 %) très fortement distordus [Figure 29]. Sur les 4 marqueurs « labo », 1 SNP suit les lois de Mendel et 3 SNP sont très fortement distordus.



**Figure 29** – Distribution de la distorsion de ségrégation des 121 marqueurs moléculaires de type SNP génotypés sur 115 individus de la famille 09.04. NS : proportion de marqueurs mendéliens, non distordus ; <0,05 : proportion de marqueurs peu distordus ; <0,01 : proportion de marqueurs fortement distordus ; <0,005 : proportion de marqueurs très fortement distordus.

#### III.3.2.2.2 Famille 09.09

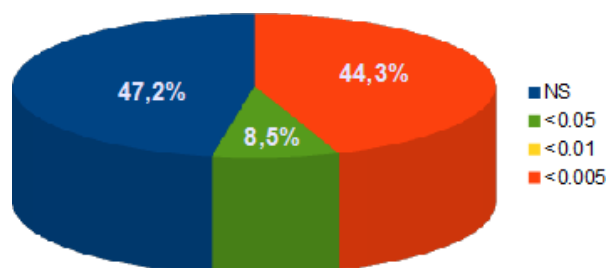
La distorsion de ségrégation concerne 46,5 % des 129 marqueurs moléculaires génotypés chez la famille 09.09. Parmi les marqueurs microsatellites, 2 marqueurs (14,3 %) ségrègent en conformité aux lois de Mendel et ne sont donc pas distordus contre 3 marqueurs (21,4 %) légèrement distordus et 9 marqueurs (64,3 %) très fortement distordus [Figure 30]. Parmi les marqueurs SNP, 40 marqueurs (34,8 %) ségrègent en conformité aux lois de Mendel et ne sont donc pas distordus contre 24 marqueurs (20,9 %) légèrement distordus, 8 marqueurs (7,0 %) fortement distordus et 43 marqueurs (37,4 %) très fortement distordus. Sur les 4 marqueurs « labo », 1 SNP suit les lois de Mendel, 2 SNP sont légèrement distordus et 1 SNP est très fortement distordu.



**Figure 30** – Distribution de la distorsion de ségrégation **A)** des 14 marqueurs microsatellites génotypés sur 260 individus de la famille 09.09 ; **B)** des 115 marqueurs SNP génotypés sur 125 individus de la famille 09.09. NS : proportion de marqueurs mendéliens, non distordus ; <0,05 : proportion de marqueurs peu distordus ; <0,01 : proportion de marqueurs fortement distordus ; <0,005 : proportion de marqueurs très fortement distordus.

### III.3.2.2.3 Famille 09.67

Parmi les 106 SNP typés chez la famille 09.67, 50 marqueurs (47,2 %) ségrègent en conformité aux lois de Mendel et ne sont donc pas distordus contre 9 marqueurs (8,5 %) légèrement distordus, aucun marqueur fortement distordu et 47 marqueurs (44,3 %) très fortement distordus [Figure 31]. Sur les 3 marqueurs « labo », 1 SNP est faiblement distordu et 2 SNP sont très fortement distordus.



**Figure 31** – Distribution de la distorsion de ségrégation des 106 marqueurs moléculaires de type SNP génotypés sur 78 individus de la famille 09.67. NS : proportion de marqueurs mendéliens, non distordus ; <math><0,05</math> : proportion de marqueurs peu distordus ; <math><0,01</math> : proportion de marqueurs fortement distordus ; <math><0,005</math> : proportion de marqueurs très fortement distordus.

### III.3.2.3 Cartes de liaison

Chez chaque famille, deux cartes de liaison ont été successivement calculées en prenant en compte la totalité des marqueurs d'une part, puis dans un deuxième temps en prenant en compte uniquement les marqueurs mendéliens et ceux peu distordus ( $P$ -value < 0,05). La numérotation des différents groupes est commune entre les familles et correspond aux 10 groupes de liaison attendus chez l'huître plate européenne. Lorsque deux groupements font partie d'un même groupe de liaison mais ne sont pas reconnus comme tel chez une des familles, ils sont notés « a » et « b » (ex. : GL 4a, GL 4b). Les groupements identifiés chez une seule des familles sont nommés groupes « surnuméraires » (S).

#### III.3.2.3.1 Famille 09.04

Sur la carte de liaison obtenue avec la totalité des 121 SNP, 12 groupes et 1 singleton ont été calculés avec une relative grande robustesse (LOD score) comprise entre 4 et 10 dont 7 groupes avec la robustesse maximale [Table 12].

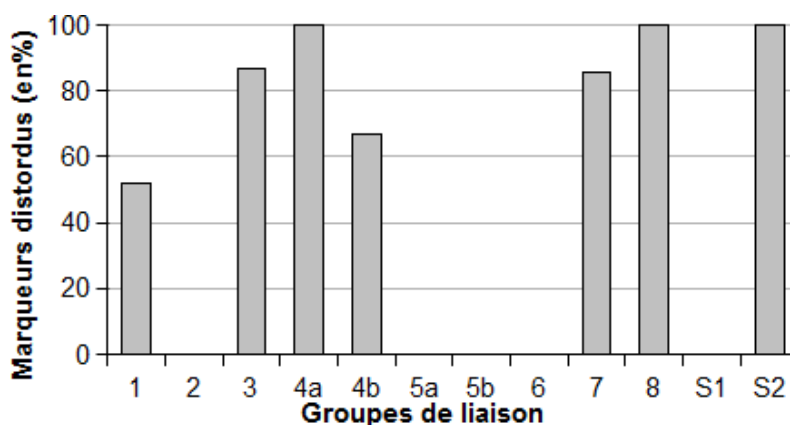
Parmi les 121 marqueurs liés, 117 marqueurs ont finalement été positionnés sur 12 groupes, à raison de 2 à 29 marqueurs SNP sur chaque groupe. Les 4 autres SNP ont été éliminés à cause d'une très faible liaison avec les autres marqueurs, empêchant un positionnement stable sur les GL, ou à cause d'une absence d'association (singleton). Six GL présentent plus de 10 SNP positionnés. Les 12 marqueurs positionnés sur le GL 4a sont situés exactement à la même position, traduisant une très forte liaison (LOD score = 10) et un taux de recombinaison nul.

**Table 12** – Caractéristiques de la carte de liaison de la famille 09.04 obtenue à partir du génotypage d'un total de 115 individus pour 121 marqueurs moléculaires de type SNP. Le singleton n'est pas représenté. La longueur théorique des Groupes de liaison (GL) est obtenue par la formule de [Chakravarti et al. \(1991\)](#). Sur le GL 4a, 12 marqueurs sont situés exactement à la même position, traduisant un taux de recombinaison nul.

Groupe de liaison (GL)	LOD score	Nb total de marqueurs liés	Nb total de marqueurs positionnés	Longueur totale (en cM)	Intervalle moyen (en cM)	Intervalle maximum (en cM)	Longueur théorique (en cM)
GL 1	10	29	29	35,10	1,25	14,40	37,61
GL 2	10	16	16	40,69	2,71	13,32	46,12
GL 3	6	15	15	36,65	2,62	10,43	41,88
GL 4a	10	12	12	0,0	0,0	0,0	0,0
GL 4b	6	3	3	9,03	4,52	5,87	18,07
GL 5a	5	11	10	44,72	4,97	22,28	54,66
GL 5b	10	5	5	19,80	4,95	14,48	29,70
GL 6	8	11	11	51,80	5,76	15,70	62,16
GL 7	4	7	7	19,92	3,32	9,35	26,56
GL 8	10	5	5	13,60	3,40	6,22	20,40
S1	6	4	2	2,04	2,04	2,04	6,13
S2	10	2	2	1,79	1,79	1,79	5,36

Finalement, 8 GL (dont 2 GL constitués de 2 groupes) et 2 groupes surnuméraires ont été identifiés, pour une longueur totale de 275,15 cM. Selon la formule de [Chakravarti et al. \(1991\)](#), cela équivaut à une taille théorique du génome estimée à 348,65 cM et à une représentation de 78,9 % du génome. L'intervalle moyen entre les marqueurs positionnés sur un même groupe est relativement faible, avec des valeurs moyennes comprises entre 0 et 5,76 cM et un intervalle maximal de 22,28 cM sur le GL 5a. L'intervalle moyen de l'ensemble des marqueurs positionnés sur la carte de liaison est de 3,11 cM. Étant donné que plusieurs marqueurs présentent un taux nul de recombinaison, si on considère uniquement un marqueur pour chacune des 90 positions sur la carte, l'intervalle moyen est de 3,51 cM.

La distorsion de ségrégation ne touche pas de la même façon tous les groupes de liaison [**Figure 32**]. En effet, les marqueurs distordus ont tendance à se regrouper sur les groupes de liaison 4a, 8 et S2 où 100 % des marqueurs sont distordus, et sur les GL 1, 3, 4b et 7 où respectivement 52 %, 87 %, 67 % et 86 % des marqueurs sont distordus.



**Figure 32** – Proportion de marqueurs distordus au sein de chacun des 8 groupes de liaison et des 2 groupes surnuméraires de la carte génétique de la famille 09.04.

Sur la carte obtenue avec les 65 SNP peu ou pas distordus (**Table 13**), 7 groupes de liaisons et 3 singletons ont été calculés avec une relative grande robustesse comprise entre 5 et 10, dont 7 GL avec la robustesse maximale.

Parmi les 65 marqueurs liés, 58 marqueurs ont finalement été positionnés. Les 7 autres marqueurs ont été éliminés à cause d'une très faible liaison avec les autres marqueurs, empêchant un positionnement stable sur les GL, ou à cause d'une absence d'association (singletons).

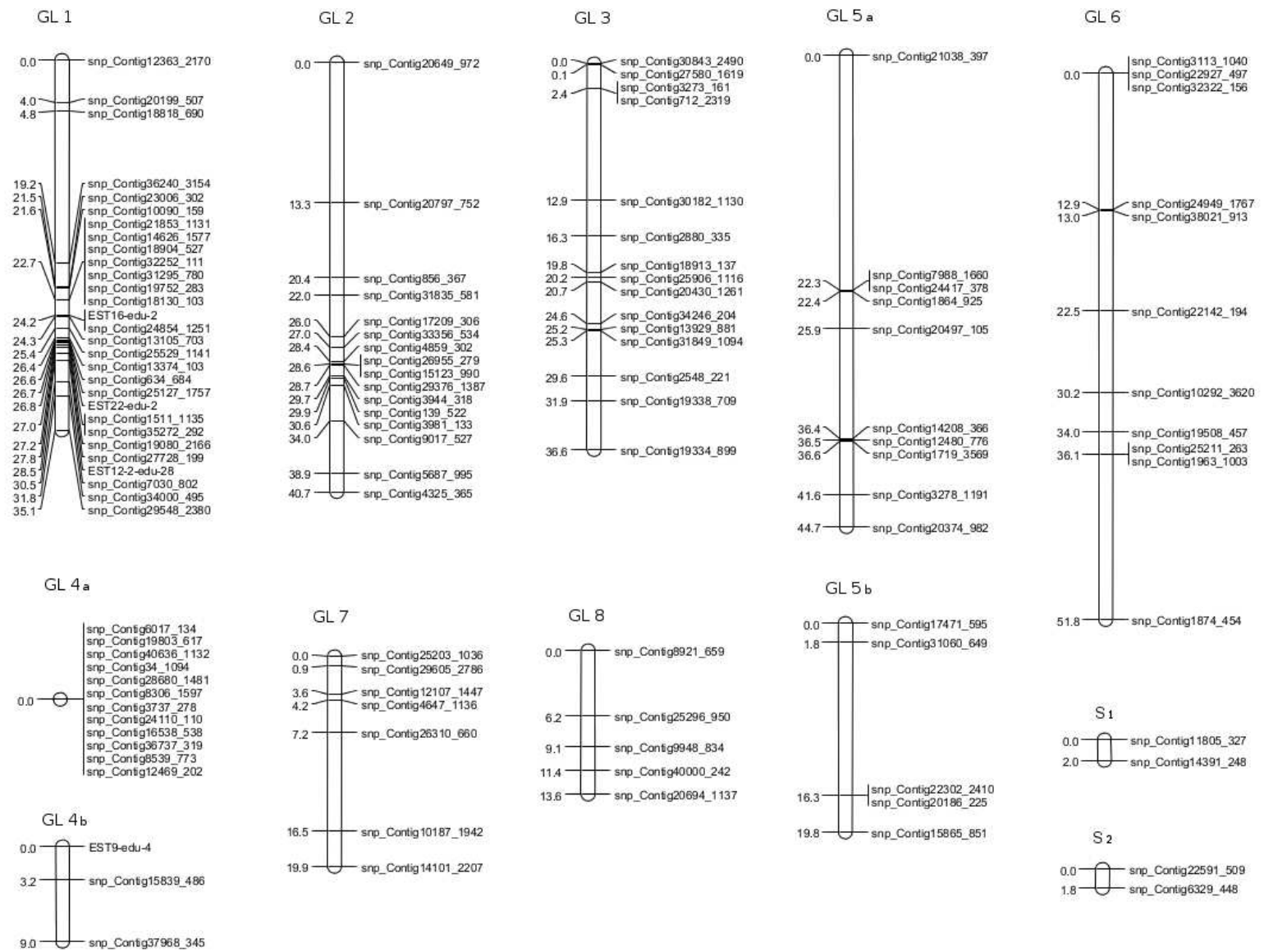
Finalement, 6 GL ont été identifiés, à raison de 2 à 16 marqueurs SNP sur chaque GL, pour une longueur totale de 180,07 cM. Selon la formule de [Chakravarti \*et al.\* \(1991\)](#), cela équivaut à une taille théorique du génome estimée à 223,01 cM et à une représentation de 80,74 % du génome.

L'intervalle moyen entre les marqueurs positionnés sur un même GL est relativement faible, avec des valeurs moyennes comprises entre 2,04 et 5,20 cM et un intervalle maximal de 22,30 cM sur le GL 4a. L'intervalle moyen de l'ensemble des marqueurs positionnés sur la carte de liaison est de 3,62 cM. Étant donné que plusieurs marqueurs présentent un taux nul de recombinaison, si on considère uniquement un marqueur pour chacune des 51 positions sur la carte, l'intervalle moyen est de 4,38 cM.

**Table 13** – Caractéristiques de la carte de liaison de la famille 09.04 obtenue à partir du génotypage d'un total de 115 individus pour 65 marqueurs moléculaires de type SNP peu ou pas distordus ( $P$ -value < 0,05). Les 3 singletons et le doubleton non positionnés ne sont pas représentés. La longueur théorique des Groupes de liaison (GL) est obtenue par la formule de [Chakravarti \*et al.\* \(1991\)](#).

Groupe de liaison (GL)	LOD score	Nb total de marqueurs liés	Nb total de marqueurs positionnés	Longueur totale (en cM)	Intervalle moyen (en cM)	Intervalle maximum (en cM)	Longueur théorique (en cM)
GL 1	10	16	16	40,69	2,71	13,30	46,12
GL 2	10	14	14	21,01	1,62	6,60	24,24
GL 3	8	11	11	51,80	5,18	15,70	62,16
GL 4a	5	11	10	44,72	5,20	22,30	54,66
GL 5a	10	5	5	19,80	4,95	14,50	29,70
GL 6	6	3	2	2,04	2,04	2,04	6,13

La carte génétique de liaison obtenue avec les marqueurs peu ou pas distordus étant identique (même ordre de marqueurs) à celle obtenue avec l'ensemble des marqueurs SNP (distordus ou non), c'est la carte complète constituée de 8 GL et de 2 groupes surnuméraires [**Figure 33**] qui est retenue pour la détection des QTL [cf. **Partie IV.2**].



**Figure 33** – Carte génétique de liaison de la famille 09.04 construite à partir des génotypes de 115 individus sur 117 marqueurs SNP. Huit groupes de liaison (GL 1 à GL 8) et 2 groupes surnuméraires (S1 et S2) sont représentés.



### III.3.2.3.2 Famille 09.09

Deux cartes de liaison ont été calculées en prenant en compte la totalité des 129 marqueurs SNP et microsatellites d'une part, puis dans un deuxième temps en prenant en compte uniquement les 69 marqueurs mendéliens et ceux peu distordus ( $P$ -value < 0,05).

Sur la carte de liaison obtenue avec la totalité des 129 marqueurs, 10 groupes de liaison (GL) et 1 singleton ont été calculés avec une relative grande robustesse (LOD score) comprise entre 3 et 10 dont 7 GL avec la robustesse maximale [Table 14].

**Table 14** – Caractéristiques de la carte de liaison de la famille 09.09 obtenue à partir du génotypage de 14 marqueurs microsatellites génotypés sur 260 individus de la famille 09.09 et de 115 marqueurs SNP génotypés sur 125 individus. Le singleton n'est pas représenté. La longueur théorique des Groupes de liaison (GL) est obtenue par la formule de Chakravarti *et al.* (1991).

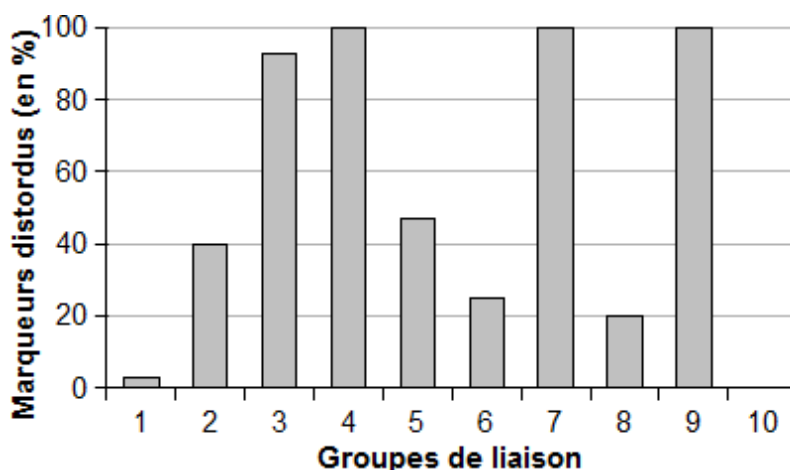
Groupe de liaison (GL)	LOD score	Nb total de marqueurs liés (msat / SNP)	Nb total de marqueurs positionnés	Longueur totale (en cM)	Intervalle moyen (en cM)	Intervalle maximal (en cM)	Longueur théorique (en cM)
GL 1	10	34 (0/34)	34	49,00	1,48	10,06	51,97
GL 2	10	16 (2/14)	15	39,92	2,85	14,34	45,62
GL 3	3	15 (7/8)	14	40,84	3,14	7,43	47,12
GL 4	10	19 (2/17)	19	61,26	3,40	25,65	68,07
GL 5	10	15 (2/13)	15	27,99	2,00	7,27	31,98
GL 6	6	12 (0/12)	12	46,44	4,22	14,29	54,88
GL 7	9	8 (0/8)	8	19,73	2,82	10,51	25,36
GL 8	10	5 (1/4)	5	25,69	6,42	13,14	38,53
GL 9	7	2 (0/2)	2	10,35	10,35	10,35	31,05
GL 10	10	2 (0/2)	2	6,44	6,44	6,44	19,31

Parmi les 129 marqueurs liés, 126 marqueurs ont finalement été positionnés sur 10 GL, à raison de 2 à 34 marqueurs sur chaque GL. Les 3 autres marqueurs ont été éliminés à cause d'une très faible liaison avec les autres marqueurs, empêchant un positionnement stable sur les GL, ou à cause d'une absence d'association (singleton). Six GL présentent plus de 10 SNP positionnés.

Finalement, 10 GL ont été identifiés, pour une longueur totale de 327,64 cM. Selon la formule de Chakravarti *et al.* (1991), cela équivaut à une taille théorique du génome estimée à 413,89 cM et à une représentation de 79,16 % du génome.

L'intervalle moyen entre les marqueurs positionnés sur un même GL est relativement faible, avec des valeurs moyennes comprises entre 1,48 et 10,35 cM et un intervalle maximal de 25,65 cM sur le GL 4. L'intervalle moyen de l'ensemble des marqueurs positionnés sur la carte de liaison est de 4,31 cM. Étant donné que plusieurs marqueurs présentent un taux nul de recombinaison, si on considère uniquement un marqueur pour chacune des 102 positions sur la carte, l'intervalle moyen est de 4,84 cM.

La distorsion de ségrégation ne touche pas de la même façon tous les groupes de liaison [Figure 34]. En effet, les marqueurs distordus ont tendance à se regrouper sur les groupes de liaison 3, 4, 7 et 9 où 100 % des marqueurs sont distordus, excepté 93 % pour le GL 3.



**Figure 34** – Proportion de marqueurs distordus au sein de chacun des 10 groupes de liaison de la carte génétique de la famille 09.09.

Sur la carte obtenue avec les 69 SNP peu ou pas distordus (**Table 15**), 6 groupes de liaisons et 3 singletons ont été calculés avec une relative grande robustesse comprise entre 6 et 10, dont 6 GL avec la robustesse maximale.

Parmi les 69 marqueurs liés, 66 marqueurs ont finalement été positionnés. Les 3 autres marqueurs ont été éliminés car ils étaient seuls sur un GL (singletons).

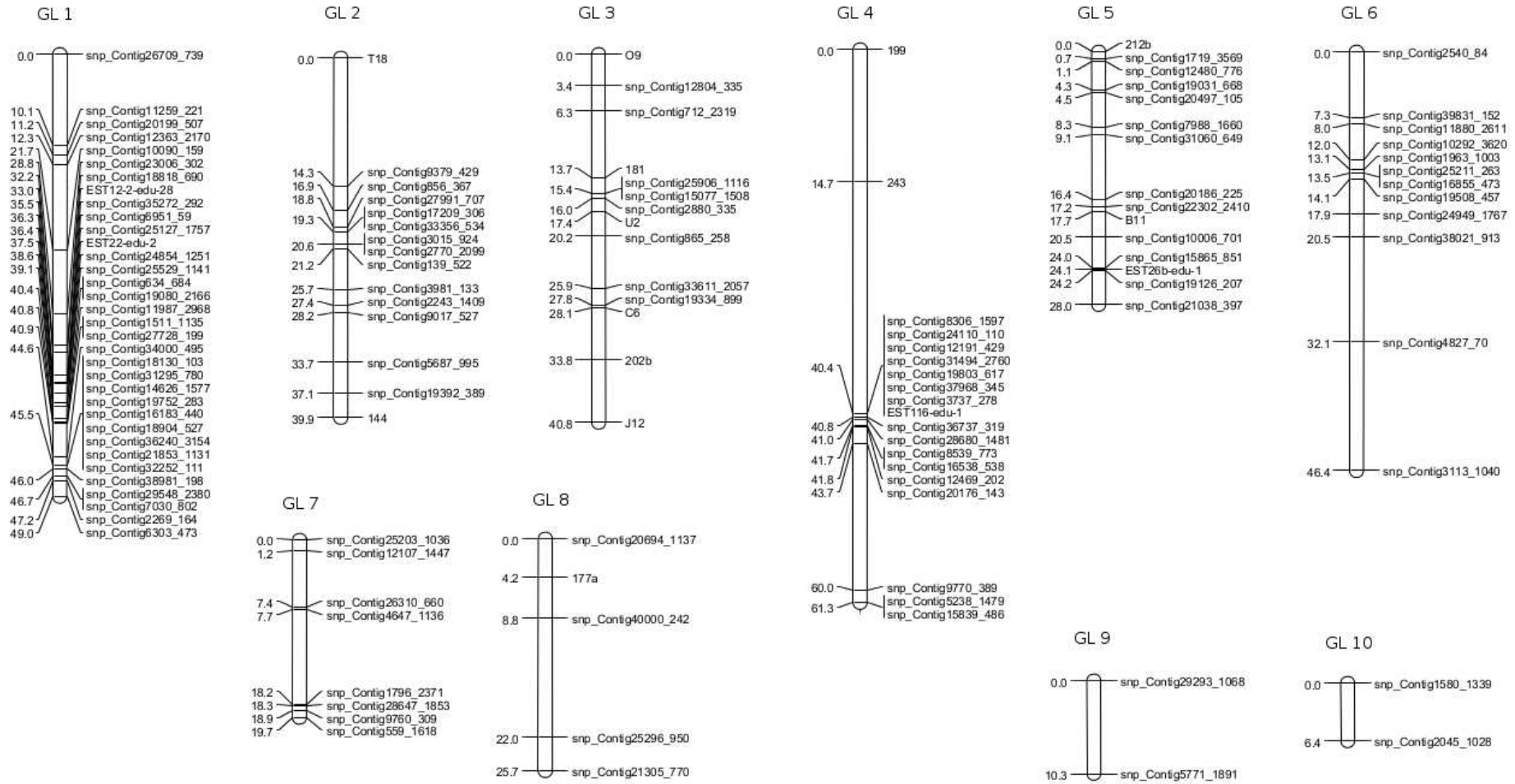
Finalement, 6 GL ont été identifiés, à raison de 2 à 33 marqueurs sur chaque GL, pour une longueur totale de 142,65 cM. Selon la formule de [Chakravarti et al. \(1991\)](#), cela équivaut à une taille théorique du génome estimée à 189,83 cM et à une représentation de 75,15 % du génome.

L'intervalle moyen entre les marqueurs positionnés sur un même GL est relativement faible, avec des valeurs moyennes comprises entre 1,48 et 7,23 cM. L'intervalle moyen de l'ensemble des marqueurs positionnés sur la carte de liaison est de 3,92 cM. Étant donné que plusieurs marqueurs présentent un taux nul de recombinaison, si on considère uniquement un marqueur pour chacune des 53 positions sur la carte, l'intervalle moyen est de 4,11 cM.

**Table 15** – Caractéristiques de la carte de liaison de la famille 09.09 obtenue à partir du génotypage de 69 marqueurs peu ou pas distordus ( $P$ -value < 0,05) sur 260 individus pour les marqueurs microsatellites et sur 125 individus pour les marqueurs SNP. Les 3 singletons ne sont pas représentés. La longueur théorique des Groupes de liaison (GL) est obtenue par la formule de [Chakravarti et al. \(1991\)](#).

Groupe de liaison (GL)	LOD score	Nb total de marqueurs (msat / SNP)	nb total de marqueurs positionnés	Longueur totale (en cM)	Intervalle moyen (en cM)	Intervalle maximal (en cM)	Longueur théorique (en cM)
GL 1	10	33 (0/33)	33	48,97	1,48	10,1	52,03
GL 2	10	9 (0/9)	9	16,76	2,1	7,3	20,95
GL 3	10	4 (1/3)	4	21,73	7,23	12,9	36,21
GL 4	10	10 (1/9)	9	38,05	4,75	12,1	47,56
GL 5	10	8 (1/7)	8	10,71	1,53	2,6	13,77
GL 6	10	2 (0/2)	2	6,44	6,44	6,44	19,31

La carte génétique de liaison obtenue avec les marqueurs peu ou pas distordus étant identique (même ordre de marqueurs) à celle obtenue avec l'ensemble des marqueurs microsatellites et SNP (distordus ou non), c'est la carte complète constituée de 10 GL et regroupant 126 marqueurs moléculaires [**Figure 35**] qui est retenue pour la détection des QTL et eQTL [cf. **Partie IV.3**].



**Figure 35** – Carte génétique de liaison de la famille 09.09 construite à partir du génotypage de 13 marqueurs microsatellites sur 260 individus et de 113 marqueurs SNP sur 125 individus.

### III.3.2.3.3 Famille 09.67

Deux cartes de liaison ont été calculées en prenant en compte la totalité des 106 marqueurs SNP d'une part, puis dans un deuxième temps en prenant en compte uniquement les 59 marqueurs mendéliens et ceux peu distordus ( $P$ -value < 0,05).

Sur la carte de liaison obtenue avec les 106 SNP, 13 groupes et 5 singletons ont été calculés avec une relative grande robustesse (LOD score) comprise entre 4 et 10 dont 12 groupes avec la robustesse maximale [Table 16].

**Table 16** – Caractéristiques de la carte de liaison de la famille 09.67 obtenue à partir du génotypage d'un total de 78 individus pour 106 marqueurs moléculaires de type SNP. Les 5 singletons ne sont pas représentés. La longueur théorique des Groupes de liaison (GL) est obtenue par la formule de [Chakravarti et al. \(1991\)](#). Sur le GL 4a et le GL 6b, respectivement 13 et 2 marqueurs sont situés exactement à la même position, traduisant un taux de recombinaison nul.

Groupe de liaison (GL)	LOD score	Nb total de marqueurs liés	Nb total de marqueurs positionnés	Longueur totale (en cM)	Intervalle moyen (en cM)	Intervalle maximum (en cM)	Longueur théorique (en cM)
GL 1	6	21	21	35,60	1,78	9,10	39,16
GL 2	4	18	18	62,70	3,69	27,10	70,08
GL 3	4	13	13	41,20	3,44	18,10	48,07
GL 4a	10	13	13	0	0	0	0
GL 4b	10	2	2	7,86	7,86	7,86	23,57
GL 5	6	11	7	19,20	3,21	10,10	25,60
GL 6a	5	4	4	26,00	8,67	18,45	43,34
GL 6b	6	2	2	0	0	0	0
GL 7	10	6	6	39,80	7,95	11,26	55,72
GL 8	10	4	3	10,75	5,37	7,45	21,49
GL 9	10	3	3	3,17	1,58	2,29	6,33
GL 10	10	2	2	3,27	3,27	3,27	9,81
S3	10	2	2	4,01	4,01	4,01	12,03

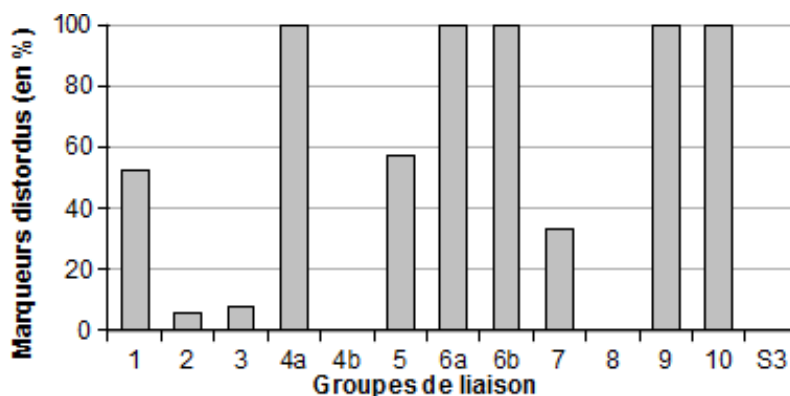
Parmi les 106 marqueurs liés, 96 marqueurs ont finalement été positionnés sur 13 groupes, à raison de 2 à 21 marqueurs SNP sur chaque groupe. Les 10 autres marqueurs ont été éliminés à cause d'une très faible liaison avec les autres marqueurs, empêchant un positionnement stable sur les GL, ou à cause d'une absence d'association (singletons). Quatre GL présentent plus de 10 SNP positionnés. Les 13 marqueurs positionnés sur le GL 4a et les 2 marqueurs sur le GL 6b sont situés exactement à la même position, traduisant une très forte liaison (respectivement LOD score = 10 et 6) et un taux de recombinaison nul.

Finalement, 10 GL (dont 2 GL constitués de 2 groupes) et 1 groupe surnuméraire ont été identifiés, pour une longueur totale de 253,55 cM. Selon la formule de [Chakravarti et al. \(1991\)](#), cela équivaut à une taille théorique du génome estimée à 355,19 cM et à une représentation de 71,38 % du génome.

L'intervalle moyen entre les marqueurs positionnés sur un même groupe est relativement faible, avec des valeurs moyennes comprises entre 0 et 8,67 cM et un intervalle maximal de 27,1 cM sur le GL 2. L'intervalle moyen de l'ensemble des marqueurs positionnés sur la carte de liaison est

de 3,91 cM. Étant donné que plusieurs marqueurs présentent un taux nul de recombinaison, si on considère uniquement un marqueur pour chacune des 71 positions sur la carte, l'intervalle moyen est de 4,51 cM.

La distorsion de ségrégation ne touche pas de la même façon tous les groupes de liaison [Figure 36]. En effet, les marqueurs distordus ont tendance à se regrouper sur les groupes de liaison 4a, 6a, 6b, 9 et 10 où 100 % des marqueurs sont distordus, et sur les GL 1 et 5 où respectivement 52 % et 57 % des marqueurs sont distordus.



**Figure 36** – Proportion de marqueurs distordus au sein de chacun des 10 groupes de liaison et du groupe surnuméraire de la carte génétique de la famille 09.67.

Sur la carte obtenue avec les 59 SNP peu ou pas distordus (Table 17), 8 groupes de liaisons et un singleton ont été calculés avec une relative grande robustesse comprise entre 3 et 10, dont 4 GL avec la robustesse maximale.

Parmi les 59 marqueurs liés, 54 marqueurs ont finalement été positionnés. Les 5 autres marqueurs ont été éliminés à cause d'une très faible liaison avec les autres marqueurs, empêchant un positionnement stable sur les GL, ou à cause d'une absence d'association (singleton).

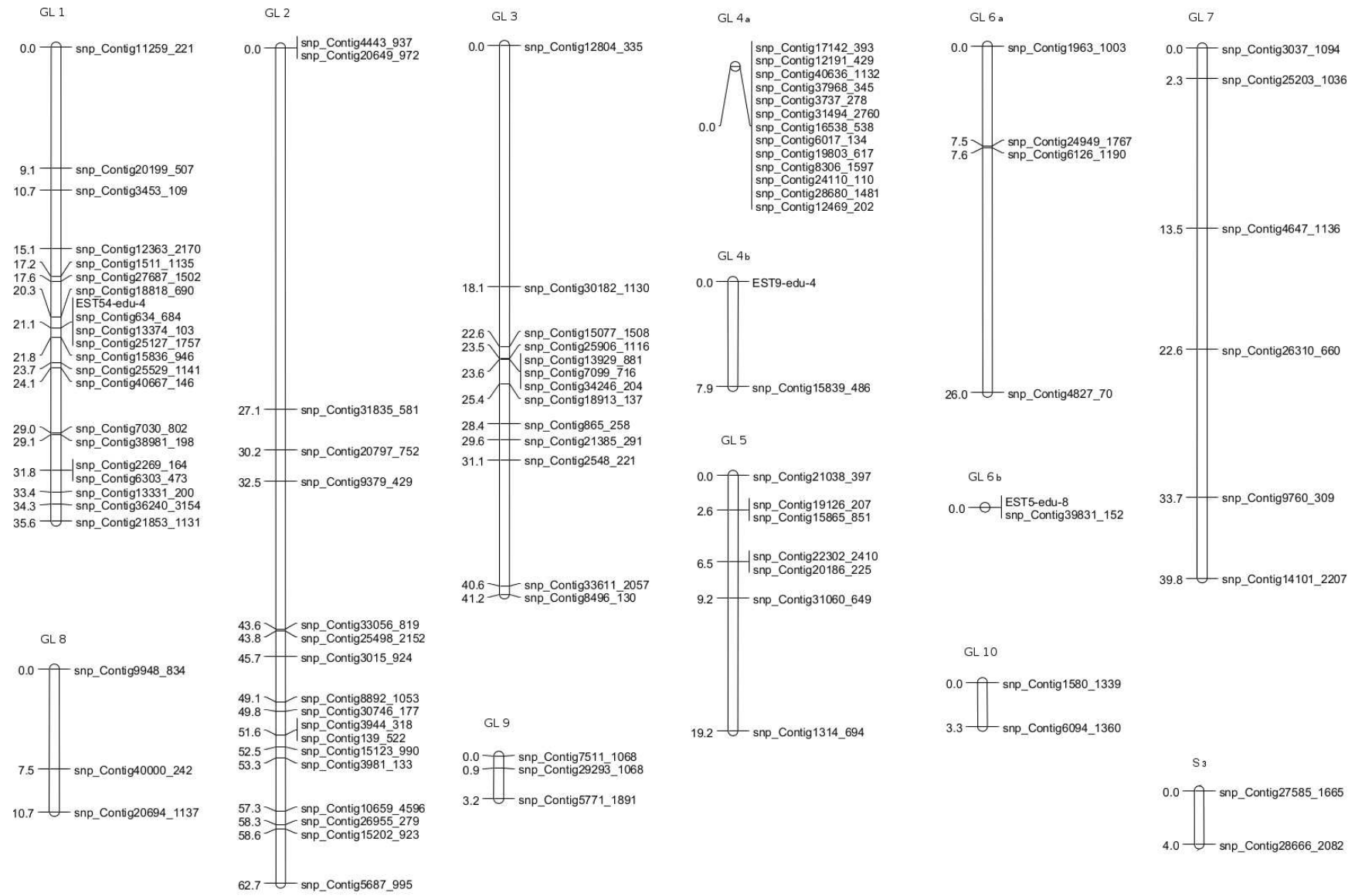
Finalement, 8 GL ont été identifiés, à raison de 2 à 17 marqueurs SNP sur chaque GL, pour une longueur totale de 212,39 cM. Selon la formule de Chakravarti *et al.* (1991), cela équivaut à une taille théorique du génome estimée à 303,24 cM et à une représentation de 70,0 % du génome.

L'intervalle moyen entre les marqueurs positionnés sur un même GL est relativement faible, avec des valeurs moyennes comprises entre 3,17 et 13,03 cM, et un intervalle maximal de 27,10 cM sur le GL 1. L'intervalle moyen de l'ensemble des marqueurs positionnés sur la carte de liaison est de 5,68 cM. Étant donné que plusieurs marqueurs présentent un taux nul de recombinaison, si on considère uniquement un marqueur pour chacune des 50 positions sur la carte, l'intervalle moyen est de 5,85 cM.

**Table 17** – Caractéristiques de la carte de liaison de la famille 09.67 obtenue à partir du génotypage d'un total de 78 individus pour 59 marqueurs moléculaires de type SNP peu ou pas distordus (P-value < 0,05). Le singleton n'est pas représenté. La longueur théorique des Groupes de liaison (GL) est obtenue par la formule de [Chakravarti et al. \(1991\)](#).

Groupe de liaison (GL)	LOD score	Nb total de marqueurs liés	Nb total de marqueurs positionnés	Longueur totale (en cM)	Intervalle moyen (en cM)	Intervalle maximum (en cM)	Longueur théorique (en cM)
GL 1	4	17	17	58,48	3,66	27,10	65,79
GL 2	3	12	12	42,78	3,89	18,10	50,56
GL 3	6	10	10	39,88	4,43	15,40	48,75
GL 4	4	7	4	9,50	3,17	5,20	15,83
GL 5	7	4	4	39,14	13,03	18,20	65,23
GL 6a	10	2	2	4,01	4,01	4,01	12,03
GL 7	10	4	3	10,75	5,35	7,50	21,49
GL 8	10	2	2	7,86	7,86	7,86	23,57

La carte génétique de liaison obtenue avec les marqueurs peu ou pas distordus étant identique (même ordre de marqueurs) à celle obtenue avec l'ensemble des marqueurs SNP (distordus ou non), c'est la carte complète constituée de 10 GL et d'un groupe surnuméraire [**Figure 37**] qui est retenue pour la détection des QTL [cf. **Partie IV.2**].



**Figure 37** – Carte génétique de liaison de la famille 09.67 construite à partir des génotypes de 78 individus sur 96 marqueurs SNP. Dix groupes de liaison (GL 1 à GL 10) et 1 groupe surnuméraire (S3) sont représentés.

### III.3.3 Discussion

#### III.3.3.1 Distorsion de ségrégation

Les marqueurs moléculaires génotypés dans le cadre de la présente étude du génome de l'huître plate européenne *Ostrea edulis* présentent une forte distorsion de ségrégation avec une proportion allant de 44,3 % à 47 % de marqueurs distordus pour chacune des trois familles étudiées. Chez la famille 09.09, sur laquelle deux types de marqueurs moléculaires ont été typés, la distorsion est répartie à hauteur de 64,3 % sur les microsatellites (9/14) et 44,8 % sur les SNP (52/116). Cette proportion est équivalente à celles obtenues sur les SNP chez les familles 09.04 (46,3 %) et 09.67 (44,3 %). D'autre part, elle est également du même ordre de grandeur que celle rencontrée chez *O. edulis* avec des marqueurs microsatellites et des allozymes (28,6 %, [Launey, 1998](#)), avec des microsatellites et des AFLP (32,8 % à 51,1 %, [Lallias, 2007](#)), ou encore rencontrée chez *C. gigas* avec des microsatellites (20,9 %, [Launey and Hedgecock, 2001](#)) ou des microsatellites ainsi que des SNP (de 21 à 51 %, [Sauvage, 2008](#)).

La distorsion de ségrégation traduit une transmission non mendélienne des allèles des individus parentaux à leur descendance. Dans la présente étude, une attention particulière a été portée sur le choix d'individus représentant l'ensemble des phénotypes de tailles disponibles dans les familles et supposés être le reflet de différences de fitness. Il est ainsi possible que, malgré les précautions prises, l'écrémage progressif des effectifs au cours de l'élevage des larves et du naissain (de 0,06 à 0,14 % de survie, cf. **Table 4**) de ces familles ait éliminé les assemblages alléliques les moins favorables, réduisant d'autant la diversité génétique des individus  $F_2$ . Ainsi, malgré l'optimisation de la représentation de la diversité des individus survivants disponibles dans les familles, tous les génotypes produits par le croisement des individus parentaux n'ont pas été représentés. La distorsion de ségrégation ainsi observée peut refléter le phénomène de sélection qui s'est opéré sur les individus au cours de leur première année de croissance. En effet, ce phénomène, connu sous le nom de fardeau génétique (*genetic load*, en anglais), a déjà été mis en évidence lors du développement des larves et du naissain d'huîtres (ex. : [Bierne et al., 1998](#); [Launey and Hedgecock, 2001](#)). Les animaux portant les mutations délétères récessives liées aux gènes cartographiés sont alors éliminés dès les premiers stades de développement, modifiant ainsi la fréquence des génotypes.

D'autre part, dans la présente étude, les marqueurs distordus ne sont pas distribués aléatoirement à travers les cartes génétiques de liaison. En effet, chez chacune des trois familles, respectivement 74,5 %, 71,7 % et 55,8 % des marqueurs distordus sont cartographiés sur 5 groupes de marqueurs liés, alors que 5 autres groupes présentent de 0 % à 25 % de marqueurs distordus. Cette répartition suggère que, sur les groupes à forte densité de marqueurs distordus, ces marqueurs sont probablement au voisinage de gènes qui ont été sous l'effet de la sélection. En effet, cette distribution non aléatoire a également été observée chez *C. virginica* ([Yu and Guo, 2003](#)), *C. gigas* ([Li and Guo, 2004](#)) et chez *O. edulis* ([Lallias et al., 2009a](#)) où elle a été assimilée à la cartographie de potentiels gènes délétères.



Par ailleurs, la comparaison entre les cartes génétiques qui sera faite dans la partie suivante devrait permettre de vérifier si les marqueurs distordus sont distribués sur les mêmes groupes de liaison.

### III.3.3.2 Cartographie génétique comparée

Dans le cadre de la présente étude, trois cartes génétiques de liaison ont été construites par la méthode de Kosambi (1944), pour trois familles ségrégeantes différentes.

La comparaison de la distribution des marqueurs moléculaires au sein des groupes de liaison, entre les cartes des trois familles, a permis d'identifier un total de huit groupes de liaison homologues entre toutes les familles ainsi que deux autres groupes uniquement homologues entre les familles 09.09 et 09.67 [Table 18]. Ces dix groupes, homologues à au moins deux familles, correspondent au nombre haploïde de chromosomes chez l'huître plate européenne (Thiriot-Quévieux and Ayrault, 1982).

**Table 18** – Correspondances entre les cartes génétiques de liaison construites chez les familles 09.04, 09.09 et 09.67, par la méthode de Kosambi (1944). Seuls les marqueurs SNP sont considérés. Le nombre de marqueurs communs entre les trois cartes considère les marqueurs liés, qu'ils soient positionnés ou non. Les groupes de liaison (GL) sans homologie sont indiqués en bleu et considérés comme des groupes surnuméraires (S). \* : GL avec plus de 50 % de marqueurs distordus; \*\* : GL avec 100 % de marqueurs distordus.

	09.04	09.09	09.67
<b>Nombre total de marqueurs SNP cartographiés</b>	117	113	96
<b>Nombre total de marqueurs exclusifs</b>	26	23	26
<b>Nombre de GL communs avec au moins une autre famille</b>	8	10	10
<b>Nombre de groupe(s) surnuméraire(s)</b>	2	0	1
<b>Nombre de marqueurs communs</b>	<b>Correspondances entre GL</b>		
10	GL 1*	GL 1	GL 1*
4	GL 2	GL 2	GL 2
1	GL 3*	GL 3*	GL 3
9	GL 4a** & GL 4b*	GL 4**	GL 4a** & GL 4b
5	GL 5a & GL 5b	GL 5	GL 5*
2	GL 6	GL 6	GL 6a** + GL 6b**
3	GL 7*	GL 7**	GL 7
3	GL 8**	GL 8	GL 8
2		GL 9**	GL 9**
1		GL 10	GL 10**
	S1		
	S2**		
			S3

Les trois groupes de liaison ne présentant pas d'homologie chez au moins une autre famille (2 groupes pour la famille 09.04 et 1 groupe pour 09.67), sont des doubletons (deux marqueurs

liés). Ces groupes sont considérés surnuméraires par rapport au nombre de groupes attendus chez *Ostrea edulis*. La distinction de groupes de liaison surnuméraires et la faible taille de certaines associations ( $< 4$  cM) suggèrent qu'ils puissent être associés à un ou plusieurs des dix chromosomes et, qu'avec l'ajout d'autres marqueurs, ils puissent se regrouper.

Pour la famille 09.04, huit groupes de liaison et deux groupes surnuméraires ont été cartographiés à partir de 117 marqueurs SNP génotypés sur 115 individus de génération  $F_2$  et 2 individus de génération  $F_1$ . Pour la famille 09.09, dix groupes de liaison ont été cartographiés à partir de 13 microsatellites typés sur 260 individus et de 113 SNP typés sur 125 individus de génération  $F_2$  et 2 individus de génération  $F_1$ . Pour la famille 09.67, dix groupes de liaison et un groupe surnuméraire ont été cartographiés à partir de 96 marqueurs SNP génotypés sur 78 individus de génération  $F_2$  et 2 individus de génération  $F_1$ .

Les trois cartes de liaison construites possèdent 37 marqueurs communs. Ces marqueurs communs représentent 31,6 % des marqueurs cartographiés chez la famille 09.04, 29,4 % des marqueurs de la famille 09.09, et 38,5 % des marqueurs de la famille 09.67. Par ailleurs, 26 marqueurs (22, 2 %) ségrègent uniquement chez la première famille, 36 marqueurs (28,6 %, dont 23 SNP) uniquement chez la deuxième famille et 26 marqueurs (27,1 %) uniquement chez la troisième famille. Au total, 185 SNP sur les 384 génotypés (48,18 %) différents sont informatifs chez au moins une des trois familles.

Au sein des groupes homologues, l'ordre des marqueurs cartographiés est relativement conservé. Cependant, des variations existent, illustrant la différence des taux de recombinaison des marqueurs au sein de chaque famille.

Par ailleurs, exceptés pour les groupes homologues correspondant au GL 2 (0-25 % de marqueurs distordus) d'une part, et au GL 4a chez les familles 09.04 et 09.67 ainsi qu'au GL 4 chez 09.09 (100 % de distorsion) d'autre part, les groupes de liaison homologues des différentes familles ne présentent pas une distribution claire de la distorsion de ségrégation. Cette absence de similitude entre les autres GL reflète la proximité de gènes délétères différents entre les trois familles, malgré des conditions de vie tout à fait similaires.

Les trois cartes de liaison construites dans le cadre de cette étude se caractérisent par une bonne couverture du génome, respectivement 78,9 %, 79,2 % et 71,4 %, et par de faibles intervalles entre les positions (moyennes respectives de 3,51 cM, 4,84 cM et 4,51 cM). Néanmoins, la taille estimée du génome de *O. edulis* est plus faible (respectivement 348,65 cM, 413,89 cM et 355,19 cM) que celle observée dans de précédentes études, de l'ordre de 553,37 cM à 575,8 cM (Lallias, 2007; Lallias *et al.*, 2009a), pour un nombre de marqueurs sensiblement équivalent (98 à 127). Ceci peut en partie s'expliquer par la différence de marqueurs moléculaires utilisés. En effet, dans la présente étude et pour chacune des trois familles, nous avons utilisé des marqueurs SNP (co-dominants), ainsi que des microsatellites (co-dominants) pour la famille 09.09. Lallias et collaborateurs ont quant à eux utilisés des marqueurs AFLP (dominants) et des marqueurs

microsatellites (co-dominants). Les marqueurs dominants tels que les AFLP ne permettent pas la distinction entre l'hétérozygotie et l'homozygotie dominante. Par conséquent, l'état génomique est parfois masqué et il y a donc moins d'événements de recombinaison observables entre marqueurs adjacents ; l'information déduite est alors moins importante (Liu, 1998). D'autre part, les marqueurs bi-alléliques tels que les SNP ou les AFLP sont moins polymorphes que les microsatellites, et sont donc moins informatifs (Kruglyak, 1997). Par conséquent, les cartes génétiques ainsi construites sont moins précises (Leal, 2003; Schlotterer, 2004). Malgré ce défaut d'information et de précision, l'utilisation de marqueurs AFLP par Lallias *et al.* (2009a) a permis d'obtenir une meilleure couverture du génome entier de *O. edulis* que l'utilisation des marqueurs SNP cartographiés dans la présente étude. L'avantage des SNP réside dans le fait qu'ils sont développés sur des gènes cibles (connus ou accessibles), rendant ainsi possible la comparaison avec la carte d'autres espèces.

Ainsi, il est intéressant de pouvoir combiner les trois types de marqueurs (AFLP, microsatellites, SNP) chez une même famille afin d'augmenter la précision de la cartographie, ainsi que la couverture du génome et la densité en marqueurs sur la carte de liaison. Ceci devrait également permettre d'associer les groupes de liaison surnuméraires aux groupes de liaison homologues entre les familles.

D'autre part, la construction des trois cartes génétiques de liaison de la présente étude s'intègre dans le contexte de la recherche de QTL liés à la résistance ou la survie à la bonamiose. Dans ce contexte, il est également important de pouvoir comparer les résultats de la présente étude avec les QTL déjà obtenus dans des conditions expérimentales similaires (Lallias *et al.*, 2009a). Pour que la comparaison soit possible, il est nécessaire que les cartes de liaison, sur lesquelles des QTL ont été cartographiés, possèdent des marqueurs communs. Pour cela, deux options sont possibles : 1- typer les marqueurs AFLP et/ou microsatellites sur l'une des trois familles étudiées ici ; 2- typer les marqueurs SNP sur la famille dont les données sont publiées. Étant donné que du matériel biologique de la famille étudiée par Lallias et collaborateurs était disponible et que le plan de charge pour le génotypage des SNP n'était pas complet, nous avons choisi la deuxième option.

Ainsi, les 384 marqueurs SNP utilisés dans la présente étude ont également été génotypés chez 96 individus (92 individus  $F_2$ , 2  $F_1$  et 2  $F_0$ ) de la famille OE. $F_2$ .05.04 (abrégée 05.04) utilisée par Lallias *et al.* (2009a). Étant donné que les marqueurs AFLP, principalement utilisés pour construire la carte à compléter, ne ségrègent pour la plupart que chez un seul parent  $F_1$ , une carte de liaison avait été construite pour chacun des deux parents (Lallias *et al.*, 2009a). Le choix de la carte à compléter s'est alors porté sur le parent 410-8, pour lequel, sur 4 groupes de liaison différents, davantage de marqueurs ( $n = 12$ ) ont été identifiés associés à la résistance ou la survie à la bonamiose (Lallias *et al.*, 2009a).

Chez cette famille, 120 marqueurs SNP se sont révélés informatifs et ont été combinés à 105 AFLP et 17 microsatellites précédemment génotypés chez le parent 410-8 (Lallias, comm. pers.), pour

la construction de la carte de liaison. Parmi 210 marqueurs liés et 32 singletons, 185 marqueurs (66 AFLP, 16 microsatellites et 103 SNP) ont été positionnés sur la carte du parent 410-8. Un total de 10 groupes de liaison, dont 1 doubleton, (LOD-scores > 4) ont été cartographiés selon la méthode de Kosambi (1944) pour une longueur totale de la carte de 392,5 cM [Table 19; Figure 38]. Selon la formule de Chakravarti *et al.* (1991), cela équivaut à une taille théorique du génome estimée à 469,81 cM, et à une représentation de 83,5 % du génome.

**Table 19** – Caractéristiques de la carte de liaison du parent 410\_8 de la famille 05.04 obtenue à partir des génotypes de 92 individus sur 66 marqueurs AFLP et 16 microsatellites, auxquels 103 SNP de la présente étude ont été combinés. La numérotation des groupes de liaison (GL) reprend celle des familles utilisées dans la présente étude pour les GL homologues (GL 1 à 8 et S2); le GL 9 est absent. Le GL 10 s'associant sur le GL 8 chez cette famille, une nouvelle association est nommée GL 10\_2. La longueur théorique des Groupes de liaison (GL) est obtenue par la formule de Chakravarti *et al.* (1991).

Groupe de liaison (GL)	Nb total de marqueurs liés	Nb de marqueurs positionnés				Longueur totale (en cM)	Intervalle moyen (en cM)	Intervalle maximal (en cM)	Longueur théorique (cM)
		Total	AFLP	Microsatellites	SNP				
GL 1	45	45	16	3	26	42	0,95	9,9	43,9
GL 2	17	12	2	0	10	37,3	3,39	15,7	44,1
GL 3	27	23	2	5	16	61,9	2,81	28,6	67,5
GL 4	17	3	0	1	2	36,2	18,10	23,8	72,4
GL 5	28	28	9	5	14	33,3	1,23	4,9	35,8
GL 6	21	21	6	1	14	46,4	2,32	6,7	51,0
GL 7	30	29	20	1	8	66,7	2,38	10,9	71,5
GL 8	18	17	7	0	10	56,2	3,51	12,6	63,2
GL 9	0	0				0	0	0	0
GL 10_2	5	5	4	0	1	11,4	2,85	6,9	17,1
S2	2	2	0	0	2	1,1	1,1	1,1	3,3

La taille estimée du génome, obtenue à partir de la carte génétique de liaison regroupant à la fois les marqueurs AFLP, microsatellites et SNP (carte nommée OE.F2.05.04\_2 et abrégée 05.04\_2), est plus petite (469,81 cM) que celle estimée à partir des AFLP et microsatellites seuls (565 cM, carte re-nommée OE.F2.05.04\_1 et abrégée 05.04\_1). Elle reste cependant proche de la taille estimée du génome de l'huître creuse *C. virginica* (500- 650 cM, Yu and Guo, 2003), un autre bivalve qui présente le même nombre haploïde de chromosomes (N = 10, Longwell and Stiles, 1973). La diminution de la taille de la carte de liaison de *O. edulis* observée suite à l'augmentation de la densité en marqueurs n'est pas une exception. En effet, ce phénomène a notamment été observé chez *C. virginica*, où la taille de la carte de liaison est passée respectivement de 858,0- 1295,9 cM à 464,6- 820,8 cM. Chez cette espèce, l'augmentation du nombre de marqueurs (de 84- 114 à 145- 149) a également permis de diviser par deux la taille moyenne des intervalles de la carte, ceux-ci passant alors de 6,3- 12,6 cM (Yu and Guo, 2003) à 3,1- 5,7 cM (Yu and Guo, 2006). Comme chez *C. virginica*, l'augmentation de 98 à 185 marqueurs, sur la carte composée des 3 types de marqueurs, a permis de réduire l'intervalle moyen chez *O. edulis* de 4,98 à 2,28 cM, et ainsi d'affiner la précision de la carte de liaison.

Néanmoins, lorsque l'on compare les cartes génétiques de liaison construites chez les trois familles de *O. edulis* (09.04, 09.09 et 09.67), il n'y a pas de corrélation entre le nombre de marqueurs

positionnés sur les cartes et la taille des intervalles entre les positions (Test de Spearman,  $S = 44$ ;  $p$ -value = 0,66). Cependant, il semble y avoir une influence de la distorsion des marqueurs sur la taille des cartes. Ainsi, le nombre total de marqueurs typés et positionnés est positivement corrélé à la taille des cartes de liaison (Test de Pearson,  $cor = 0,887$ ;  $t = 3,85$ ;  $df = 4$ ;  $p$ -value < 0,05). Alors qu'au contraire, le nombre de marqueurs peu ou pas distordus a tendance à être négativement corrélé à la taille des cartes qu'ils ont permis de construire (Test de Pearson,  $cor = -0,995$ ;  $t = -10,53$ ;  $df = 1$ ;  $p$ -value = 0,06). Par conséquent, il semblerait que les marqueurs fortement distordus aient plutôt tendance à sur-estimer les tailles, probablement du fait d'un manque d'information. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, un marqueur fortement distordu chez une famille ne l'est pas forcément chez une autre famille [cf. **Table 18**]. Ainsi, malgré la tendance à une sur-estimation, ces marqueurs doivent être conservés pour affiner les comparaisons entre cartes. De plus, étant donné qu'ils sont additionnés de marqueurs peu distordus, les estimations de tailles de carte restent sensiblement dans la même gamme.

Avec des intervalles moyens compris entre 0,95 et 2,32 cM et des intervalles maximaux compris entre 5 et 10 cM, pour plus de 20 marqueurs cartographiés chacun, les GL 1, 5 et 6 de la carte complétée (05.04\_2) présentent une bonne résolution. Par opposition, il semble nécessaire de fournir un effort particulier pour ajouter encore des marqueurs sur les GL 3 et 4 pour lesquels des intervalles maximaux supérieurs à 20 cM perdurent, et pour les GL 10\_2 et S2 pour lesquels très peu de marqueurs ont encore été associés.

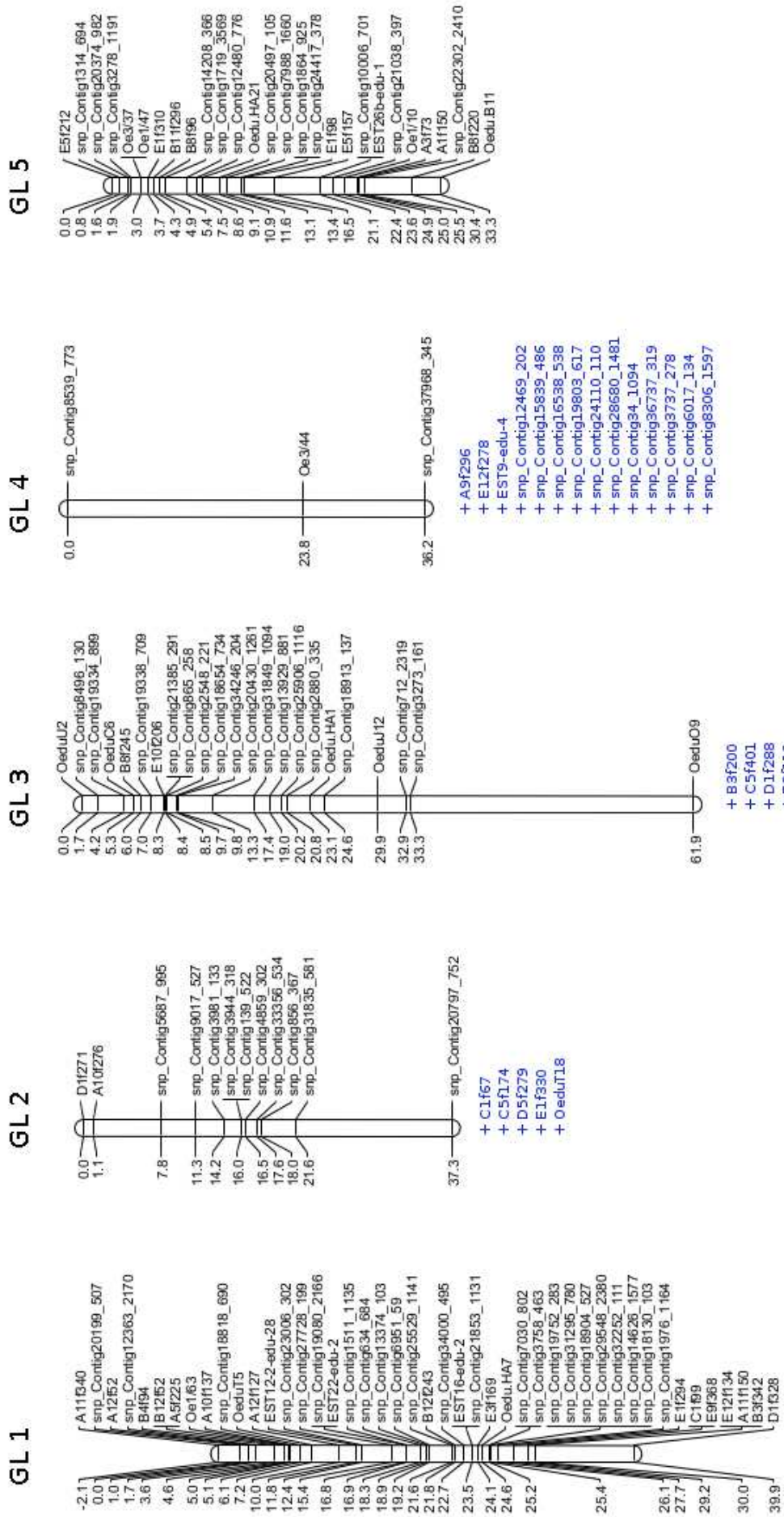
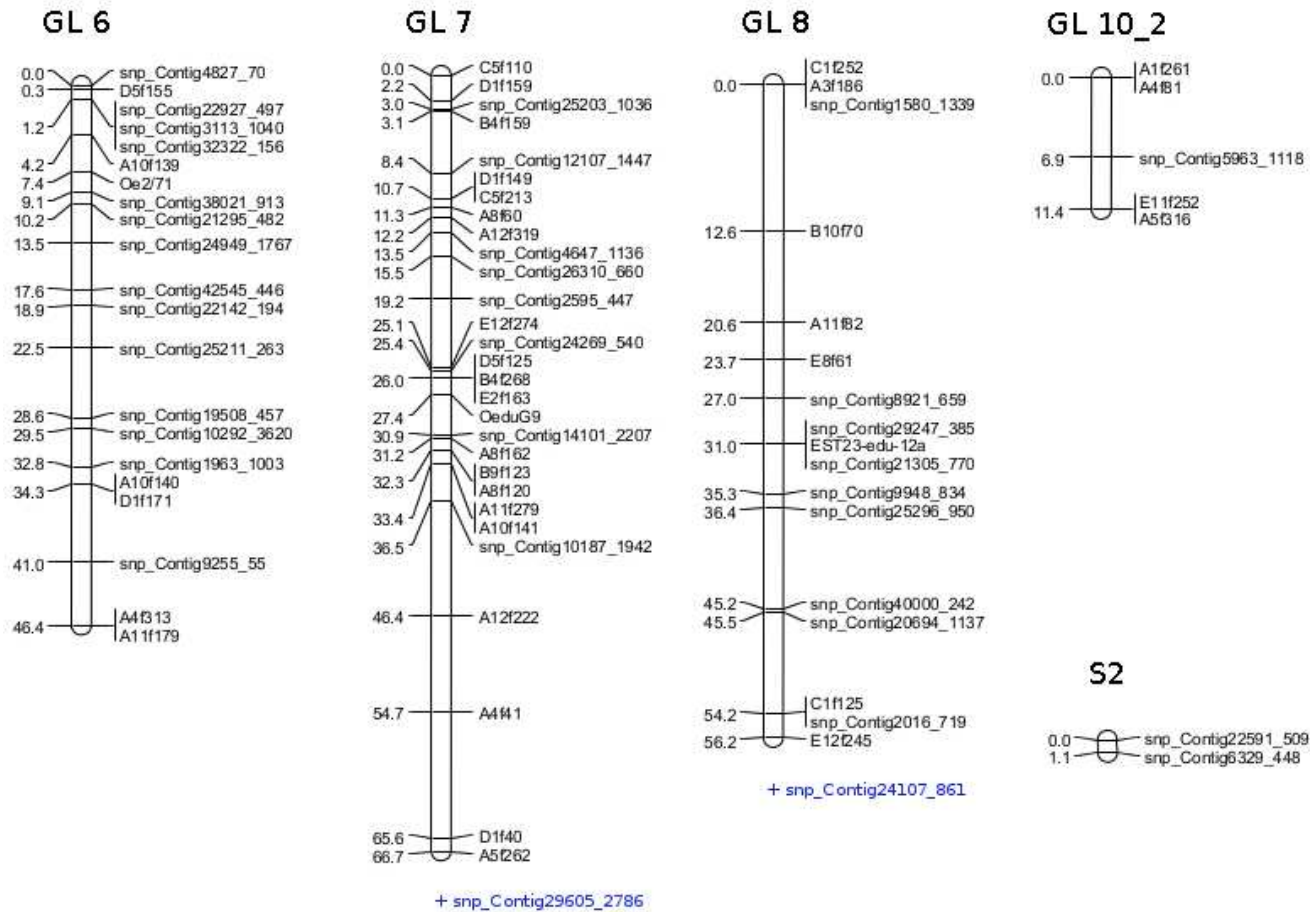


Figure 38 - Continue.



**Figure 38** – Carte génétique de liaison du parent 410.8 de la famille 05.04.2 construite par la méthode de [Kosambi \(1944\)](#) à partir des génotypes de 92 individus sur 66 marqueurs AFLP et 16 microsatellites (pour explication des noms, voir [Lallias et al., 2009a](#)), auxquels 103 SNP de la présente étude ont été combinés. La numérotation des groupes de liaison (GL) reprend celle des familles utilisées dans la présente étude pour les GL homologues (GL 1 à 8 et S2) ; le GL 9 est absent. Le GL 10 s’associant sur le GL 8 chez cette famille, une nouvelle association est nommée GL 10.2. Les marqueurs sont indiqués à droite des GL, et leur position absolue (en cM) à gauche de ceux-ci. Les marqueurs indiqués en **bleu**, en-dessous des GL 2, 3, 4, 7 et 8 sont les marqueurs liés aux GL ci-avant nommés (LOD scores > 4) mais qui n’ont pu être cartographiés. Ils sont donnés à titre indicatif pour faciliter les comparaisons avec d’autres cartes de liaison.

Les cartes de liaison obtenues chez les familles 05.04 (Lallias *et al.*, 2009a, et 05.04\_1);, 09.04 (présente étude), 09.09 (présente étude) et 09.67 (présente étude) ont ensuite été comparées à la carte de liaison complétée (05.04\_2) [Table 20]. 80,3 % des marqueurs typés chez 09.04, 59,5 % de ceux typés chez 09.09 et 53,1 % de ceux typés chez 09.67 sont communs (marqueurs liés, positionnés ou non) à la carte de liaison 05.04\_2. Avec l'augmentation du nombre de marqueurs, de nouvelles associations sont apparues pour des microsatellites ( $n = 3$ ) et des AFLP ( $n = 11$ ) qui n'avaient précédemment pas pu être cartographiés, alors que d'autres, probablement peu robustes, ont disparus ( $n = 19$ ). Au total, ce sont 317 marqueurs qui ont été cartographiés sur au moins l'une des 4 cartes génétiques de liaison comparées dans la présente étude. Ces 317 marqueurs informatifs chez *O. edulis* regroupent 198 SNP, 24 microsatellites et 95 AFLP. Néanmoins, tous ces marqueurs ne ségrègent pas simultanément chez toutes les familles étudiées.

**Table 20** – Correspondances entre la carte génétique de liaison obtenue chez *O. edulis* à partir de marqueurs AFLP et microsatellites (05.04\_1, Lallias *et al.*, 2009a), de la carte complétée avec les marqueurs SNP (05.04\_2) et des cartes des familles 09.04, 09.09 et 09.67. Le nombre de marqueurs communs avec la carte complète (marqueurs liés, positionnés ou non) est indiqué entre parenthèses. Les groupes de liaison (GL) sans homologie sont indiqués en bleu.

	05.04_1 (Lallias <i>et al.</i> , 2009a)	05.04_2	09.04	09.09	09.67
<b>Nombre total de marqueurs cartographiés</b>	98	185	117	128	96
Dont : SNP	0	103/117 liés	117 (94)	113 (89)	96 (51)
AFLP	84 (68)	68/76 liés	0	0	0
microsatellites	14 (14)	18/18 liés	0	13 (8)	0
<b>Nombre de GL communs avec au moins une autre famille</b>	9	10	9	9	9
<b>Nombre de groupe(s) supplémentaire(s)</b>	1	1	2	0	1
<b>Correspondances entre GL</b>					
	LG8_410_8 (17)	GL 1	GL 1 (23)	GL 1 (22)	GL 1 (9)
	LG8_410_8 (2)	GL 2	GL 2 (10)	GL 2 (8)	GL 2 (5)
	LG2_410_8 (9)	GL 3	GL 3 (12)	GL 3 (9)	GL 3 (8)
	LG5_410_8 (3)	GL 4	GL 4a & GL 4b (14)	GL 4 (11)	GL 4a & GL 4b (11)
	LG3_410_8 (13)	GL 5	GL 5a & GL 5b (11)	GL 5 (9)	GL 5 (6)
	LG7_410_8 (8)	GL 6	GL 6 (10)	GL 6 (8)	GL 6a + GL 6b (3)
	LG1_410_8 (19)	GL 7	GL 7 (7)	GL 7 (4)	GL 7 (4)
	LG4_410_8 (7)	GL 8	GL 8 (5)	GL 8 + GL 10 (5)	GL 8 & GL 10 (5)
	LG10_410_8 (4)	GL 10_2		GL 9	GL 9
	LG9_410_8 (0)				
		S2	S1 S2 (2)		S3

Chacun des dix groupes de liaison cartographiés chez 05.04\_2 présente des homologies avec des GL sur les autres cartes. En effet, 8 GL (GL 1 à GL 8) sont homologues avec les quatre autres cartes, GL 10\_2 est homologue avec LG10\_410\_8 de 05.04\_1, et S2 est homologue avec la famille 09.04. L'absence du GL 9 identifié chez 05.04\_1 est probablement à relier avec une faible liaison des quatre marqueurs AFLP concernés; liaison qui n'a pas été maintenue avec l'augmentation du niveau de stringence à un LOD score  $> 4$  pour la cartographie.



D'autre part, la comparaison des différentes cartes de liaison a permis un nouveau regroupement de GL chez les familles 09.09 et 09.67 (GL 8 et GL 10), diminuant ainsi le nombre de groupes de liaison identifiés chez ces familles à 9, avec un groupe surnuméraire pour la famille 09.67. Il est fort probable qu'un ajout de nouveaux marqueurs permette d'identifier un dixième groupe de liaison chez la famille 09.09 et permettent également de trouver des homologies parmi les groupes qui en sont encore dépourvus.

### III.3.4 Conclusion et perspectives

La disponibilité d'une carte de référence couvrant l'ensemble du génome de l'espèce considérée est un élément fondamental dans la recherche de régions QTL impliquées dans la résistance à une maladie. Dans le cas d'une espèce non modèle, l'alternative réside dans la construction d'une carte génétique de liaison regroupant le maximum de marqueurs moléculaires possibles afin de couvrir l'ensemble du génome. Malheureusement, dans ce cas, aucune information n'est disponible sur la position des marqueurs sur chacun des chromosomes. En outre, il s'avère également nécessaire de construire au préalable les groupes de liaison spécifiques à chaque croisement étudié (Vignal *et al.*, 2002). Dans ce contexte, une nouvelle carte a été construite pour chacune des trois nouvelles familles ségrégeantes produites, dans l'objectif de rechercher des régions QTL liées à la résistance ou à la survie à une infection par *Bonamia ostreae* [cf. **Partie IV.2** et **Partie IV.3**], ou de rechercher des régions QTL et eQTL liées à la réponse à cette infection [cf. **Partie IV.4**]. Dans l'objectif de pouvoir comparer ces résultats avec les QTL déjà identifiés chez *O. edulis* vis-à-vis de la même parasitose (Lallias *et al.*, 2009a), les marqueurs SNP typés sur les trois nouvelles familles ont été ajoutés sur la carte de liaison précédemment construite par Lallias et collaborateurs.

Outre l'avantage de pouvoir effectuer des comparaisons avec les nouvelles régions cartographiées, la carte complétée devient la carte de référence pour *Ostrea edulis*. En effet, avec 185 marqueurs moléculaires (66 AFLP, 16 microsatellites et 103 SNP) cartographiés sur un ensemble de dix groupes de liaison, cette carte présente la plus importante densité de marqueurs et donc la meilleure couverture du génome obtenue chez l'huître plate européenne. Cependant, tous les marqueurs moléculaires génotypés ne ségrègent pas simultanément chez la même famille. Ainsi, la présente étude a permis d'identifier un total de 317 marqueurs moléculaires potentiellement informatifs chez l'huître plate européenne. Parmi les 384 SNP génotypés, seuls 51,6 % (N = 198) ont été identifiés informatifs. Ce résultat est très similaire à celui obtenu chez une autre espèce non modèle à l'issue de la même technologie de génotypage GoldenGate sur 384 SNP (51 %, Lepoittevin *et al.*, 2010). Ce score reste cependant faible par rapport à l'effort déployé (temps et coût). Pour augmenter encore davantage la densité en marqueurs des cartes génétiques de liaison, de nouvelles techniques de génotypage à Haut Débit, telle que la technologie RAD-Tag, pourraient être utilisées (Baird *et al.*, 2008; Pfender *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012). Il s'agirait alors de séquencer des fragments d'ADN adjacents à des sites de restriction enzymatique, puis d'hybrider ces courtes séquences sur des puces afin de génotyper en parallèle jusqu'à plusieurs milliers de sites polymorphes (Miller *et al.*, 2007).

D'autre part, en diminuant les intervalles entre les marqueurs adjacents, trois groupes de liaison de la carte complétée (05.04\_2) sont arrivés à une relative saturation, avec des intervalles similaires à ce qui peut être observé chez des espèces où plus de 500 marqueurs sont cartographiés (ex. : [Sargent \*et al.\*, 2012](#)). Cependant, malgré une bonne résolution de cette carte grâce à l'ajout des SNP, deux groupes de liaison présentent encore des intervalles maximaux supérieurs à 20 cM et deux autres sont encore trop peu cartographiés ( $\leq 5$  marqueurs). Pour combler ces lacunes, il faudrait cibler les groupes de liaison déficitaires afin de développer de nouveaux marqueurs sur ces groupes uniquement. Une méthode possible consisterait à associer la carte génétique de liaison à la carte cytogénétique de *O. edulis* constituée des 10 chromosomes ([Thiriot-Quévieux and Ayraud, 1982](#)). Il faudrait ensuite procéder à la micro-dissection des segments chromosomiques ou des chromosomes ([Engelen \*et al.\*, 1998](#); [Zhou and Hu, 2007](#)) à étudier spécifiquement. Il s'agirait alors de construire une librairie d'ADN spécifique à chacun de ces segments ou alors de marcher sur le chromosome à partir d'un point d'ancrage. En plus de compléter la carte de référence, cette technique permettrait d'identifier sur la carte physique les régions QTL identifiées et, ainsi, de cibler spécifiquement les gènes impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la parasitose. Par ailleurs, la carte génétique de liaison, ainsi complétée et associée aux distances physiques, pourrait ensuite servir de carte de référence à toutes les analyses QTL réalisées sur l'huître plate européenne. De plus, la disponibilité prochaine de la séquence complète du génome de l'huître creuse *Crassostrea gigas* ([Hedgecock \*et al.\*, 2005](#)) devrait également permettre de connaître l'enchaînement des gènes dans le génome. Cette information devrait notamment nous permettre d'affiner la localisation des régions génomiques liées à la réponse à la bonamiose, en procédant par comparaison entre les cartes génétiques de liaison des deux espèces.

## Quatrième partie

# Caractérisation phénotypique et génétique en réponse à une infection expérimentale avec le parasite *Bonamia ostreae*

## IV.1 Présentation des expérimentations

Cette quatrième partie présente successivement trois expérimentations d'infection d'huîtres plates avec le parasite *Bonamia ostreae*. Ces trois expérimentations ont permis de caractériser les phénotypes de réponse à la bonamiose à trois niveaux d'étude : 1- au niveau inter-familial ; 2- au niveau intra-familial ; 3- au niveau populationnel. Les deux premières expériences ont été réalisées sur des huîtres de même génération ( $F_2$ ), produites par croisements bi-parentaux de deux huîtres ( $F_1$ ), elles-mêmes issues du croisement d'une lignée sélectionnée pour la survie vis-à-vis de la bonamiose et d'un individu sauvage ( $F_0$ ). La troisième expérience a, quant-à elle, été réalisée sur des huîtres provenant de plusieurs populations naturelles génétiquement et écologiquement distinctes.

La première expérience correspond à la caractérisation des phénotypes de réponse à la bonamiose au niveau inter-familial. Pour chaque famille testée, il s'agissait d'identifier des régions du génome liées à la résistance ou à la sensibilité de l'hôte vis-à-vis du parasite. Pour ce faire, trois familles différentes mais de même génération ont simultanément été testées lors d'une expérience par cohabitation avec des huîtres sur-infectées expérimentalement avec le parasite. L'objectif était alors de pouvoir comparer les QTL cartographiés chez chaque famille afin d'identifier une ou plusieurs régions QTL communes entre elles. Il s'agissait également de comparer ces QTL avec ceux obtenus par [Lallias \*et al.\* \(2009a\)](#), grâce à l'ajout des nouveaux marqueurs moléculaires, utilisés chez les nouvelles familles, sur la carte de liaison obtenue précédemment par Lallias et collaborateurs [cf. **Partie III.3.2**].

La deuxième expérience correspond à la caractérisation des phénotypes de réponse à la bonamiose au niveau intra-familial. Chez une des familles ségrégeantes, il s'agissait d'identifier des régions du génome liées à des réponses cellulaires (détection de QTL) et moléculaires (détection d'eQTL) déjà identifiées comme potentiellement impliquées dans la réponse à la bonamiose ([Morga \*et al.\*, 2009, 2011a,b, 2012](#)). Pour ce faire, des huîtres de même origine génétique et de même parcours zootechnique ont été injectées avec *B. ostreae*. À l'issue d'une expérimentation de deux mois, chaque individu testé a été caractérisé pour chacune des réponses.

La troisième expérience correspond à une étude préliminaire de la caractérisation des phé-

notypes de réponse à la bonamiose au niveau populationnel. Dans cette dernière expérience, il s'agissait d'estimer la diversité des réponses à un même épisode infectieux, chez différentes populations naturelles. Pour ce faire, des huîtres provenant de trois populations naturelles génétiquement et géographiquement distinctes ont été injectées avec *B. ostreae* ou avec de l'eau de mer. Cette expérience, prévue pour une durée d'un mois, a dû être interrompue au bout de quelques jours en raison de fortes mortalités des huîtres injectées avec la solution parasitaire. Néanmoins, la cinétique des mortalités et les réponses cellulaires et moléculaires observées à sept jours ont été étudiées pour chacune des populations.

L'originalité des présents travaux réside dans la combinaison des différentes approches moléculaires et cellulaires, génétiques et immunitaires, afin d'enrichir notre compréhension de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose.

Les réponses moléculaires (expression de 5 gènes) et cellulaires (2 activités hémocytaires) qui ont été étudiées, dans la deuxième et la troisième expérience, ont été choisies à partir des résultats obtenus dans le cadre d'études précédentes sur les interactions entre *O. edulis* et *B. ostreae* (Morga, 2010; Morga *et al.*, 2009, 2011a,b). Il s'agit des activités de production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et de phagocytose d'une part, et des gènes impliqués dans la reconnaissance du pathogène (Glectine), dans la voie classique du complément (C1q), dans la réponse oxydative (SOD cytoplasmique) et dans les mécanismes de l'apoptose (IAP, Fas ligand) d'autre part.

Pour ces expériences, deux modalités d'infection ont été mises en œuvre : 1- une infection par cohabitation d'huîtres testées avec des huîtres infectées ; 2- une infection par injection de parasites dans le muscle adducteur de l'huître.

L'infection par cohabitation mime la propagation du parasite en milieu naturel. Chez l'huître plate européenne, cette méthode d'infection a déjà été utilisée avec succès, vis-à-vis du même parasite et sur le même type de matériel biologique (Lallias *et al.*, 2008), et a conduit à l'identification de QTL (Lallias *et al.*, 2009a). Elle a ainsi été choisie pour l'expérimentation sur la diversité des QTL de réponse entre les familles.

Pour les deux autres expériences, l'infection a été mise en œuvre par injection. L'avantage de cette méthode d'infection réside dans l'uniformité de la pression parasitaire appliquée sur tous les individus à tester. En effet, contrairement à la méthode par cohabitation, cette méthode permet un contrôle dans le temps par une infection simultanée de tous les individus testés. D'autre part, il s'agit d'une infection directe de l'huître ; ce qui permet d'avoir la certitude que tous les individus reçoivent la même quantité de parasites. Les huîtres étant mises exactement dans les mêmes conditions expérimentales, la variance des phénotypes de réponse liés au mode d'infection est minimisée. Cette méthode d'infection ayant maintes fois été utilisée avec succès, par plusieurs auteurs, vis-à-vis du même parasite, elle a été privilégiée pour l'étude des réponses cellulaires et moléculaires.

## IV.2 À l'échelle inter-familiale : diversité des QTL de réponse à une infection à *Bonamia ostreae* entre familles ségrégeantes

### IV.2.1 Introduction

Afin de contribuer à une production durable de l'huître plate européenne, il s'avère nécessaire de favoriser la production de lignées d'huîtres plates potentiellement résistantes à la bonamiose. Pour cela, il s'agit de mettre en place un programme de sélection basé sur la sélection de gènes ou de régions génomiques impliquées dans le phénotype d'intérêt (Dekkers, 2004), ici la résistance à la parasitose. L'identification de ces régions génomiques d'intérêt est couramment effectuée par une approche QTL (*Quantitative Trait Loci*). Cette méthode consiste à détecter statistiquement des associations entre des marqueurs génétiques et un phénotype d'intérêt, puis à cartographier ces marqueurs sur la carte génétique de liaison propre au modèle biologique étudié.

Dans le cas de l'étude de la résistance ou de la sensibilité de l'huître plate européenne vis-à-vis du parasite *Bonamia ostreae* cinq QTL ont déjà été identifiés (Lallias *et al.*, 2009a). Cependant, ces QTL ne sont pas utilisables en l'état pour une implémentation dans un programme de sélection assistée par marqueurs (MAS). En effet, les régions génomiques identifiées contiennent plusieurs centaines de gènes et il s'avère nécessaire d'améliorer la compréhension de l'architecture génétique du caractère, et de réduire la taille des intervalles afin d'optimiser l'efficacité du programme de sélection (Spelman and van Arendonk, 1997). D'autre part, il est également nécessaire de tester d'autres fonds génétiques que celui de la famille ségrégeante utilisée pour la détection de ces premières régions d'intérêt. Ceci permettrait d'une part de confirmer la position de ces régions sur la carte génétique, mais également de détecter potentiellement de nouveaux QTL qui n'auraient pas ségrégé chez la famille étudiée par Lallias *et al.* (2009a).

Dans la présente expérience, nous nous sommes intéressés à la diversité des QTL de réponses à une même infection à *B. ostreae* chez plusieurs familles ségrégeantes. Pour ce faire, trois familles d'huîtres de génération  $F_2$  ont été placées, pendant une année, en cohabitation avec des huîtres sauvages sur-infectées expérimentalement. Les huîtres sauvages jouaient le rôle de source de parasites. Pour chaque famille testée, il s'agissait d'identifier des QTL de résistance / sensibilité à la bonamiose. Pour cela, le génotype des individus a été soit relié aux phénotypes de survie ou de mortalité, soit aux statuts infecté ou sain. Les QTL identifiés ont ensuite été positionnés sur la carte génétique de liaison, propre à la famille, construite **Partie III.3.2**.

D'autre part, les QTL identifiés chez ces familles ont également été comparés aux QTL précédemment identifiés chez une autre famille d'huîtres plates, lors d'une infection expérimentale similaire (Lallias *et al.*, 2009a). Cette dernière comparaison a été rendue possible par le typage des nouveaux marqueurs moléculaires sur les individus utilisés par Lallias et collaborateurs, en vue de compléter la précédente carte de liaison et d'obtenir des marqueurs communs avec les familles

testées dans la présente étude [cf. **Partie III.3.2**].

## IV.2.2 Matériels et méthodes

### IV.2.2.1 Carte d'identité des familles

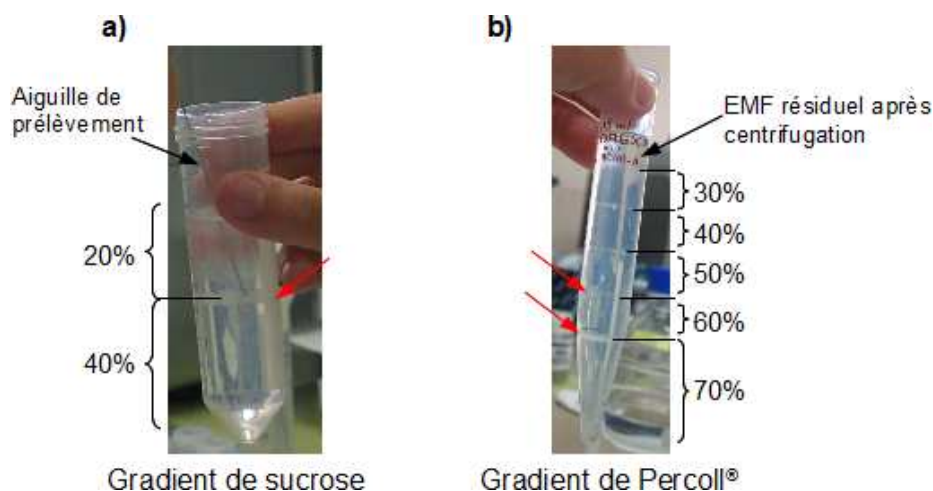
Les huîtres testées dans le cadre de cette expérimentation proviennent des familles 09.04, 09.09, 09.67 qui ont été produites à l'écloserie de La Tremblade en 2009. Il s'agit de la descendance de 2<sup>ème</sup> génération (génération  $F_2$ ) de 3 familles ségrégeantes produites par croisements bi-parentaux intra-familiaux de deux individus pleins-frères (génération  $F_1$ ). Les individus grand-parents ( $F_0$ ) proviennent soit d'une lignée sélectionnée, soit d'une lignée consanguine ayant présenté de bonnes performances de survie vis à vis de la bonamiose, soit d'un individu sauvage [cf. **Partie II.1**].

Dans la présente expérimentation, les huîtres testées âgées d'un an sont infectées par mise en contact avec des huîtres naturellement infectées et sur-infectées expérimentalement (Lallias *et al.*, 2008). Pour ce faire, 400 huîtres sauvages âgées de 3 ou 4 ans provenant de la presqu'île de Quiberon, arrivées à l'Ecloserie fin 2009, ont été sur-infectées par injection d'une suspension de *Bonamia ostreae*, puis placées dans les bacs expérimentaux au contact des huîtres à tester âgées d'un an.

### IV.2.2.2 Obtention de la suspension de *Bonamia ostreae*

Comme il n'existe aucun moyen connu de cultiver *Bonamia ostreae*, la suspension à injecter est obtenue par purification de parasites provenant de tissus infectés d'huître plate. Pour cette expérimentation, le parasite a été purifié à partir d'huîtres âgées de 3 ou 4 ans, originaires de Bretagne sud et naturellement infectées par *B. ostreae*.

La purification a été réalisée à partir des tissus de quatre huîtres fortement infectées par *B. ostreae* [Bo<sup>+++</sup>, cf. **Partie IV.2.2.4**]. Après avoir retiré le muscle adducteur, les tissus ont été broyés puis successivement filtrés sur des tamis (200  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  puis 20  $\mu\text{m}$ ). La purification, adaptée du protocole mis au point par Mialhe *et al.* (1988a), se déroulait en plusieurs étapes de filtrations et isollements sur gradients de densité successifs de sucrose et de Percoll<sup>®</sup>. Le broyat dilué a tout d'abord été distribué, au moyen d'une pompe péristaltique, sur un coussin de sucrose à 20 %. Le filtrat était ensuite distribué sur un gradient de sucrose 20 % - 40 %. L'interphase 20 % - 40 % a été récupérée à l'aide d'une seringue [**Figure 39a**] et remise en suspension, puis distribuée sur un gradient discontinu (30 % - 40 % - 50 % - 60 % - 70 %) de Percoll<sup>®</sup>. Les interphases 50 % - 60 % et 60 % - 70 % du gradient ont été prélevées [**Figure 39b**], puis distribuées sur un nouveau coussin de sucrose 20 %. Après élimination du surnageant, les cellules parasitaires purifiées ont été remises en suspension dans 1 mL d'eau de mer filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$  (EMF).



**Figure 39** – Distribution des phases des gradients de sucrose (a) et de Percoll (b) au cours de la procédure de purification des cellules parasitaires de *Bonamia ostreae*. Les interphases à prélever sont indiquées par des flèches rouges. Photos : E. Harrang.

À l'issue de la purification, un comptage sur cellule de Malassez a permis de mesurer une concentration en parasites de  $56,5 \cdot 10^6$  cellules par mL.

#### IV.2.2.3 Infection expérimentale par cohabitation

Pour effectuer l'injection intra-musculaire, les huîtres sauvages ont préalablement été anesthésiées dans un bain de chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$  ;  $\approx 50 \text{ g.L}^{-1}$ ).

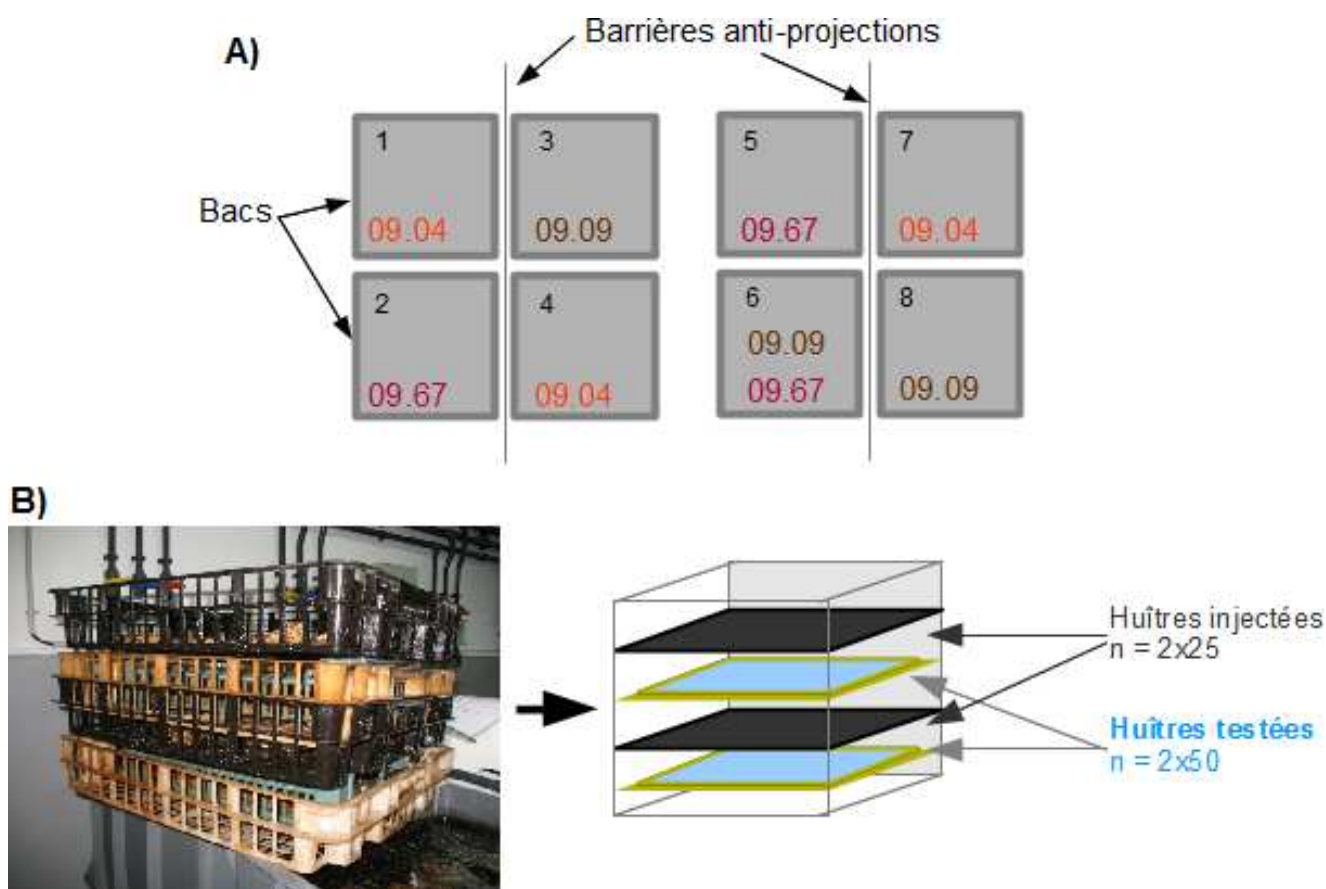
Afin d'éviter un choc osmotique, la salinité de l'eau de mer dans laquelle les huîtres étaient stabilisées a été respectée. Le  $\text{MgCl}_2$  permet l'ouverture des valves de l'huître par anesthésie du muscle adducteur [Figure 40], rendant ainsi possible l'injection intra-musculaire de la suspension parasitaire.



**Figure 40** – Huître plate anesthésiée, après un bain de chlorure de magnésium, présentant une ouverture de ses deux valves, permettant un accès au muscle adducteur pour injection intra-musculaire. Photo : E. Harrang.

Le 22 avril 2010, 112 huîtres ont reçu une injection de  $0,5 \cdot 10^6$  parasites par individu, dans  $100 \mu\text{L}$  d'eau de mer filtrée, au moyen d'une seringue de 1 mL munie d'une aiguille 23G (0,6 x 25 mm). Pour compléter le nombre d'huîtres sur-infectées, le 27 avril 2010 une nouvelle purification de *B. ostreae* a été réalisée à partir de cinq huîtres hautement infectées. Le 28 avril, 288 nouvelles huîtres sauvages ont été injectées à raison de  $1 \cdot 10^6$  parasites par individu. Cette proportion de parasites a été choisie pour l'injection puisqu'elle permet de favoriser la transmission du parasite des huîtres sur-infectées aux huîtres testées, dans des conditions expérimentales similaires (Lallias *et al.*, 2008).

Après injection, les 400 huîtres sauvages sur-infectées expérimentalement ont été réparties dans 8 bacs à raison de 50 individus par bac. Les huîtres des trois familles à tester ont alors été ajoutées. 300 huîtres de la famille 09.04, 250 huîtres de la famille 09.09 et 250 huîtres de la famille 09.67 ont ainsi été testées, à raison de 100 huîtres par bac répliquant [Figure 41A]. Chez les trois familles testées, afin d'avoir une représentation de l'ensemble des génotypes produits par les individus parentaux, les huîtres ont été choisies parmi l'ensemble des phénotypes de tailles disponibles. Afin d'optimiser l'infection expérimentale par cohabitation, les clayettes contenant les huîtres ont été disposées de façon à alterner les huîtres testées et les huîtres sauvages sur-infectées dans la colonne d'eau [Figure 41B].



**Figure 41** – Dispositif expérimental d'infection par cohabitation des 3 familles d'huîtres testées (09.04, 09.09, 09.67) par les huîtres sauvages sur-infectées par injection d'une solution purifiée de *Bonamia ostreae*. **A)** Les 3 familles à tester sont réparties dans les différents bacs à raison de 100 huîtres d'une même famille dans les bacs 1 à 5, 7 et 8 et à raison de 50 huîtres de la famille 09.09 et 50 de la famille 09.67 dans le bac 6. Des barrières anti-projection sont installées entre les bacs afin de limiter les projections. **B)** Chaque bac expérimental contient 4 clayettes. Les clayettes contenant les huîtres injectées et celles contenant les huîtres testées sont alternées de façon à optimiser la cohabitation. Photo : E. Harrang.

Pendant toute la durée de l'expérience, les 8 bacs d'expérience de 150 L ont été alimentés en eau de mer, en continu et à faible débit ( $60 \text{ L.h}^{-1}$ ). Un bulleur assurait l'oxygénation de l'eau. Les variations de température ont été enregistrées au moyen de thermo-boutons. Le nettoyage des bacs a été effectué une fois par semaine.



#### IV.2.2.4 Suivi de l'infection

Afin de suivre l'évolution de l'infection au sein des bacs expérimentaux, du 22 avril 2010 au 22 juillet 2011, les huîtres mortes ont été retirées des bacs quotidiennement et analysées. Pour équilibrer la pression parasitaire, et ce malgré les mortalités, les effectifs des huîtres sauvages surinfectées expérimentalement par injection ont systématiquement été ré-équilibrés entre les bacs.

Chaque jour, pour détecter les huîtres mortes, il était nécessaire de retirer les clayettes des bacs expérimentaux pour les maintenir hors d'eau une dizaine de minutes afin que les deux valves des huîtres mortes se décollent. Les huîtres mortes des 3 familles testées ont été individuellement collectées et congelées pour une analyse ultérieure. *A contrario*, le statut sanitaire des individus sauvages a été directement étudié par une empreinte de tissu branchial observée ensuite au microscope photonique. Le week-end, les huîtres mortes étaient conservées au frigo, pour analyse le lundi suivant.

Une fois prélevé, le morceau de tissu était ensuite séché sur du papier absorbant, puis appliqué plusieurs fois sur une lame de microscope. L'empreinte était ensuite séchée à l'air quelques instants puis, la lame a été successivement trempée dans un bain d'éthanol pour fixation puis dans 2 solutions colorées Hemacolor<sup>®</sup>. Après séchage à l'air, de l'huile à immersion était déposée sur l'empreinte pour observation au microscope photonique. Plusieurs intensités d'infection ont été distinguées (Hervio *et al.*, 1995) :

- Résultat négatif ( $Bo^-$ ) : absence de détection de parasite après 5 min d'observation ;
- Faible infection ( $Bo^+$ ) : observation d'environ 10 parasites en 5 min d'observation ;
- Infection modérée ( $Bo^{++}$ ) : observation de quelques parasites par champs d'observation ;
- Forte infection ( $Bo^{+++}$ ) : observation de nombreux parasites par champs d'observation.

Des courbes de mortalités cumulées et d'évolution de la fréquence de détection du parasite ont été construites pour les huîtres testées et les huîtres injectées. La comparaison des taux moyen de mortalités entre les trois familles testées, à l'issue de l'expérimentation, a été effectuée par le test H de Kruskal-Wallis. Pour chaque famille, le test du  $\chi^2$  d'homogénéité a ensuite été utilisé pour tester une éventuelle différence du taux de mortalités dans chacune des phase de l'expérience. Pour chacun des tests statistiques, la significativité a été établie pour une valeur de  $p < 0,05$ . Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R project version 2.1.4.1. (R Development Core Team, 2011 ; <http://www.r-project.org/>).

#### IV.2.2.5 Prélèvements de tissus et extraction ADN

À l'issue de l'expérimentation, les huîtres survivantes des familles testées ont été sacrifiées. Des biopsies ont alors été effectuées et un échantillon de tissu branchial a été prélevé et stocké dans l'éthanol 70°. Les tubes de prélèvements ont été numérotés avec le nom de la famille et un numéro permettant d'identifier chaque individu au cours de l'analyse.

Pour chacune des familles testées, l'ADN des individus morts au cours de l'expérimentation et des individus sacrifiés à l'issue de celle-ci, a été extrait suivant le protocole QIAamp<sup>®</sup> DNA mini-kit (Qiagen), à partir d'un échantillon d'environ 20 mg de tissu. La qualité de l'extrait et sa concentration en ADN ont été mesurées. Les protocoles utilisés sont détaillés **Partie III.2.1.1.3.**

Les extraits d'ADN ont ensuite été dilués pour obtenir le génotype des individus, ainsi que pour estimer la charge en *Bonamia ostreae*, par PCR quantitative.

#### IV.2.2.6 PCR quantitative

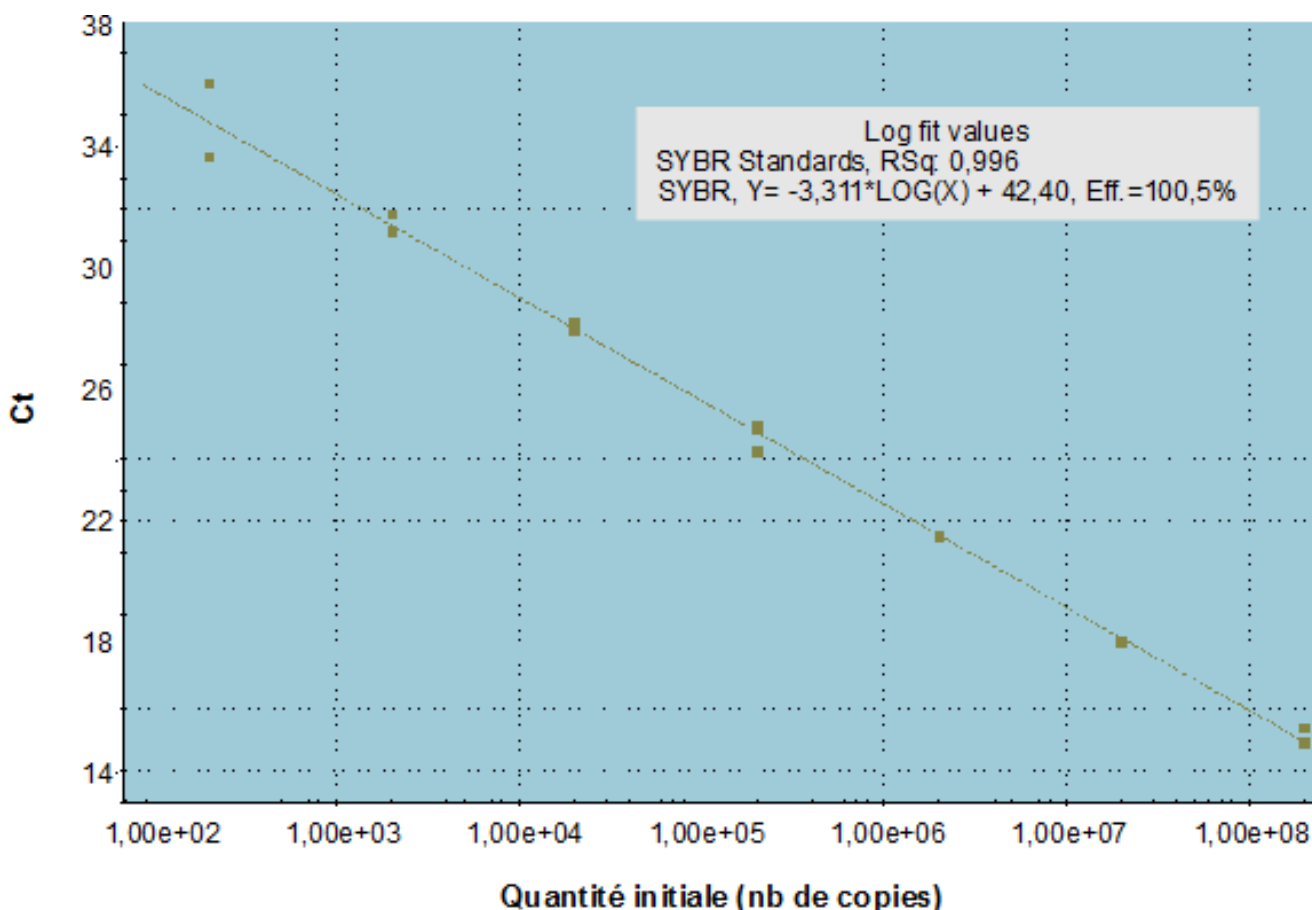
La charge parasitaire des individus sacrifiés et de ceux morts au cours de l'expérimentation a été mesurée par une PCR quantitative ciblant un des gènes de l'actine (Robert *et al.*, 2009).

Cette méthode nécessite la construction systématique d'une gamme étalon servant de référentiel à la quantification de l'intensité de l'infection en *Bonamia ostreae* chez les huîtres à analyser. La courbe standard [Figure 42] a été obtenue en diluant une suspension d'ADN plasmidique linéarisé (enzyme Xho I) correspondant à la région ciblée (gène de l'actine 1; amorces BoA1F : 5'-GCT TCG ACC GAA AGT TCC G-3' et BoA2R : 5'-GGC GAA GAG GTC TTT TCT GA-3'). Les 5 points de la courbe standard ont été obtenus par dilutions successives :  $2 \cdot 10^8$  copies. $\mu\text{L}^{-1}$ ,  $2 \cdot 10^6$  copies. $\mu\text{L}^{-1}$ ,  $2 \cdot 10^4$  copies. $\mu\text{L}^{-1}$ ,  $2 \cdot 10^2$  copies. $\mu\text{L}^{-1}$ ,  $0,5 \cdot 10^2$  copies. $\mu\text{L}^{-1}$ .

Une fois les 5 points de dilution de la courbe standard préparés, les ADN extraits des différents individus à tester ont été dilués à  $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . La réaction de PCR quantitative a eu lieu dans une microplaque de 96 puits disposée dans un Thermocycleur Mx3005P (Quantitative PCR Systems, Stratagene). Les analyses ont été effectuées en triplicats dans un volume de  $25 \mu\text{L}$  comprenant  $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  d'ADN génomique (échantillon) ou d'ADN plasmidique (contrôle positif) ou d'eau Milli-Q<sup>®</sup> (contrôle négatif). Le mélange réactionnel contenait  $12,5 \mu\text{L}$  de Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix (Stratagene),  $2,5 \mu\text{L}$  de l'amorce BoA1F ( $2,4 \mu\text{M}$ ),  $2,5 \mu\text{L}$  de l'amorce BoA2R ( $1,2 \mu\text{M}$ ),  $0,375 \mu\text{L}$  de Reference Dye ( $1 \text{ mM}$ ) et  $2,125 \mu\text{L}$  d'eau Milli-Q<sup>®</sup>.

Le profil thermique utilisé comprenait 3 segments : 1 cycle de dénaturation de 10 min à  $95^\circ\text{C}$ , suivi de 40 cycles d'amplification composés de 3 étapes (30 s à  $95^\circ\text{C}$ , 1 min à  $60^\circ\text{C}$ , 30 s à  $72^\circ\text{C}$ ), puis d'un dernier cycle de 3 étapes (1 min à  $95^\circ\text{C}$ , 30 s à  $55^\circ\text{C}$ , 30 s à  $95^\circ\text{C}$ ). La fluorescence a été mesurée à la fin de chacune des étapes d'hybridation ( $60^\circ\text{C}$ ), et la mesure des valeurs de la courbe de dissociation a été effectuée au cours du dernier cycle du dernier segment lors de l'augmentation progressive de la température de  $55^\circ\text{C}$  à  $95^\circ\text{C}$  en 40 min.

Les données ont été acquises, au cours de la PCR, sous le logiciel MxPro (Stratagene). Un intervalle maximal de  $[-0,5 \text{ Ct}; 0,5 \text{ Ct}]$  a été accepté entre les différents réplicats d'un même échantillon. Après validation des réplicats, le nombre de copies de gène d'actine présent dans l'échantillon a été déterminé par comparaison entre la moyenne des valeurs de Ct pour chaque échantillon et la courbe standard.



**Figure 42** – Courbe standard construite à partir de 7 dilutions successives des plasmides linéarisés (de  $2.10^8$  à  $2.10^2$ ). Plus un échantillon est concentré (quantité initiale élevée), plus le nombre de cycles d'amplification (Ct) nécessaires pour atteindre le seuil de fluorescence est faible. Ici, l'efficacité de la courbe (Eff.) est proche de 100 %.

#### IV.2.2.7 Génotypage et construction des cartes génétiques de liaison

Le génotypage de 384 SNP, issus de séquençage direct et de séquençage *in silico* [cf. **Partie III.2**], a été effectué à la plateforme génomique BeadXpress de Toulouse (GenoToul) via la chimie GoldenGate, et la technologie Veracode (Illumina). Le protocole est détaillé dans la **Partie III.3.1.3**.

Pour chaque famille, la carte de liaison a été construite à partir des génotypes des individus  $F_2$  des deux phénotypes (« mort »/ « survivant »), ainsi que de leurs parents  $F_1$ , avec le logiciel JoinMap<sup>®</sup> 4 (van Ooijen, 2006). Les différentes étapes de cette construction sont détaillées dans la **Partie III.3.1.5**.

Pour pouvoir identifier l'individu grand-parent à l'origine de chaque QTL, les individus  $F_0$  ont également été génotypés avec les marqueurs moléculaires. Étant donné le faible volume et la faible concentration en ADN extrait disponible pour les analyses, le génome total de ces individus  $F_0$  a été au préalable amplifié avec le Kit Illustrate<sup>™</sup> amplification d'ADN génomique GenomiPhi<sup>™</sup> V2 (GE Healthcare) suivant le protocole décrit dans la **Partie III.2.1.1.4**.

#### IV.2.2.8 Analyse QTL

La cartographie QTL a été réalisée avec le logiciel MapQTL<sup>®</sup> 5 (van Ooijen, 2004) à partir des cartes génétiques de liaison précédemment construites [Partie III.3.2] ainsi que des données phénotypiques qualitatives (mort / survie) ou quantitatives (charge en *B. ostreae*) et des génotypes. Ce logiciel permet de détecter la présence de régions QTL, puis de positionner ces régions QTL sur la carte génétique de liaison.

La méthode de cartographie de QTL utilisée est celle de la cartographie par intervalle ou « *Interval Mapping* » (IM, Lander and Botstein, 1989). Cette méthode consiste en un test de vraisemblance (LOD score) de la position de la région QTL, sur chaque groupe de liaison. L'hypothèse nulle  $H_0$  d'absence de QTL est alors testée en tout point du génome situé entre deux marqueurs, tous les 1 cM. La position pour laquelle le LOD score est maximal correspond à la position la plus vraisemblable du QTL. Pour chacun des groupes de liaison, le seuil de significativité du LOD score est choisi suite à un test de permutation à 1000 itérations (Churchill and Doerge, 1994), qui prend en compte le nombre d'individus génotypés et le nombre de marqueurs. Plusieurs seuils dégressifs de LOD sont choisis : P-values = 0,001 ; 0,005 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,10 et appliqués au résultat de l'IM afin d'identifier la significativité des QTL. Un QTL avec une P-value < 0,05 est considéré significatif et un QTL avec une P-value < 0,10 est considéré présumé (Le Bras *et al.*, 2011). Un LOD a été défini pour chaque GL, et un autre LOD pour la carte globale de liaison constituée de tous les GL. Les bornes de l'intervalle de confiance sont définies par la valeur maximale du LOD à laquelle on soustrait 1 unité. Le test IM donne également le pourcentage de variance expliquée par le QTL.

Cependant, la méthode de l'IM recherche l'existence potentielle d'un unique QTL. Elle ne prend pas en compte la possibilité de plusieurs QTL proches sur la carte génétique de liaison et éventuellement liés. Pour y remédier, pour chaque région QTL détectée par l'IM, une cartographie MQM (*Multiple-QTL model*, Jansen, 1993, 1994; Jansen and Stam, 1994) est ensuite systématiquement réalisée afin de détecter un éventuel QTL précédemment masqué par un QTL dit « dominant ». Pour cela, les marqueurs moléculaires proches de la région QTL détectée par IM sont identifiés comme co-facteurs. L'analyse est alors relancée dans le nouvel intervalle, à la recherche d'un éventuel effet additif ou dominant.

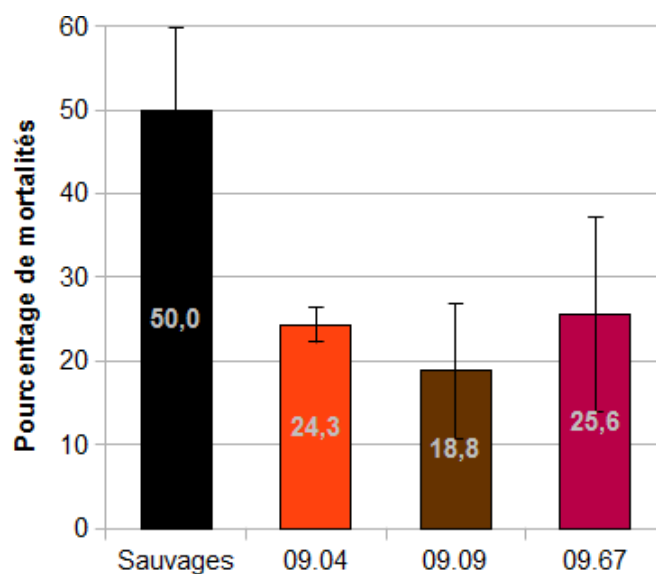
La nomenclature des QTL a été adaptée d'après la description de Cui *et al.* (2008) : elle commence avec la lettre « q », suivie d'une abréviation du nom de la famille ségrégeante étudiée, puis d'une abréviation du nom du phénotype étudié, suivi du numéro du groupe de liaison, et enfin du numéro du QTL affectant ce caractère sur le groupe de liaison.

L'effet additif ainsi que le grand-parent à l'origine de chaque allèle au QTL ont été déterminés. L'effet de l'allèle aux marqueurs associés à chaque région QTL a été vérifié par un test du  $\chi^2$  sur la distribution des fréquences alléliques. La significativité du test a été établie pour  $p < 0,05$ .

## IV.2.3 Résultats

### IV.2.3.1 Cinétique des mortalités

La présente expérimentation a duré 15 mois, du 22 avril 2010 au 22 juillet 2011. Au cours de cette période, les huîtres mortes ont été dénombrées chaque jour. À l'issue de l'expérimentation de cohabitation, 50 % des huîtres sauvages sur-infectées par injection sont mortes [Figure 43]. Avec un taux moyen de mortalités de 24,3 % pour la famille 09.04, 18,8 % pour la famille 09.09 et 25,6 % pour la famille 09.67, il n'y a pas de différence significative entre les trois familles d'huîtres testées ( $H = 0,83$  ddl = 2,  $p = 0,66$ ).

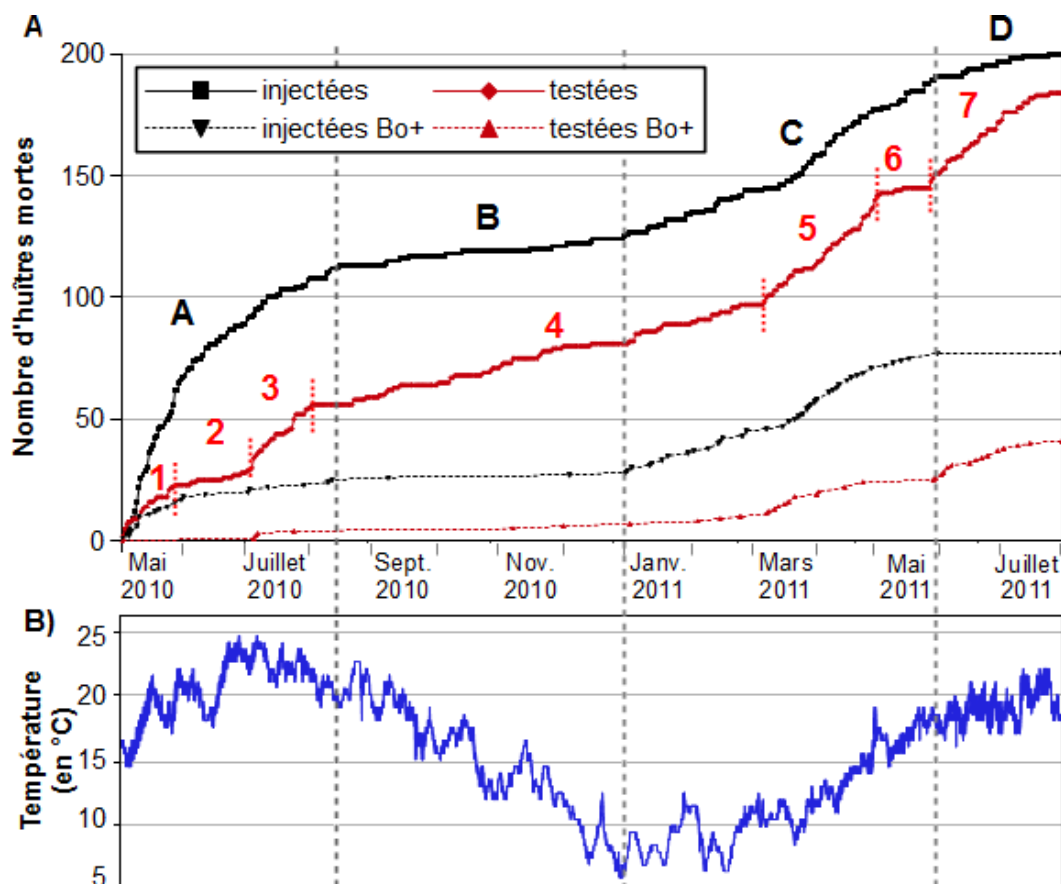


**Figure 43** – Taux de mortalités des huîtres sauvages sur-infectées par injection (Sauvages) et des huîtres des 3 familles testées par cohabitation (09.04, 09.09, 09.67). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre les 3 bacs répliqués, pour chacune des familles, et à l'écart-type entre les 8 bacs d'expérience pour les huîtres sauvages injectées avec *Bonamia ostreae*.

Au cours de l'expérience, plusieurs vagues de mortalités se sont produites, à la fois chez les huîtres sources sur-infectées par injection de parasites et chez les huîtres testées par cohabitation [Figure 44]. Les deux courbes de mortalités totales cumulées présentent un profil similaire. Le décalage entre les courbes de mortalités totales cumulées et les courbes de détection du parasite sur les individus morts s'explique par le fait que certaines huîtres avaient des tissus très dégradés et donc non utilisables pour effectuer des analyses (voir explications plus bas). Au total, respectivement 88,6 % et 54,1 % des huîtres injectées et des huîtres testées ont été analysées par PCR quantitative pour détecter la présence de *B. ostreae*.

En se basant sur la forme des courbes de mortalités, celles de la détection du parasite, et l'évolution de la température de l'eau au sein des bacs expérimentaux, 4 phases peuvent être identifiées chez les huîtres injectées (phases A à D), et 7 phases chez les huîtres testées (phases 1 à 7). Le développement du parasite dans les huîtres injectées est suivi d'une phase d'incubation et de transmission, puis de développement du parasite dans les huîtres testées [Figure 44]. La tempé-

rature de l'eau est identique dans les 12 bacs expérimentaux.



**Figure 44** – **A**) Mortalités totales cumulées des huîtres testées (**rouge**) en cohabitation avec les huîtres sauvages naturellement infectées par *Bonamia ostreae* et sur-infectées par injection (**noir**), au cours des 15 mois d'expérience du 22 avril 2010 au 22 juillet 2011. Les courbes en pointillées illustrent les effectifs d'huîtres mortes diagnostiquées infectées à *Bonamia ostreae*. Respectivement 4 et 7 phases sont identifiables chez les huîtres injectées (A à D) et chez les testées (1 à 7). **B**) Évolution de la température de l'eau au sein des bacs expérimentaux. La température est identique entre les bacs.

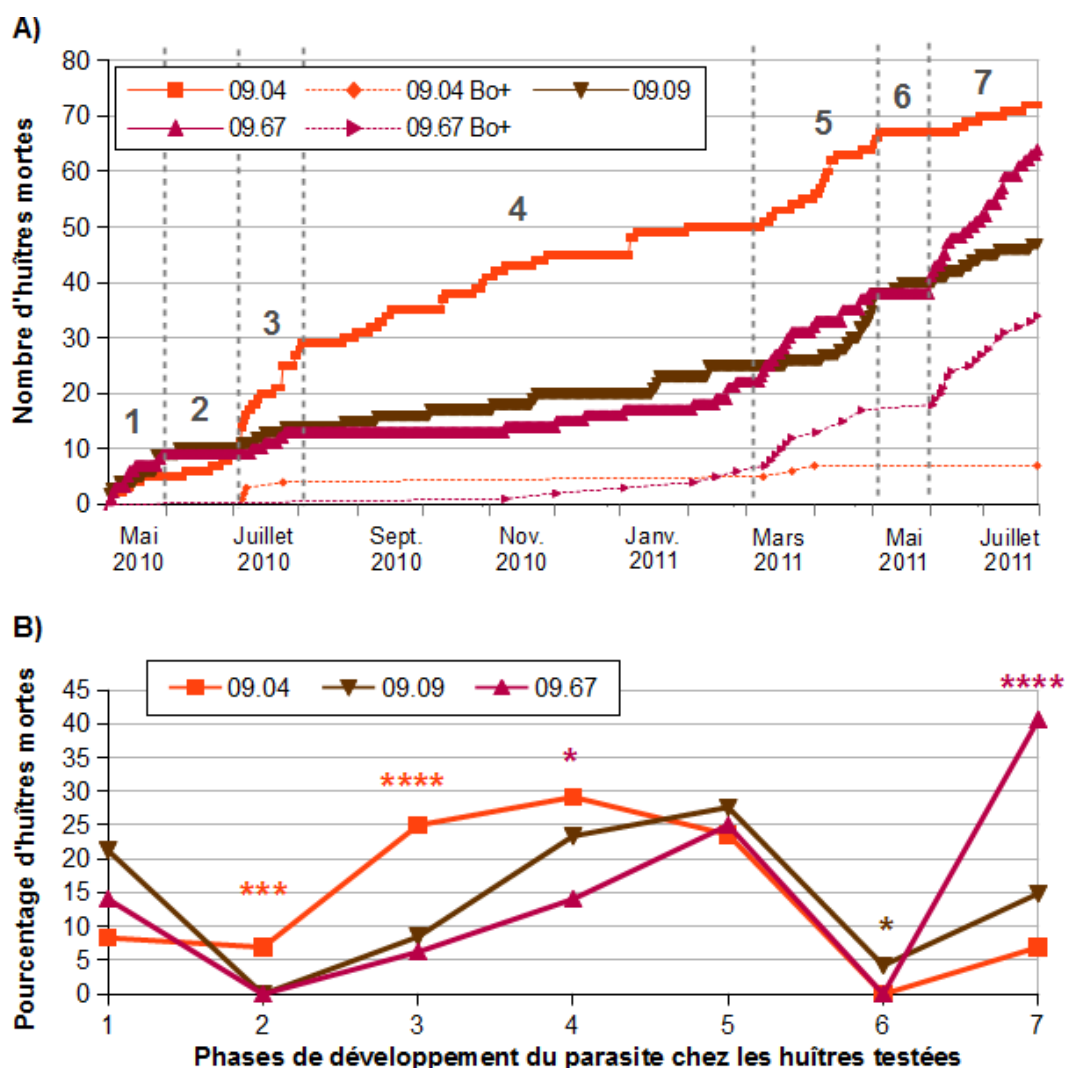
Chez les huîtres injectées :

- Phase A : de début mai à mi-août 2010, augmentation brutale des mortalités. La détection du parasite dans les huîtres mortes reflète son développement dans les huîtres injectées. La température de l'eau augmente de 15°C à 25°C puis se stabilise autour de 20°C.
- Phase B : de mi-août à fin décembre 2010, faible augmentation des mortalités. Le parasite n'est plus détecté que chez deux huîtres mortes. Il se développe sans induire de mortalité ; il est en phase d'incubation. La température de l'eau diminue de 20°C à 7°C.
- Phase C : de début janvier à fin mai 2011, augmentation des mortalités. Celles-ci s'accroissent à partir de mi-mars, lorsque la température de l'eau remonte au-dessus de 10°C. La détection du parasite dans les huîtres mortes reflète son développement dans les huîtres injectées.
- Phase D : de fin mai 2011 à la fin de l'expérience (fin juillet), les mortalités ralentissent. Le parasite n'est plus détecté dans les huîtres mortes ; il est en phase d'incubation. La température de l'eau avoisine les 20°C.

Chez les huîtres testées par cohabitation :

- Phase 1 : de début mai à fin mai 2010, augmentation des mortalités. Le parasite n'est pas détecté; il est peut-être transmis des huîtres injectées aux huîtres testée. La mortalité observée constitue probablement une mortalité résiduelle des huîtres en réponse aux nouvelles conditions de stabulations (faible renouvellement d'eau, mise à sec journalière, diminution de l'apport nutritif).
- Phase 2 : de fin mai à début juillet 2010, très faible augmentation des mortalités. Le parasite n'est pas détecté; il est peut-être transmis des huîtres injectées aux huîtres testée.
- Phase 3 : de début juillet à fin juillet 2010, augmentation brutale des mortalités. La détection du parasite dans 4 huîtres mortes reflète son développement dans les huîtres testées. La température de l'eau diminue de 25 °C à 20 °C.
- Phase 4 : de début août 2010 à début mars 2011, augmentation régulière des mortalités. Le parasite n'est détecté que dans 6 huîtres mortes; il est en phase d'incubation et de transmission entre les individus. La température de l'eau diminue à 7 °C avant de se stabiliser à 10 °C.
- Phase 5 : de début mars à début mai 2011, augmentation brutale des mortalités. La détection du parasite dans les huîtres mortes reflète son développement dans les huîtres testées. La température de l'eau augmente jusqu'à 15 °C.
- Phase 6 : de début mai à fin mai 2011, stabilisation des mortalités. Le parasite n'est plus détecté dans les rares huîtres mortes. La température de l'eau augmente de 15 °C à 20 °C.
- Phase 7 : de fin mai 2011 à la fin de l'expérience (fin juillet), augmentation brutale des mortalités. La détection du parasite reflète son développement dans les huîtres testées. La température de l'eau avoisine les 20 °C.

Quand on s'intéresse au comportement individuel de chacune des familles d'huîtres testées, au cours du challenge expérimental à la bonamiose, on retrouve ces sept phases [Figure 45].



**Figure 45** – **A)** Mortalités totales cumulées des huîtres testées des familles 09.04 (orange), 09.09 (marron) et 09.67 (rouge), au cours de l'expérience d'infection par *Bonamia ostreae* par cohabitation avec des huîtres sauvages naturellement infectées et sur-infectées par injection. Les courbes en pointillées illustrent les effectifs d'huîtres mortes diagnostiquées infectées à *Bonamia ostreae*. 7 phases d'incubation et transmission (1, 2, 4, 6), et de développement (3, 5, 7) du parasite peuvent être identifiées. **B)** Pourcentage de mortalités des trois familles testées dans chacune des sept phases identifiées en A). \* :  $p < 0,05$ ; \*\*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,001$ . La couleur du symbole significatif correspond à la famille concernée.

Sur la **Figure 45A**, on peut remarquer que la famille 09.04 a subi davantage de mortalités que les deux autres familles testées, avec un pic de mortalités dès juillet 2010, puis une augmentation linéaire durant la suite de l'expérience. *A contrario*, les mortalités se sont produites plus tardivement chez les familles 09.09 et 09.67, avec relativement peu d'huîtres mortes au cours de l'année 2010. Le décalage des mortalités entre les 3 familles est devenu très peu significatif au cours des phases 4 à 6 [**Figure 45B**]. Puis, en phase 7, la famille 09.67 a subi un important pic de mortalités par rapport aux familles 09.04 et 09.09 ( $\chi^2 = 29,81$  ddl = 2,  $p < 0,001$ ). D'autre part, le parasite a été identifié significativement plus souvent chez les huîtres mortes de la famille 09.67 que chez celles de la famille 09.04 ( $\chi^2 = 17,78$  ddl = 1,  $p < 0,001$ ).

Malgré un suivi journalier, les huîtres testées étaient de petite taille et leurs tissus se dégra-



daient très vite après la mort des individus. Aussi, tous les échantillons n'ont pas pu être analysés en PCR quantitative pour la détection de la charge parasitaire en *Bonamia ostreae* [Table 21].

**Table 21** – Disponibilité en tissus pour la détection de la charge en *Bonamia ostreae* (Bo<sup>+</sup>) par PCR quantitative chez les trois familles d'huîtres testées et effectifs et taux d'infection des huîtres sacrifiées. « - » : analyse non effectuée.

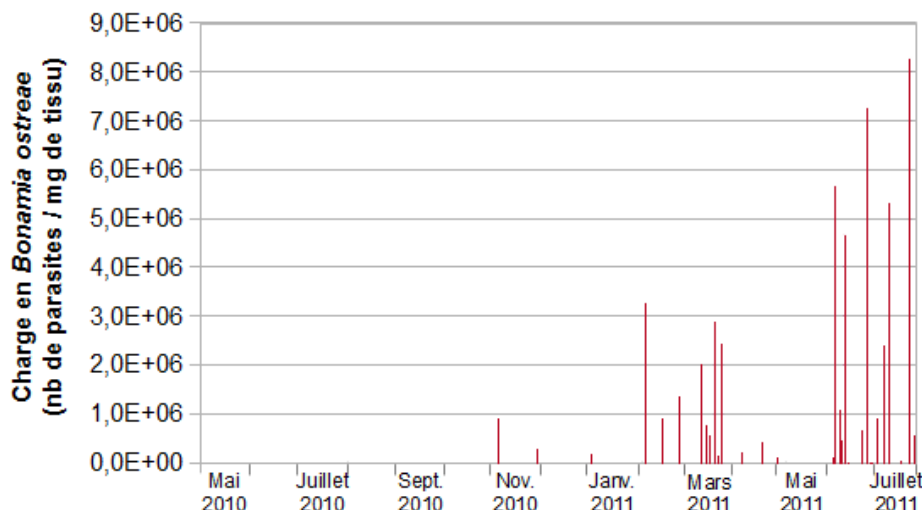
Familles testées	Huîtres mortes	Tissus disponibles	% individus morts Bo <sup>+</sup>	Huîtres sacrifiées	% individus sacrifiés Bo <sup>+</sup>
09.04	73	57	12,3	63	-
09.09	47	37	-	-	-
09.67	64	42	81,0	44	31,8

Ainsi, parmi toutes les huîtres mortes au cours de l'expérience de cohabitation, 78,1 % (57/73) des individus de la famille 09.04, 78,7 % (37/47) des individus de la familles 09.09 et 65,6 % (42/64) des individus de la famille 09.67 avaient des tissus en assez bon état pour réaliser un prélèvement utilisable en extraction ADN pour le génotypage et la quantification de la charge en *B. ostreae*. Chez la famille 09.04, 12,3 % des individus ont été détectés parasités par *B. ostreae* contre 81 % des individus analysés de la famille 09.67. Étant donné le faible pourcentage de détection du parasite chez la famille 09.04, et en faisant l'hypothèse que les mortalités sont bien liées à *B. ostreae* bien que celui-ci ne soit pas détecté, il a été décidé d'utiliser cette famille pour la recherche de QTL liés à la survie ou la mortalité et non pas liés à la charge en parasite. Aussi, 63 individus survivants de cette famille ont été sacrifiés à l'issue de l'expérience mais n'ont pas été analysés en PCR quantitative.

Les faibles effectifs d'huîtres mortes et de tissus disponibles de la famille 09.09 ont conduit à l'abandon de cette famille pour la suite de l'analyse. Les huîtres mortes de la famille 09.09 n'ont donc pas été analysées.

Par opposition, la famille 09.67 a été sélectionnée pour la recherche de QTL liés à la charge en parasite, et à la survie/mortalité vis-à-vis d'une infection à *Bonamia ostreae*. Ainsi, 44 individus survivants de cette dernière famille ont été sacrifiés et analysés en PCR quantitative. 31,8 % de ces individus sacrifiés ont été détectés infectés, avec une charge parasitaire moyenne de 440 parasites par milligramme de tissu.

L'évolution de la charge en *Bonamia ostreae* détectée chez les individus morts de la famille 09.67 au cours de l'expérience d'infection par cohabitation est présentée Figure 46. Chez ces individus la charge en parasite est jusqu'à 5 000 fois plus élevée que chez les individus survivants à la fin de l'expérience, avec une charge maximale de  $8,29 \cdot 10^6$  cellules de *Bonamia ostreae* détectées par milligramme de tissu. Comme nous l'avons vu Figure 45, la proportion d'huîtres infectées par le parasite augmente au fur et à mesure de l'avancée de l'expérimentation, mais la charge parasitaire maximale détectée augmente également.



**Figure 46** – Évolution de la charge en *Bonamia ostreae* détectée chez les individus morts de la famille 09.67 au cours de l'expérience d'infection par cohabitation.

La charge parasitaire des huîtres sources n'a quant-à-elle pas été déterminée. Cependant, parmi les huîtres injectées analysées (huîtres mortes), 53,1 % ont été détectées positives au parasite par empreinte de tissus.

#### IV.2.3.2 Cartes de liaison

##### IV.2.3.2.1 Famille 09.04

Comme nous l'avons vu dans le point précédent, seules 57 huîtres de la famille 09.04 mortes au cours de l'expérimentation ont pu être typées avec les 384 marqueurs SNP. Parmi celles-ci, le génotypage n'a pas donné de résultat pour 5 huîtres, probablement du fait de la faible qualité de l'ADN extrait dû à une dégradation avancée des tissus échantillonnés. Le génotypage a donc été réalisé sur 115 huîtres de génération  $F_2$ , dont 52 huîtres mortes au cours de l'expérimentation et 63 huîtres sacrifiées en fin d'expérimentation, sur les 2 parents  $F_1$  et les 2 grand-parents  $F_0$ .

La carte génétique de liaison pour la famille 09.04 a été construite à partir des données de génotypage des 115 individus  $F_2$ , pour 121 marqueurs moléculaires de type SNP [cf. **Partie III.3.2.3.1**]. Au final, 117 marqueurs ont été positionnés sur 8 GL (dont 2 GL constitués de 2 groupes) et 2 groupes surnuméraires, à raison de 2 à 29 marqueurs SNP sur chaque groupe, pour une longueur totale de 271,08 cM.

##### IV.2.3.2.2 Famille 09.67

Le génotypage a été réalisé sur 78 huîtres de génération  $F_2$ , dont 34 huîtres mortes au cours de l'expérimentation et infectées par *Bonamia ostreae* et 44 huîtres sacrifiées, sur les 2 parents  $F_1$  et les 2 grand-parents  $F_0$ .

La carte génétique de liaison pour la famille 09.67 a été construite à partir des données de géno-

typage des 78 individus  $F_2$ , pour 106 marqueurs moléculaires de type SNP [Partie III.3.2.3.3]. Au final, 96 marqueurs ont été positionnés sur 10 GL et un groupe surnuméraire, à raison de 2 à 21 marqueurs SNP sur chaque groupe, pour une longueur totale de 253,55 cM.

### IV.2.3.3 Détection de QTL

#### IV.2.3.3.1 QTL liés à la survie

Les données phénotypiques utilisées sont des données binaires (0 ou 1). Un individu mort au court du challenge a le phénotype « 0 », et un individu survivant au challenge mais qui a été sacrifié à l'issue de celui-ci a le phénotype « 1 ».

Pour chacune des familles  $F_2$  analysées (09.04 et 09.67), la recherche de régions QTL liées à la survie ou à la mortalité est effectuée indépendamment pour chacun des groupes de liaison de la carte génétique de liaison propre à la famille. Les cartes ont été obtenues dans la Partie III.3 du présent manuscrit. Pour chacun des deux phénotypes étudiés, les effectifs analysés sont respectivement de 115 individus pour la famille 09.04 et 78 individus pour la famille 09.67.

Le test de cartographie par intervalle (*Interval Mapping*, IM) a permis d'identifier quatre QTL significatifs ( $P < 0,05$ ) chez la famille 09.04 et un QTL significatif chez la famille 09.67. Un QTL présumé ( $P < 0,10$ ) a également été cartographié pour chacune des familles sur le GL 1 [Table 22; Figure 47].

Les QTL significatifs sont répartis sur les GL 2 (1 QTL), GL 3 (1 QTL) et GL 8 (2 QTL) pour la famille 09.04 et sur le GL 2 pour la famille 09.67. Pour la première famille, ils expliquent respectivement 15,2 %, 10,6 %, 9,7 % et 8,8 % de la variance phénotypique liée à la survie. Pour la seconde famille, il explique 17,2 % de la variance phénotypique liée à la survie.

L'effet additif ainsi que le(s) grand-parent(s) à l'origine du ou des allèles associés à la région QTL ont été déterminés. Le phénotype « mort » est assimilé à une sensibilité à la mortalité, alors que le phénotype « survie » est assimilé à une résistance à la mortalité.

De manière générale, le grand-parent originaire de la lignée sélectionnée transmet l'allèle lié au phénotype « survie » alors que le grand-parent à l'origine de la lignée sauvage transmet l'allèle lié au phénotype « mort ».

Les quatre QTL significatifs de la famille 09.04 sont associés à des allèles liés au phénotype « mort », provenant de chacun des deux grand-parents (703-29 et W31). Les marqueurs moléculaires associés sont :

- sur le GL 2 : snp\_Contig17209\_306, snp\_Contig856\_367 ;
- sur le GL 3 : snp\_Contig2880\_335 ;
- sur le GL 8 : snp\_Contig8921\_659, snp\_Contig25296\_950, snp\_Contig9948\_834, snp\_Contig4000\_242.

Le QTL significatif de la famille 09.67 est associé à des allèles liés au phénotype « mort », originaires du grand-parent sauvage (W120), sur les marqueurs `snp_Contig3944_318`, `snp_Contig139_522`, `snp_Contig15123_990` et `snp_Contig26955_279`, et à des allèles liés au phénotype « survie », originaires du grand-parent L002-55 sur le marqueur `snp_Contig30746_177` et des deux grands-parents pour `snp_Contig3981_133`.

La région QTL présumée située sur le GL 1 pour la famille 09.04 est associée à un allèle lié au phénotype « survie », originaire du grand-parent 703-29, sur les marqueurs `EST22-edu-2` et `snp_Contig634_684`, et à des allèles liés au phénotype « mort », d'origine multiple liés aux marqueurs `snp_Contig35272_292` (originaire des deux grands-parents), `snp_Contig1511_1135` (origine W31) et `snp_Contig25127_1757` (origine 703-29).

La région QTL présumée située sur le GL 1 pour la famille 09.67 est associée à un allèle lié au phénotype « mort », provenant de chacun des deux grands-parents, sur le marqueur `snp_Contig36240_3154`.

De façon globale, la technique du MQM a permis de confirmer les positions et intervalles de confiance des QTL, mais également de préciser les marqueurs associés. Chez la famille 09.04, cette technique a permis d'éliminer le marqueur `snp_Contig26955_279` comme co-facteur sur le GL 2, alors qu'il a été associé à un QTL chez la famille 09.67. Chez la famille 09.04, cette technique a également permis d'éliminer le marqueur `snp_Contig23006_302` comme co-facteur sur le GL 1, et de confirmer `snp_Contig8921_659` sur le GL8.

Pour la famille 09.67, l'analyse QTL effectuée à partir des génotypes de tous les marqueurs moléculaires typés (distordus et non distordus) a conduit à identifier un QTL très fortement significatif sur le GL 3. Ce QTL était associé à un LOD de 99,99 et à une variance expliquée de 100 %. Ces valeurs étant aberrantes, les marqueurs situés à proximité de la région supposée ont été vérifiés. Il s'est avéré qu'un marqueur très fortement distordu se trouvait à proximité immédiate de cette région, bien qu'il n'y était pas associé. Ainsi, l'analyse a été refaite à partir des génotypes des marqueurs non-distordus, exclusivement. Ces marqueurs avaient, au préalable, été identifiés lors de la construction de la carte génétique de liaison de la **Partie III.3.2.3.3** du présent manuscrit. Le résultat de cette deuxième analyse confirmait la présence du QTL significatif sur le GL 2, mais le score de LOD de la précédente région détectée sur le GL 3 devenait très inférieur au seuil de significativité. Ce QTL a alors été considéré comme un artefact.

**Table 22** – Caractéristiques principales des QTL pour la survie, cartographiés chez les familles 09.04 et 09.67, à l'issue d'une infection par cohabitation avec le parasite *B. ostreae*.

	QTL <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	Intervalle de marqueurs <sup>c</sup>	LOD maximal <sup>d</sup>	Position sur le GL (cM) <sup>e</sup>	Intervalle de confiance (cM) <sup>f</sup>	LOD GL <sup>g</sup> P<0,05	LOD Carte <sup>h</sup> P<0,05	Variance expliquée <sup>i</sup>	Effet additif <sup>j</sup>	Grand-parent d'origine <sup>k</sup>
<b>Survie Famille 09.04</b>	Q0904s1-1	1	snp_Contig19080_2166 – snp_Contig634_684	2,55	8,36	1,5 – 12,4	2,7	3,5		R	703-29
	Q0904s2-1	2	snp_Contig17209_306 – snp_Contig856_367	3,72**	17,21	12,1 – 22,6	2,7	3,5	15,2%	S	703-29 et W31
	Q0904s3-1	3	snp_Contig18913_137 – snp_Contig30182_1130	2,77*	20,39	18,9 – 27,3	2,5	3,5	10,6%	S	703-29 et W31
	Q0904s8-1	8	snp_Contig8921_659 – snp_Contig25296_950	2,24*	1,50	0,0 – 12,9	1,6	3,5	9,7%	S	703-29 et W31
	Q0904s8-2	8	snp_Contig25296_950 – snp_Contig40000_242	2,25*	9,13	0,0 – 12,9	1,6	3,5	8,8%	S	703-29 et W31
<b>Survie Famille 09.67</b>	q0967s1-1	1	snp_Contig36240_3154 – snp_Contig21853_1131	9,87	35,34	35,1 – 35,6	11	11,1		R	L002-55 et W120
	q0967s2-1	2	snp_Contig30746_177 – snp_Contig26955_279	3,13*	53,28	45,2 – 60,5	2,7	11,1	17,2%	S	W120
										R	L002-55

<sup>a</sup> : Nom du QTL adapté de Cui *et al.* (2008) : lettre « q » suivie d'une abréviation du nom de la famille (0904 ou 0967), suivi d'un « s » pour le phénotype survie, puis du numéro du groupe de liaison, et enfin du numéro du QTL affectant ce caractère sur le groupe de liaison.

<sup>b</sup> : Groupe de liaison (GL) sur lequel les QTL sont cartographiés.

<sup>c</sup> : Intervalle de marqueurs entre lesquels les QTL sont cartographiés.

<sup>d</sup> : LOD score maximal et niveau de significativité (aucune indication :  $P \approx 0,10$ ; \* :  $P < 0,05$ ; \*\* :  $P < 0,01$ ).

<sup>e</sup> : Position la plus probable du QTL sur chaque GL.

<sup>f</sup> : Intervalle de confiance de la position du QTL sur chaque GL.

<sup>g</sup> : LOD score à  $P < 0,05$  obtenu après 1000 itérations par le test de permutation (Churchill and Doerge, 1994) et correspondant au seuil de significativité à appliquer au GL pour la détection d'un QTL.

<sup>h</sup> : LOD score à  $P < 0,05$  de la carte globale de liaison obtenu après 1000 itérations par le test de permutation (Churchill and Doerge, 1994).

<sup>i</sup> : Pourcentage de la variance phénotypique totale expliquée par le QTL détecté. Les valeurs ne sont données que pour les QTL dont le LOD score dépasse le seuil de significativité du GL.

<sup>j</sup> : Estimation de l'effet phénotypique du QTL : R pour résistance (phénotype de survie) ; S pour sensibilité (phénotype de mort).

<sup>k</sup> : Grand-parent(s) à l'origine de l'allèle au QTL.

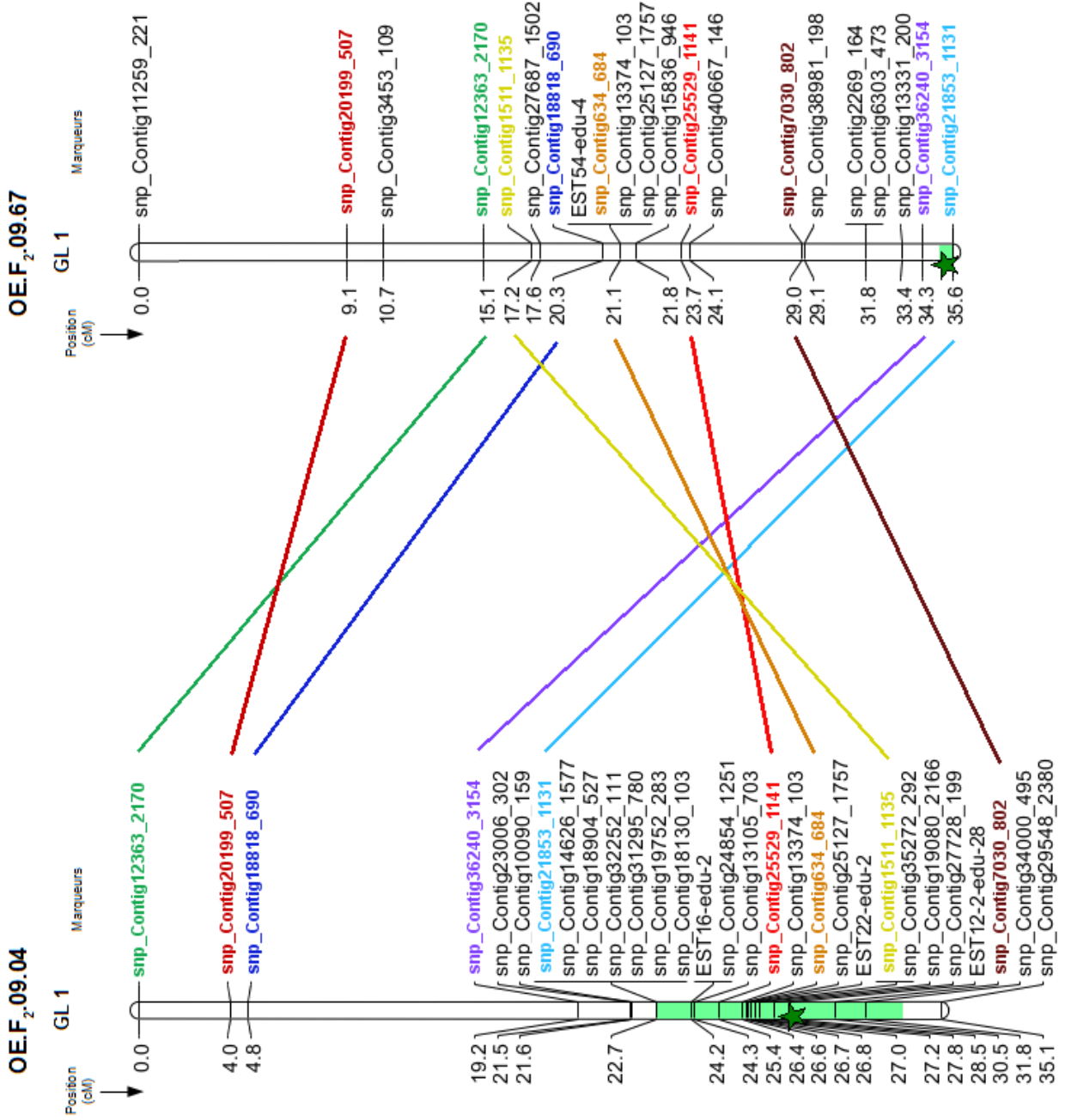


Figure 47 - Continue.

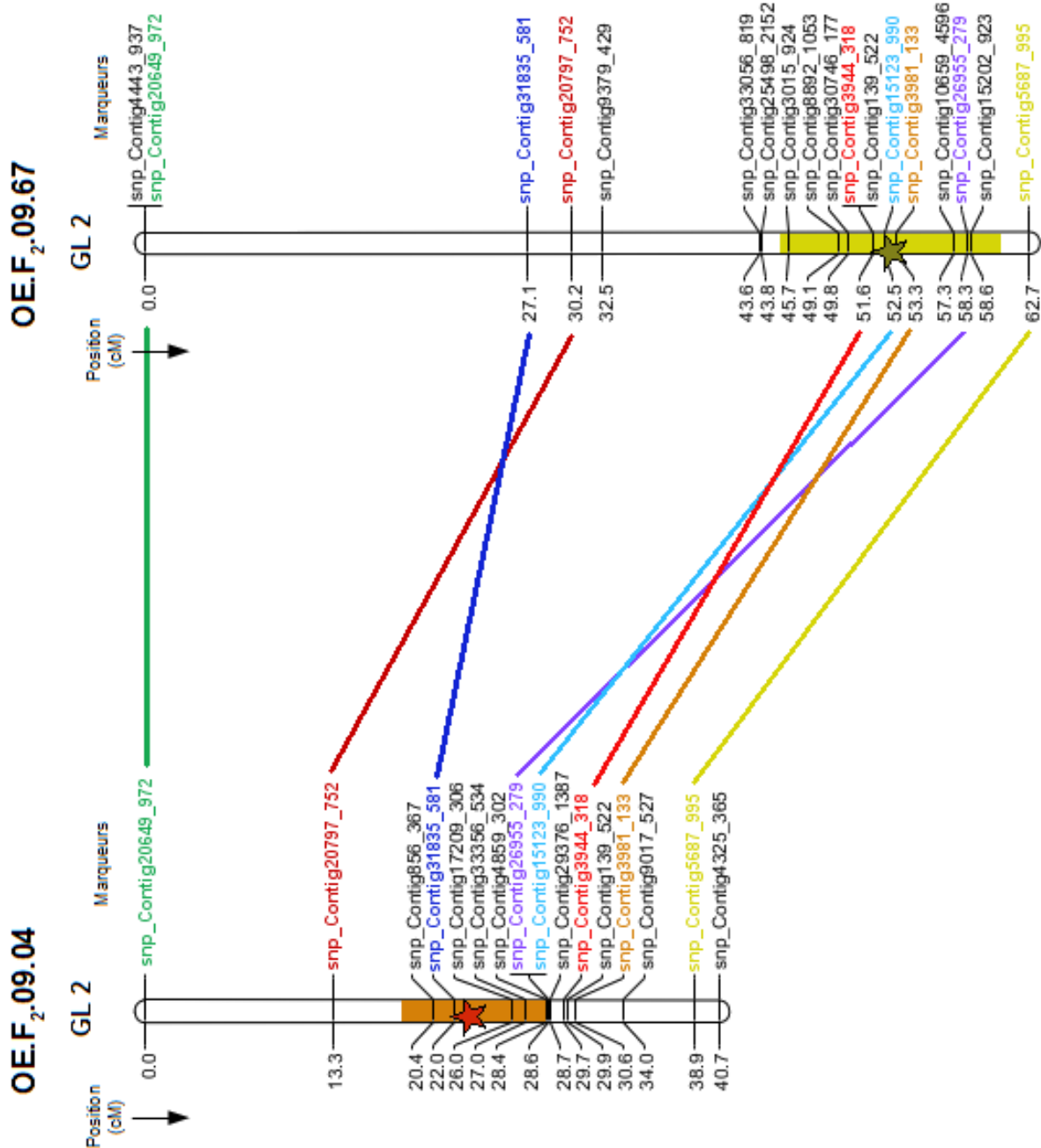
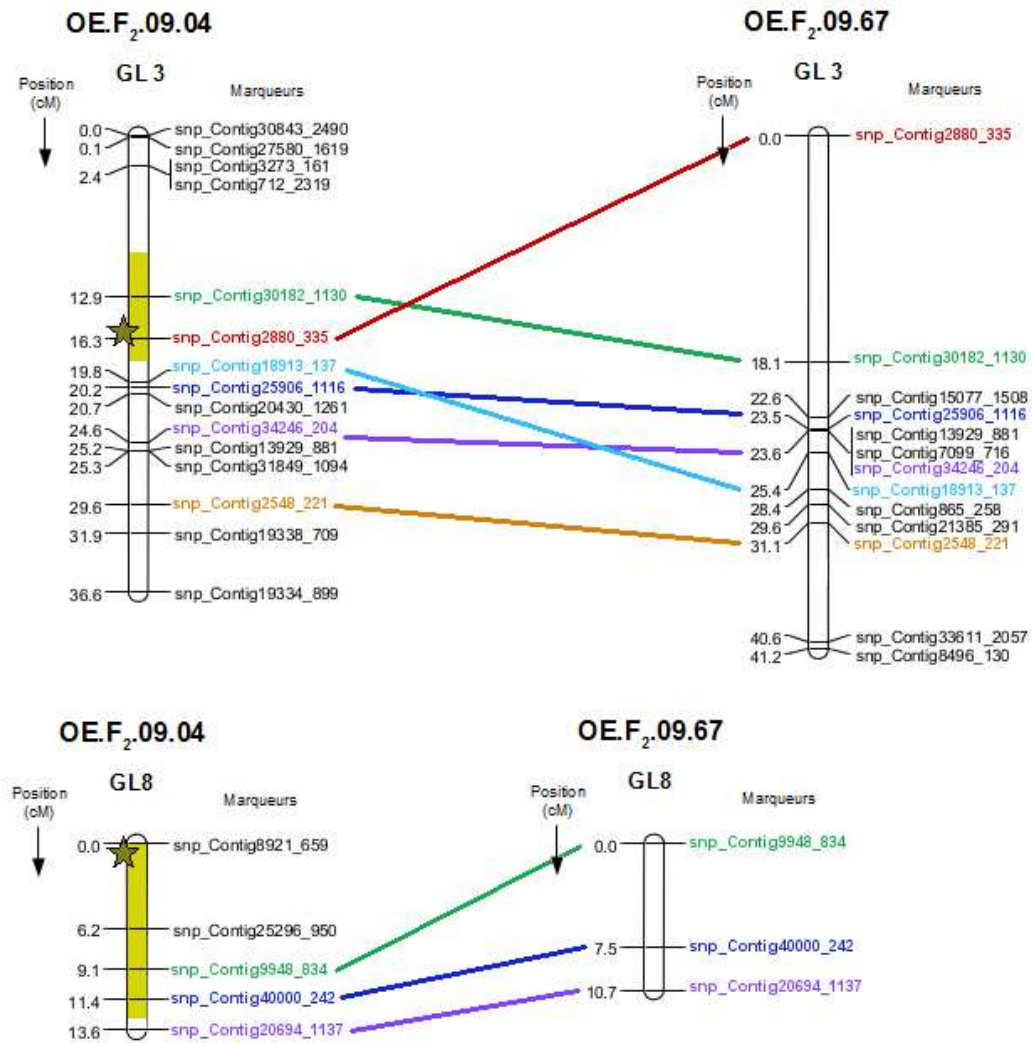


Figure 47 - Continue.



**Figure 47** – Cartographie comparée des QTL significatifs et présumés pour la survie ou la mortalité à une infection à *B. ostreae*, chez les familles 09.04 et 09.67. Quatre groupes de liaison (GL) sont comparés chez les 2 familles. Chaque trait de couleur relie deux marqueurs communs entre les 2 groupes homologues. L'intervalle de confiance de chaque région QTL est représentée par une couleur sur le GL correspondant au seuil de significativité. Vert : NS ; Orange clair :  $P < 0,05$  ; Orange foncé :  $P < 0,01$ . Une étoile indique la position la plus probable du QTL.



#### IV.2.3.3.2 QTL liés à une infection à *B. ostreae*

En raison des effectifs d'huîtres mortes infectées avec le parasite *B. ostreae* chez les différentes familles expérimentées [cf. **Table 21**], cette analyse a été effectuée uniquement chez la famille 09.67.

Les valeurs quantitatives de charge en parasite n'étant pas distribuées normalement, les données phénotypiques ont été transformées en données binaires (1 ou 2). D'autre part, afin d'avoir des phénotypes contrastés pour optimiser la recherche de QTL, la méthode de génotypage sélectif (Lander and Botstein, 1989) a été choisie. Pour cela, seuls les phénotypes extrêmes ont été considérés. Le phénotype « 1 » a été attribué aux individus survivants au challenge mais sacrifiés à l'issue de celui-ci, et qui ont été détectés négatifs au parasite *B. ostreae* ( $n = 15$ ) : phénotype « survivant non-infecté ». Le phénotype « 2 » a été attribué aux individus morts au cours du challenge, et qui ont été détectés positifs au parasite *B. ostreae* ( $n = 17$ ) : phénotype « mort infecté ». La charge parasitaire minimale pour un individu de phénotype « mort infecté » a été choisie pour une charge de  $1.10^3$  parasites par mg de tissu.

La recherche de régions QTL liées à la présence ou l'absence du parasite a été effectuée indépendamment pour chacun des 10 groupes de liaison et du groupe surnuméraire de la carte génétique de liaison.

Le test de cartographie par intervalle (*Interval Mapping*, IM) a permis d'identifier un QTL significatif ( $P < 0,05$ ) et deux QTL présumés ( $P < 0,10$ ) [**Table 23**; **Figure 48**]. L'effet additif ainsi que le grand-parent à l'origine de chaque allèle au QTL ont été déterminés. Le phénotype « mort infecté » est assimilé à une sensibilité à l'infection, alors que le phénotype « survivant non-infecté » est assimilé à une résistance à l'infection.

Le QTL significatif est cartographié sur le GL 2. Il explique 22,1 % de la variance phénotypique liée au phénotype « mort infecté » par *B. ostreae*, bien que cette variance soit potentiellement sur-estimée par la méthode de génotypage sélectif. Il est associé à des allèles de sensibilité originaires du grand-parent sauvage (W120), sur les marqueurs *snp\_Contig3944\_318*, *snp\_Contig139\_522*, *snp\_Contig15123\_990* et *snp\_Contig26955\_279*, et à des allèles de résistance originaires du grand-parent L002-55 sur le marqueur *snp\_Contig30746\_177* et des deux grand-parents pour *snp\_Contig3981\_133*.

Les QTL présumés sont répartis sur les GL 1 et GL 6a :

- sur le GL 1, un allèle de sensibilité transmis par chacun des deux grand-parents, sur le marqueur *snp\_Contig36240\_3154* ;
- sur le GL 6a, des allèles de sensibilité transmis par chacun des deux grand-parents, sur les marqueurs *snp\_Contig24949\_1767* et *snp\_Contig6126\_1190*.

De façon globale, la technique du MQM a permis de confirmer les positions et intervalles de confiance des QTL, mais également de préciser les marqueurs associés.

Tout comme pour l'analyse de QTL liés à la survie, un QTL caractérisé par des valeurs aberrantes a été identifié sur le GL 3, et a été considéré comme un artefact.

**Table 23** – Caractéristiques principales des QTL pour la charge en parasite *Bonamia ostreae*, cartographiés chez la famille 09.67 après une infection par cohabitation.

	QTL <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	Intervalle de marqueurs <sup>c</sup>	LOD maximal <sup>d</sup>	Position sur le GL (cM) <sup>e</sup>	Intervalle de confiance (cM) <sup>f</sup>	LOD GL <sup>g</sup> P<0,05	LOD Carte <sup>h</sup> P<0,05	Variance expliquée <sup>i</sup>	Effet additif <sup>j</sup>	Grand-parent d'origine <sup>k</sup>
<b>Bonamia Famille 09.67</b>	q0967b1-1	1	snp_Contig36240_3154 – snp_Contig21853_1131	6,41	35,34	35,1 – 35,6	10,1	10,2		S	L002-55 et W120
	q0967b2-1	2	snp_Contig139_522 – snp_Contig3981_133	3,32*	52,47	45,9 – 60,8	2,7	10,2	22,1%	S	W120
	q0967b6a-1	6a	snp_Contig24949_1767 – snp_Contig4827_70	1,7	13,554	0,6 – 26,0	1,8	10,2		S	L002-55 et W120

<sup>a</sup> : Nom du QTL adapté de [Cui et al. \(2008\)](#) : lettre « q » suivie d'une abréviation du nom de la famille (0967), suivi d'un « b » pour le phénotype infecté par *Bonamia*, puis du numéro du groupe de liaison, et enfin du numéro du QTL affectant ce caractère sur le groupe de liaison.

<sup>b</sup> : Groupe de liaison (GL) sur lequel les QTL sont cartographiés.

<sup>c</sup> : Intervalle de marqueurs entre lesquels les QTL sont cartographiés.

<sup>d</sup> : LOD score maximal et niveau de significativité (aucune indication :  $P \approx 0,10$ ; \* :  $P < 0,05$ ).

<sup>e</sup> : Position la plus probable du QTL sur chaque GL.

<sup>f</sup> : Intervalle de confiance de la position du QTL sur chaque GL.

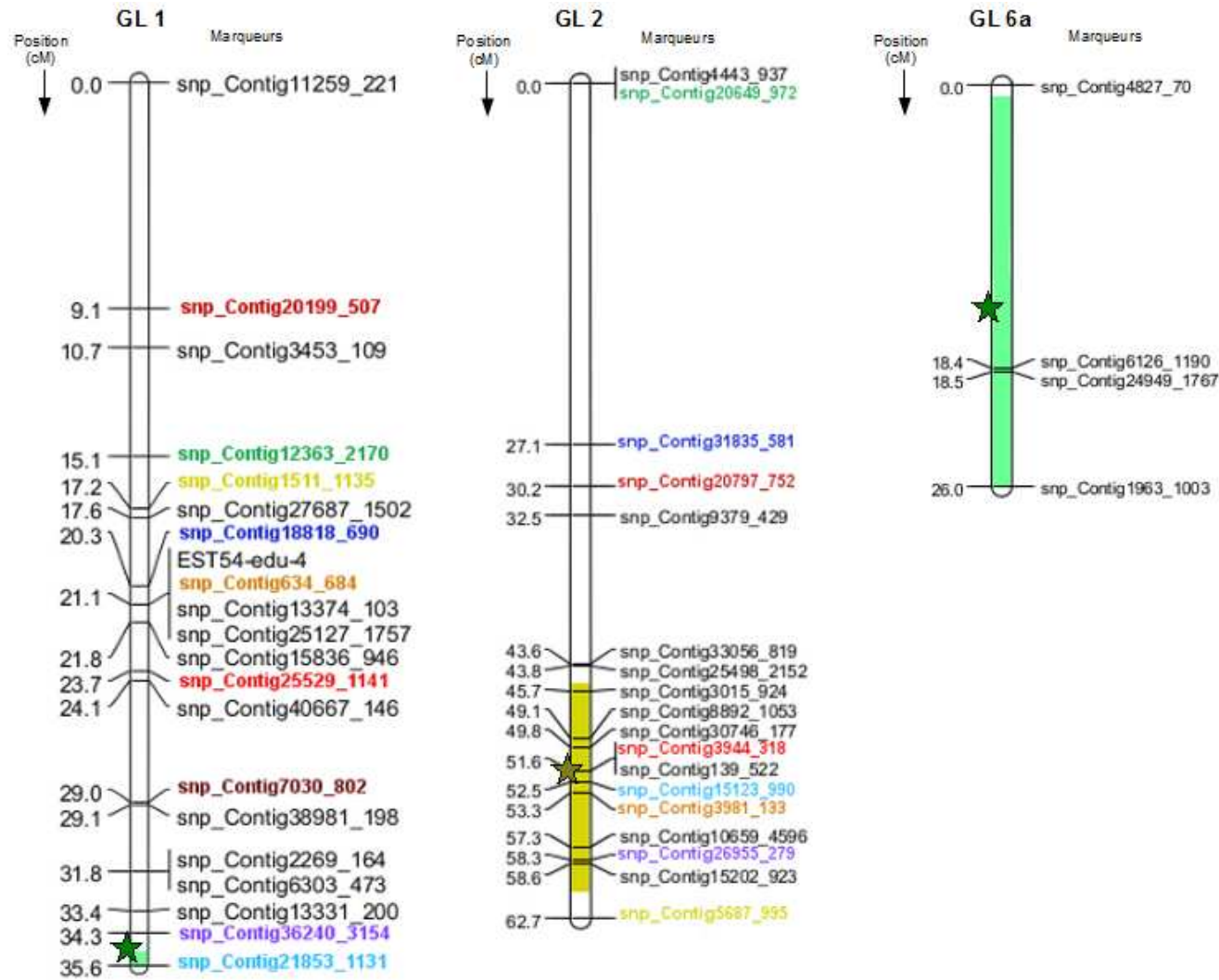
<sup>g</sup> : LOD score à  $P < 0,05$  obtenu après 1000 itérations par le test de permutation ([Churchill and Doerge, 1994](#)) et correspondant au seuil de significativité à appliquer au GL pour la détection d'un QTL.

<sup>h</sup> : LOD score à  $P < 0,05$  de la carte globale de liaison obtenu après 1000 itérations par le test de permutation ([Churchill and Doerge, 1994](#)).

<sup>i</sup> : Pourcentage de la variance phénotypique totale expliquée par le QTL détecté. Les valeurs ne sont données que pour les QTL dont le LOD score dépasse le seuil de significativité du GL.

<sup>j</sup> : Estimation de l'effet phénotypique du QTL : R pour résistance à l'infection (phénotype « survivant non-infecté ») ; S pour sensibilité à l'infection (phénotype « mort infecté »).

<sup>k</sup> : Grand-parent(s) à l'origine de l'allèle au QTL.



**Figure 48** – Cartographie des QTL significatifs et présumés liés à la résistance ou à la sensibilité à une infection avec *B. ostreae*, chez la famille 09.67. Sur chacun des trois groupes de liaison (GL), l'intervalle de confiance de chaque région QTL est représenté par une couleur correspondant au seuil de significativité. Vert : NS ; Orange :  $P < 0,05$ ). Une étoile indique la position la plus probable du QTL. Les marqueurs identifiés par une couleur facilitent la comparaison avec les QTL de la **Figure 47**.

## IV.2.4 Discussion

### IV.2.4.1 Cinétique des mortalités

Initialement prévue pour une durée de 6 mois, la présente expérimentation a commencé le 22 avril 2010 et s'est terminée le 22 juillet 2011, soit une durée de 15 mois. La raison de cette prolongation réside dans la nature de cette expérimentation. En effet, il s'agissait de distinguer des huîtres considérées sensibles et des huîtres considérées résistantes à *B. ostreae*, en mimant le plus possible une infection naturelle; le phénotype « sensible » se traduisant par la mort des individus, associée à la présence du parasite, et le phénotype « résistant » par leur survie, à l'issue de la période propice au développement du parasite. La recherche de régions du génome liées à ces deux phénotypes nécessitait d'avoir suffisamment d'individus dans chacune des deux catégories, pour chaque famille testée, afin d'optimiser la puissance des tests statistiques.

En milieu naturel, étant donné que le pic de prévalence de la bonamiose se produit généralement à la fin de l'hiver (Culloty and Mulcahy, 1996; Arzul *et al.*, 2005), nous avons essayé de lancer cette expérimentation dès la fin janvier 2010. Pour pouvoir lancer cette expérience d'infection par cohabitation, il était nécessaire de disposer d'au moins  $400 \cdot 10^6$  parasites, après purification, soit  $1 \cdot 10^6$  parasites par huître à sur-infecter (Lallias *et al.*, 2008). Cette quantité de parasites a été obtenue vers la fin avril.

Malgré le lancement tardif de l'expérience, des mortalités importantes se sont produites de début mai à début août 2010 chez les huîtres sauvages sur-infectées (28 %). Cependant, la recherche de *B. ostreae* chez ces individus, par frottis de tissu branchial, n'a permis d'observer qu'une faible fréquence de détection (22,3 % des huîtres mortes). La sur-infection expérimentale ayant été effectuée par injection au niveau du muscle adducteur, la présence du parasite au niveau des branchies devait refléter le développement de l'infection au sein de l'huître et la potentialité de transmission par cohabitation. Il est donc possible que les huîtres réservoirs soient mortes davantage par sensibilité à la présence du parasite, plutôt que par conséquence de sa prolifération. Par conséquent, lors de cette première phase de l'expérience, peu de parasites ont été relargués dans l'eau des bacs et ont été captés par les huîtres testées. En effet, seules 7 % des huîtres testées (9,6 % chez la famille 09.04; 5,6 % chez 09.09 et 5,2 % chez 09.67) sont mortes pendant cette période. *B. ostreae* a été détecté chez 7,1 % de ces huîtres mortes. De la même façon que pour les huîtres réservoirs, dans les premiers mois de l'expérience, il est possible que les huîtres testées soient davantage mortes par sensibilité à la présence du parasite, plutôt que par conséquence de sa prolifération. Les effectifs d'huîtres testées de phénotype « sensible » n'étant pas suffisants pour les analyses, l'expérimentation a été prolongée jusqu'à la fin de la deuxième période propice au développement du parasite.

De la mi-août à la fin décembre 2010, la diminution progressive de la température de l'eau à 5 °C a coïncidé avec un ralentissement des mortalités. Celles-ci se sont ensuite accélérées à partir de début janvier lorsque les températures se sont élevées et se sont stabilisées autour de 10 °C. À partir de mars, coïncidant avec la hausse progressive de la température de l'eau, une recrudescence

cence de mortalités s'est produite. Pendant cette période, le parasite a de nouveau été détecté sur les huîtres mortes, dans les deux catégories : huîtres réservoirs (57,1 %) et huîtres testées (35,6 % dont 66,7 % chez la famille 09.67). Ainsi, il semblerait qu'après une période d'incubation correspondant à la fin de la période estivale et à l'automne, l'infection à *B. ostreae* se soit développée à partir de l'hiver, jusqu'à stabilisation de la température de l'eau autour de 20 °C dans le milieu expérimental. Pendant l'hiver, la diminution des ressources nutritives disponibles et l'évolution des conditions environnementales (température de l'eau, salinité) peut augmenter le stress et favoriser l'infection des animaux, résultant en une augmentation des mortalités (Culloty and Mulcahy, 1996). Il se peut également que le développement du parasite ait été stimulé par les basses températures, ou par l'affaiblissement de l'hôte. À la fin de l'hiver, avec le retour aux conditions environnementales favorables, les huîtres affaiblies par le stress hivernal augmentent leur métabolisme. Il est possible que ces huîtres soient alors plus sensibles à *B. ostreae* ; il en résulterait un développement accru du parasite et donc une augmentation des mortalités.

La concordance temporelle entre l'évolution de la température de l'eau, la cinétique des mortalités d'huîtres et la détection de *B. ostreae* semble conforter l'importance des conditions environnementales, notamment la saisonnalité (Hine, 1991), dans le développement de la bonamiose. Cependant, il semblerait que le parasite du genre *Bonamia* n'ait pas le même cycle de vie chez tous ses hôtes, ou sur toutes les côtes où il est présent. Ainsi, alors que dans les eaux Atlantiques des États-Unis, une température supérieure à 20 °C semble nécessaire au développement de *Bonamia* sp. chez l'huître creuse *Crassostrea ariakensis* (Audemard *et al.*, 2008; Carnegie *et al.*, 2008), dans les eaux européennes la prévalence de *B. ostreae* semble supérieure à des températures proches de 10 °C plutôt que 20 °C, suggérant que les faibles températures peuvent affecter les capacités de défense de l'huître et/ou la capacité du parasite à infecter des huîtres saines (Arzul *et al.*, 2009). Dans la présente expérience, l'absence de détection du parasite chez les huîtres sauvages mortes à partir de juin 2011, alors que la température de l'eau avoisinait les 20 °C, semble être un argument en faveur d'une meilleure capacité des huîtres à se défendre lors de fortes températures. Néanmoins, ce phénomène n'a pas été observé au cours de l'été 2010 chez la même population d'huître, ni même au cours de l'été 2011 chez les huîtres des familles testées. En outre, la charge parasitaire maximale, mesurée chez les individus morts de la famille 09.67, continue d'augmenter malgré l'élévation des températures. En effet, cette charge maximale atteint  $8,3 \cdot 10^6$  parasites par milligramme de tissu, fin juillet, ce qui représente une très forte infection (Robert *et al.*, 2009). Ainsi, malgré quelques tendances similaires, la cinétique d'une infection à *Bonamia ostreae* ne semble pas suivre un modèle cohérent d'une année sur l'autre, ni même chez des huîtres issues de familles ou de lots différents. Les comparaisons sont difficiles entre les résultats des différentes études particulièrement du fait de la saisonnalité, du matériel biologique utilisé et des conditions expérimentales appliquées.

Par ailleurs, malgré une différence non significative entre les taux moyen de mortalités chez les trois familles testées, à l'issue de l'expérience, des différences de cinétique ont pu être observées. En effet, la famille 09.04 ne présentait pas de différence significative de mortalité au cours de l'expérience,

alors que les familles 09.09 ( $p < 0,01$ ) et 09.67 ( $p < 0,001$ ) présentaient très significativement plus de mortalités pendant la période qui a suivi l'hiver 2011. Ces différences de cinétique entre les familles testées reflète une différence de capacité de réponse aux conditions expérimentales (évolution de la température, développement de *B. ostreae*, etc.). Ainsi, les individus des familles 09.09 et 09.67 qui semblaient plus résistants dans la première phase du développement de *B. ostreae*, que ceux de la famille 09.04, semblent avoir été plus sensibles au cours de la deuxième phase de développement du parasite. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce phénomène. Les mortalités suivant la période hivernale peuvent s'expliquer soit comme une conséquence de l'affaiblissement des individus, pendant cette période, qui se traduit par une diminution des capacités de résistance (Arzul *et al.*, 2009); soit par une augmentation de la virulence du parasite par rapport à son premier cycle de développement. Les mortalités dépendent également du développement de l'infection dans les huîtres injectées.

#### IV.2.4.2 Diversité des QTL liés à la résistance à la bonamiose

L'objectif de la présente étude était d'estimer la diversité des QTL de réponses à une même infection à *B. ostreae*, chez plusieurs familles ségrégeantes. Pour ce faire, trois familles d'huître plate de troisième génération ( $F_2$ ), de même âge et naïves à une infection vis-à-vis du parasite responsable de la bonamiose, ont été placées pendant une année dans des conditions expérimentales identiques d'infection à *B. ostreae*. À l'issue de l'expérience de cohabitation, deux familles d'huîtres présentant suffisamment d'effectifs (30 individus) pour chacun des phénotypes « mort » et « survie » ont été analysées pour la recherche de QTL liés à la résistance à la mortalité (survie) ou à la sensibilité (mort) à la parasitose. Chez l'une de ces familles, des QTL liés aux phénotypes « mort infecté » et « survivant non-infecté » ont également pu être identifiés. Pour chacune des deux familles retenues pour la détection de QTL, la cartographie a été réalisée à partir de la carte génétique de liaison propre à cette famille [cf. **Partie III.3.2.3**]. D'autre part, étant donné que les distributions quantitatives ne suivaient pas une loi normale, les phénotypes étudiés ont été transformés en valeurs qualitatives binaires (ex. : 0 = mort ; 1 = survie); la puissance du test n'étant pas altérée par cette transformation (Visscher *et al.*, 1996).

Au total, quatre QTL significatifs et un QTL présumé, liés à la résistance ou à la sensibilité à la bonamiose, ont été identifiés chez la famille 09.04, ainsi qu'un QTL significatif et un présumé chez la famille 09.67. Chez cette deuxième famille, la recherche de régions QTL liées à la charge parasitaire a permis de confirmer l'identification des deux mêmes QTL, ainsi que de détecter un autre QTL présumé. Tous ces QTL se situent sur un total de cinq groupes de liaison différents, confirmant le caractère polygénique de la résistance à la bonamiose précédemment identifié par Lallias *et al.* (2009a).

Parmi les groupes de liaison concernés par les régions QTL liées à la résistance ou à la sensibilité à la parasitose, deux groupes sont identiques entre les deux familles (GL 1 et GL 2). Cependant, étant donné que les taux de recombinaison entre les marqueurs sont propres à chaque événement reproductif, et *a fortiori* à chaque couple reproducteur, les marqueurs ainsi que leur ordonnancement ne sont pas identiques. Nécessairement, les régions QTL ne sont donc pas exactement

positionnées sur les mêmes intervalles. Néanmoins, ces régions QTL restent relativement proches, particulièrement sur le GL 2 où plusieurs marqueurs ont été identifiés, au sein de l'intervalle de confiance du QTL, et ceci en parallèle chez les deux familles.

Chez la famille 09.04, deux autres groupes de liaison sont concernés par des QTL significatifs, dont un QTL sur le GL 3 et deux QTL sur le GL 8. Une première analyse effectuée sur le jeu de données de la famille 09.67 avait également conduit à identifier un QTL très fortement significatif sur le GL 3. Après vérification, il s'est avéré que la présence d'un marqueur très fortement distordu à proximité immédiate de la région QTL supposée semblait perturber la détection, en faussant la valeur du LOD et le pourcentage de variance expliquée. En effet, bien que ce marqueur ne semblait pas responsable de l'effet du QTL (test du  $\chi^2$ ,  $p = 1,00$ ), en l'excluant du jeu de données, le score de LOD de la précédente région détectée devenait très inférieur au seuil de significativité. En effet, il est possible que des fréquences alléliques fortement déséquilibrées puissent générer des valeurs erronées limitant alors l'efficacité de la cartographie QTL (Ytounel, 2008). Cet artefact a également été détecté au cours de l'analyse QTL vis-à-vis de la charge parasitaire, chez cette même famille.

Chez la famille 09.67, l'analyse se base sur des effectifs relativement faibles, de l'ordre de 34 - 44 individus et 17 - 15 individus respectivement pour les phénotypes « mort » et « survie », et pour les phénotypes « mort infecté » et « survivant non-infecté ». Bien que la puissance de l'analyse liée à la charge parasitaire soit renforcée par l'approche par génotypage sélectif (typage des phénotypes extrêmes, Lander and Botstein, 1989), les effectifs étudiés restent très faibles pour une analyse QTL. Il est ainsi fort possible que ces résultats soient soumis à l'effet Beavis (Xu, 2003). Cet effet prévoit que les caractéristiques des QTL détectés soient sur-estimées, mais également que tous les QTL ne soient pas détectés, particulièrement les QTL à effet faible (< 1 % de variance expliquée). Le nombre d'individus nécessaires pour détecter un QTL est cependant difficile à calculer. Il dépend notamment de la taille de la population, du type de croisement, de l'effet de dominance des allèles au QTL, ainsi que de l'intervalle entre marqueurs (Manly and Olson, 1999; Erickson *et al.*, 2004). En outre, comme dans le cas présent, le nombre d'individus disponibles est également fortement dépendant des conditions expérimentales.

Cependant, les conclusions de l'analyse sont renforcées par le fait d'avoir détecté, de façon conjointe, chez plusieurs familles, des régions QTL significatives et présumées sur les mêmes groupes de liaison. En effet, comme ce fut le cas chez l'huître creuse pour la recherche de QTL liés à la mortalité estivale (Sauvage, 2008), l'analyse en parallèle de plusieurs familles de plein-frères a permis de confirmer la présence de certains QTL.

En outre, cette analyse a également permis de détecter différents QTL ségrégeants uniquement chez l'une des deux familles. Ces différences de détection peuvent en partie s'expliquer par les fonds génétiques différents des deux familles. En effet, les grand-parents à l'origine des croisements ne provenant pas de lignées pures (homozygotes pour un allèle différent), les allèles ne sont pas fixés pour le caractère de la résistance ou de la sensibilité à la bonamiose.



Ces différences peuvent également s'expliquer du fait que les individus utilisés ont été échantillonnés à des périodes potentiellement différentes du développement du parasite, et donc à des moments différents du processus de réponse de l'hôte. C'est-à-dire que les gènes associés aux régions QTL identifiées ne seraient pas favorables (ou défavorables) sur l'ensemble de la durée de l'infection. Seuls les QTL liés aux gènes impliqués dans la réponse de l'hôte, à un certain moment de l'infection, seraient soumis à la sélection et donc détectables, du fait de la différence de fréquences alléliques entre les deux phénotypes étudiés, pour les marqueurs qui leurs sont associés. Ce phénomène serait assimilable à un balayage sélectif des allèles défavorables à un instant donné de l'infection, mais qui serait incomplet à cause de l'échelle de temps considéré (durée de l'étude). Les travaux effectués sur l'évolution au cours du temps de l'expression de gènes et d'activités hématocytaires potentiellement impliqués dans la réponse à *B. ostreae* tendent à confirmer l'idée d'un différentiel de réponses au cours du temps (Morga, 2010). En effet, étant donné que des fortes mortalités se sont produites chez la famille 09.04, dès la première phase de développement du parasite, les individus ont été échantillonnés de façon équivalente sur toute la durée de l'expérience (2010 et 2011). Chez la famille 09.67, les individus utilisés proviennent majoritairement de la deuxième phase de développement du parasite (2011). Il est donc possible que les QTL détectés ne correspondent pas aux mêmes réponses, ni que celles-ci soient regardées à leur optimum. C'est-à-dire que les QTL détectés chez la famille 09.04 seraient associés à des gènes qui auraient un effet additif global (constant) sur la totalité de la durée de l'expérience, ou qui serait soumis à la sélection dès le début de l'infection. Par conséquent, les fréquences alléliques aux loci liés aux gènes sous sélection ne varieraient pas et seraient détectables pendant la totalité de l'expérience. *A contrario*, les autres QTL (détectés ou non) verraient leur(s) effet(s) dilué(s) sur cette période. Ainsi, il est possible que le QTL détecté uniquement sur le GL 6a de la famille 09.67 ait un effet additif plus spécifique à la deuxième période de développement du parasite. Une autre hypothèse pour expliquer ces différences de détection réside dans les faibles effectifs d'huîtres analysées, et qui ne permettraient pas de détecter systématiquement les mêmes QTL.

L'effet d'un QTL se définit comme la proportion de la variance génétique, observée chez une population ségrégeante, qui est expliquée par le QTL (Erickson *et al.*, 2004). Il est qualifié d'effet faible pour des valeurs inférieures à 1 %, d'effet modéré entre 1 % et 15 - 20 % et d'effet fort pour des valeurs supérieures à 15 - 20 % (Manly and Olson, 1999; Erickson *et al.*, 2004). Dans le cadre de la présente étude, un QTL à effet fort a été identifié sur le GL 2 simultanément chez les deux familles, pour les phénotypes mort/survie et mort infecté/survivant non-infecté. Trois QTL à effet modéré ont également été identifiés chez la famille 09.04. Pour les QTL présumés, les effets n'ont pas été pris en compte car, du fait de la non-significativité du test, les valeurs pourraient être sur- ou sous-estimées. La détection d'un petit nombre de QTL à effet modéré ou large est en accord avec les résultats d'autres études effectuées sur la résistance ou la sensibilité à une infection parasitaire (Lallias *et al.*, 2009a; Sauvage *et al.*, 2010) ou sur l'adaptation à des paramètres environnementaux (Le Bras *et al.*, 2011).

D'autre part, il est important de remarquer que le même QTL à effet large a été identifié pour les phénotypes mort/survie et mort infecté/survivant non-infecté. Ainsi, cette étude a notamment

permis de confirmer la prolifération du parasite comme la cause probable des mortalités, malgré l'absence de détection du parasite chez certains individus. Aussi, il est possible qu'une charge supérieure à  $1.10^3$  parasites par milligramme de tissu soit un bon estimateur de la sensibilité des individus vis-à-vis de la bonamiose. Malgré le fait que ce paramètre quantitatif reste difficile à mesurer par biopsie, étant donné que cette dernière affaiblit les individus, il peut être un bon prédicteur de futures mortalités.

De façon générale, l'effet additif des QTL communs aux deux familles, ainsi que l'effet additif des QTL pour les deux phénotypes étudiés chez la famille 09.67 vont dans le même sens. Malgré quelques exceptions, les allèles liés à la sensibilité à *B. ostreae* (phénotypes « mort » ou « mort infecté ») sont préférentiellement transmis à la génération  $F_2$  par le grand-parent d'origine sauvage. De la même façon, les allèles liés à la résistance à la parasitose (phénotypes « survie » ou « survivant non-infecté ») sont préférentiellement transmis par le grand-parent issu de la lignée sélectionnée. Ces résultats tendent ainsi à conforter le caractère héritable de la résistance ou de la sensibilité au parasite *Bonamia ostreae*. Ces résultats confirment également l'efficacité de la sélection de lignées sur la base de la mort ou de la survie lors de challenges expérimentaux à la bonamiose.

Dans le cadre de conditions expérimentales similaires, une précédente étude a déjà permis d'identifier plusieurs QTL liés à la résistance ou à la sensibilité à la bonamiose (Lallias *et al.*, 2009a). Comme nous l'avons vu dans la **Partie II.1.4**, une des familles  $F_2$  de la présente étude (09.04) est cousine de celle qui a été utilisée par Lallias et collaborateurs. C'est-à-dire que les individus parentaux  $F_1$  appartiennent à la même famille produite à partir des mêmes individus  $F_0$ . Bien que l'effet d'un QTL ne soit pas supposé être le même dans chaque famille malgré un bagage génétique commun (Knott, 2005), il est intéressant de pouvoir comparer les QTL détectés dans chacune de ces expériences. En effet, si un QTL existe, celui-ci doit nécessairement ségréger chez plus d'une famille (Knott, 2005), et nous devrions donc retrouver des régions communes sur les GL homologues. Pour pouvoir effectuer des comparaisons entre les deux familles cousines et la nouvelle famille (09.67), il était nécessaire de disposer de marqueurs moléculaires communs entre les trois cartes génétiques de liaison. Dans cet objectif, la carte de liaison de la famille 05.04 (Lallias *et al.*, 2009a) a été complétée par typage des marqueurs SNP sur les individus utilisés par Lallias et collaborateurs pour la détection de QTL. La nouvelle carte de liaison (05.04\_2) a été construite dans la **Partie III.3.3.2** du présent manuscrit.

Les cinq QTL identifiés par Lallias *et al.* (2009a) se situent sur les GL 1, GL 3, GL 5 et GL 8 de la carte 05.04\_2. Deux des groupes de liaison (GL 1 et GL 3) sont concernés par la détection de QTL, simultanément chez les trois familles, et un troisième groupe (GL 8) l'est uniquement avec la famille 09.04 [Figure 49].

Comme nous l'avons vu précédemment, les intervalles de confiance et les marqueurs associés aux QTL ne sont pas identiques entre les trois familles. Néanmoins, il existe un chevauchement des

régions détectées, particulièrement sur le GL 1. Sur ce GL en particulier, il est possible que les régions détectées correspondent finalement à la même région QTL commune, voire aux mêmes régions communes. En effet, la dimension de l'intervalle de confiance de la région QTL détectée chez la famille 09.04 (5 cM) est compatible avec l'écart entre les marqueurs associés au(x) QTL chez la famille 05.04. Étant donné les différences de taux de recombinaison aux marqueurs, entre les familles, il est effectivement possible que plusieurs QTL soient réellement positionnés dans la partie inférieure du groupement. Quoi qu'il en soit, cette présence simultanée de région(s) QTL sur ces GL homologues tend à confirmer la potentialité des régions présumées ( $p < 0,10$ ) chez les deux familles étudiées en 2010-2011.

Sur les autres GL comparés, un défaut de marqueurs communs entre les familles ne permet pas de conclure s'il s'agit d'un ou de plusieurs QTL. De plus, les marqueurs associés aux QTL sur les GL 3 et GL 8 de la famille 05.04 n'ont pu être cartographiés après l'analyse de liaison, lors de l'ajout des marqueurs SNP sur la carte de liaison publiée par Lallias et collaborateurs [cf. **Partie III.3.4**]. Les positions attribuées à ces marqueurs sur ces deux GL [**Figure 49**] tiennent compte de la force de liaison qu'ils ont avec les autres marqueurs cartographiés par Lallias et collaborateurs. Cependant, s'ils avaient pu être cartographiés, il est probable que de nouvelles associations entre marqueurs auraient pu être observées, modifiant alors leur position. Il n'est donc pas possible d'effectuer une déduction sur la potentialité d'un ou de plusieurs QTL différents ou communs entre ces familles, pour ces GL. Cependant, il s'avère que tous ces QTL sont importants pour la sensibilité ou la résistance à la bonamiose.

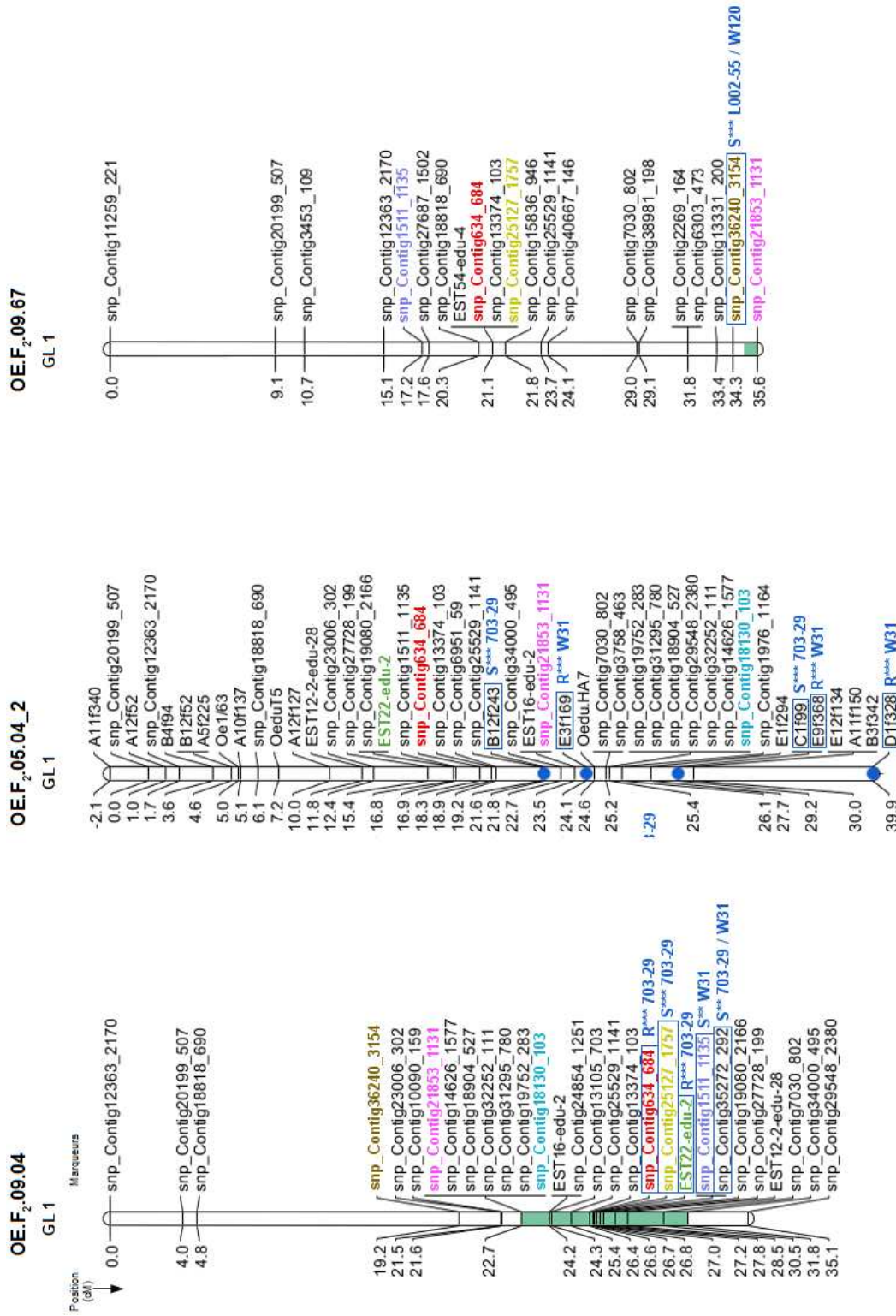


Figure 49 - Continue.

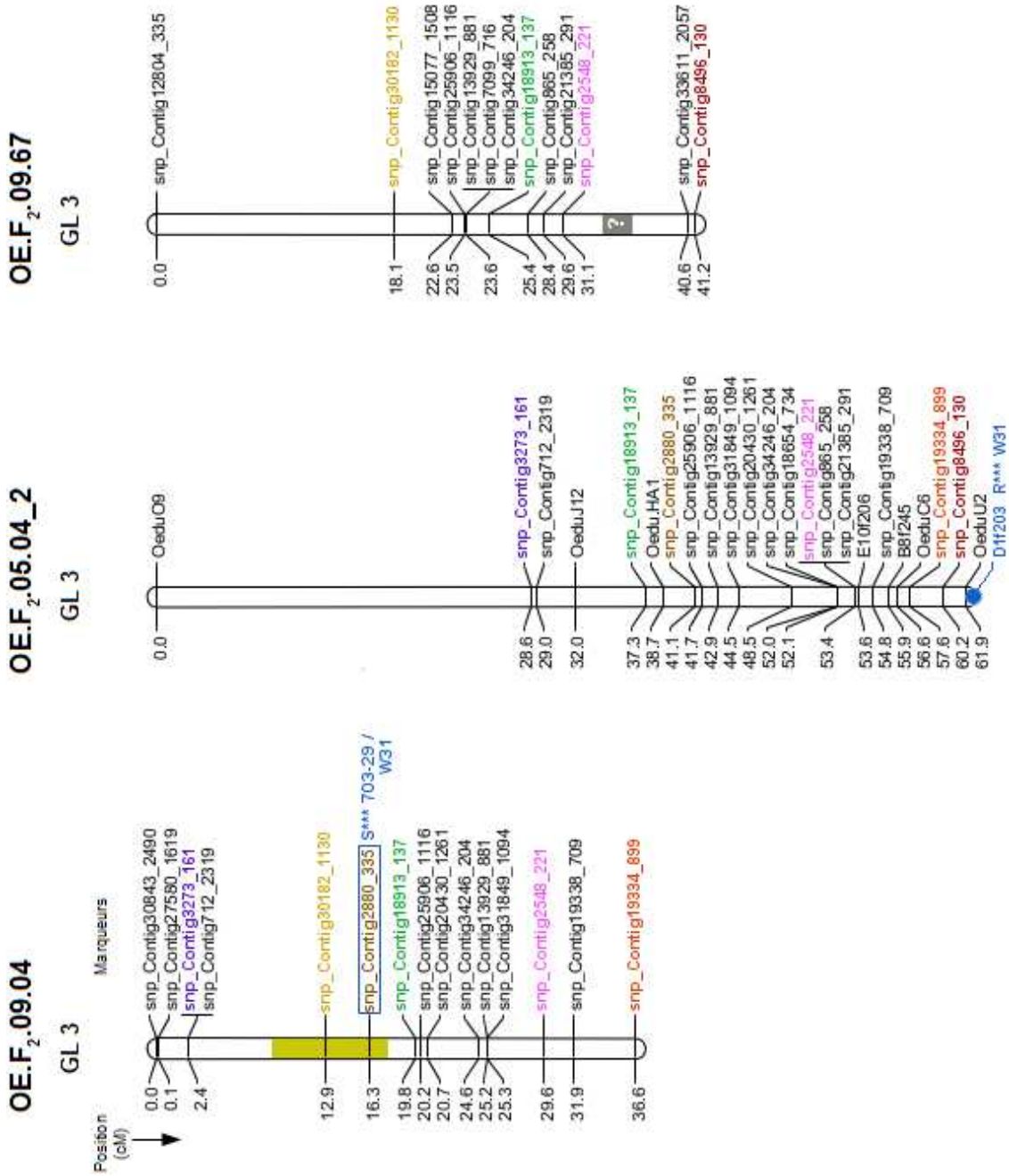
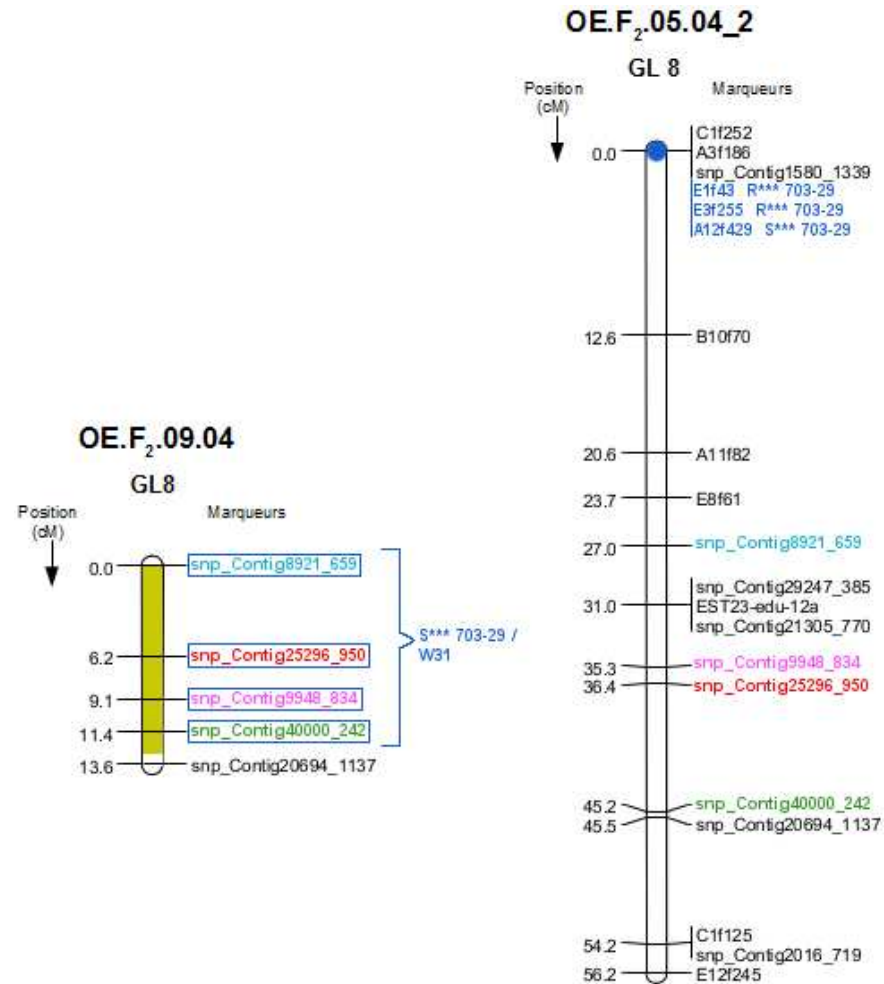


Figure 49 - Continue.



**Figure 49** – Cartographie comparée des QTL liés à une infection à *B. ostreae*, chez les familles 09.04, 05.04.2 et 09.67. Deux groupes de liaison (GL) sont comparés entre les 3 familles, et un GL entre 2 familles. Chaque marqueur en couleur borne l'intervalle de confiance ou fait partie d'une région QTL, et est commun à un ou aux deux groupes homologues. L'intervalle de confiance des QTL est représenté par une couleur correspondant au seuil de significativité. Vert : NS ; Orange clair :  $P < 0,05$  ; gris : QTL douteux (voir discussion) mentionné à titre d'information. Étant donné que des marqueurs ont été ajoutés sur la carte 05.04.2, l'ordre des marqueurs et les distances sont modifiés par rapport aux données publiées (Lallias *et al.*, 2009a). Par conséquent, les marqueurs associés aux régions QTL ainsi que leur position sur le GL sont indiqués en bleu. Chez les deux autres familles, un encadré bleu indique les marqueurs associés aux QTL. L'effet additif (R : résistance ; S : sensibilité) ainsi que le seuil de significativité (\*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ) et le grand-parent à l'origine de l'allèle au QTL sont indiqués.

Il est à noter que sur l'ensemble des QTL identifiés au sein de chacune des familles (Lallias *et al.*, 2009a, et présente étude), certains sont potentiellement propres à chacune d'entre-elles ou aux conditions de l'infection expérimentale. En effet, les deux QTL à effet large identifiés conjointement chez les familles 09.04 et 09.67 sur le GL 2 n'ont pas été retrouvés chez la famille 05.04. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène entre les familles cousines 05.04 et 09.04 réside dans le fait que les individus  $F_0$  ne proviennent pas de lignées pures. Ainsi, il est possible que les allèles des grand-parents  $F_0$  aient ségrégué de façon différente chez les parents  $F_1$ , et ceci malgré un fond génétique identique. Par exemple, une homozygotie chez les parents  $F_1$  pour l'allèle d'intérêt ne permettrait pas une ségrégation différentielle aux descendants  $F_2$  (allèle fixé), empêchant ainsi la détection de la région QTL.

Une autre hypothèse plus probable réside dans le fait que les QTL détectés entre les familles cousines sont associés à des réponses différentes de l'hôte, dans des conditions expérimentales non totalement identiques malgré leurs similarités (infection par cohabitation, conditions stringentes pour le développement de l'hôte mais favorables au parasite, etc.). Ces différences peuvent être notamment liées au parasite lui-même, telle qu'une différence de virulence ou de souche. Ainsi, il est possible que l'hôte adapte ses réponses physiologiques à chaque épisode infectieux. Les gènes liés aux régions QTL identifiées ne seraient alors pas systématiquement favorables ou défavorables vis-à-vis de la parasitose. Il s'agirait alors d'un mécanisme plus complexe, entre le fonds génétique de l'hôte (régions QTL) et sa capacité à l'exprimer (physiologie), à une période donnée.

Parmi les marqueurs moléculaires ségrégeants chez les trois familles étudiées, et associés ou compris dans l'intervalle de confiance des régions QTL, cinq marqueurs ont été développés spécifiquement sur des portions de gènes potentiellement impliqués dans la réponse de l'hôte vis-à-vis de la bonamiose [SNP *in vitro*, cf. **Partie III.2**]. Trois de ces SNP, cartographiés dans l'intervalle du QTL positionné sur le GL 1, correspondent à des gènes impliqués dans la chaîne respiratoire (EST12-2-edu-28, homologue à une short-chain dehydrogenase), la structure ribosomale (EST22-edu-2, homologue à la protéine ribosomale L3; lié au phénotype « mort ») et les mécanismes de l'épissage (EST16-edu-2, homologue à snRNA U2).

Un quatrième SNP (EST54-edu-4) ne ségrège pas chez la famille 09.04 mais est potentiellement contenu dans l'intervalle du QTL cartographié sur le GL 1. Ce SNP est positionné sur un EST homologue au gène codant pour la cAMP-responsive element binding protein (CREB). Le CREB est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'apoptose (Thiel *et al.*, 2005), via la voie de l'AMPc. Cette voie module notamment l'expression d'un gène du système du complément, le gène C1q (Bordin and Tan, 2001), qui est impliqué dans les mécanismes immunitaires tels que la phagocytose, l'apoptose ou encore le métabolisme oxydatif (Kishore and Reid, 2000; Kishore *et al.*, 2004).

Le cinquième SNP (EST23-edu-12a), potentiellement contenu dans l'intervalle du QTL cartographié sur le GL 8, est positionné sur un EST homologue au gène codant pour la Tyrosyl-tRNA synthétase. Ce gène code pour une enzyme possédant deux activités cytokines distinctes, notamment impliquées dans les mécanismes de l'inflammation et de l'apoptose, via la production du TNF (Tumor Necrosis Factor), et d'interleukines (Wakasugi and Schimmel, 1999).

L'utilisation de SNP *in vitro* a permis d'avoir une approximation de la localisation des gènes à certains QTL en identifiant des gènes physiquement proches sur la carte génétique de liaison. Néanmoins, ces SNP ne peuvent en aucun cas être directement utilisés pour inférer le ou les gènes impliqués dans les mécanismes de résistance ou de sensibilité à la bonamiose. En effet, les intervalles de confiance des QTL identifiés étant relativement grands (de 0,5 cM à 25 cM), il peuvent contenir plusieurs centaines de gènes dont seulement une portion sont impliqués dans les mécanismes de réponse de *O. edulis* vis-à-vis de *B. ostreae*. Ainsi, les gènes ciblés par le développement des SNP *in vitro*, bien que potentiellement impliqués dans ces mécanismes (Morga *et al.*, 2011a, 2012), ne correspondent pas nécessairement aux gènes causaux de la réponse immunitaire. En effet, il peut par exemple s'agir de gènes participants à la cascade de régulation d'autres gènes impliqués plus directement dans ces mécanismes.

#### IV.2.5 Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la recherche de QTL liés aux réponses de l'huître plate européenne vis-à-vis du parasite *Bonamia ostreae*, l'expérience d'infection a occasionné un suivi quotidien des mortalités sur une durée de 15 mois. Ce suivi a notamment permis d'aborder la cinétique du développement du parasite, et ceci chez différentes populations génétiques (huîtres sauvages, 3 familles ségrégeantes). Malgré quelques tendances similaires, la cinétique d'une infection à *B. ostreae* ne semble pas suivre un modèle cohérent, ni d'une année sur l'autre, ni entre les populations hôtes considérées. Néanmoins, la concordance temporelle entre l'évolution de la température de l'eau, la cinétique des mortalités d'huîtres et la détection du parasite semble conforter l'importance des conditions environnementales, telle que la saisonnalité, dans son développement et sa propagation. Les résultats de détection suggèrent que la capacité d'infection du parasite soit favorisée par les basses températures (< 10 °C) et amoindrie par les fortes températures (> 20 °C); celles-ci ayant également un effet sur la capacité de l'huître à mobiliser ses mécanismes de défenses.

La présente étude a permis de détecter un total de 5 QTL significatifs et présumés chez la famille 09.04 ainsi que 3 QTL significatifs et présumés chez la famille 09.67. Parmi ces QTL, 1 QTL à effet large et 1 QTL présumé sont potentiellement communs entre les deux familles ségrégeantes étudiées au cours de la même expérience d'infection par cohabitation avec le parasite *B. ostreae*. Ces régions, qu'elles soient détectées chez une seule famille ou simultanément chez plusieurs familles, sont autant de régions à analyser de façon plus précise.

En effet, malgré la bonne résolution des cartes génétiques de liaison utilisées pour la cartographie (moyenne des intervalles de 3,5 à 4,8 cM, cf. **Partie III.3.2.3**), ces QTL ne sont pas utilisables en l'état pour une implémentation pour sélection assistée par marqueurs (MAS). Effectivement, de nombreux gènes et de nombreux polymorphismes sont encore compris à l'intérieur de ces intervalles. Il s'avère donc primordial d'affiner ces intervalles afin de cibler plus précisément les gènes associés aux mécanismes de réponse de l'huître à son parasite, et afin de mieux comprendre l'architecture génétique des caractères étudiés. Pour ce faire, une méthode de cartographie fine devra être mise en œuvre afin d'augmenter encore davantage la densité en marqueurs moléculaires [cf. **Partie III.3.4**].



Dans le cadre de cette étude, des marqueurs moléculaires ont été cartographiés dans certains intervalles de confiance des QTL. L'identification des gènes homologues portant ces marqueurs devrait notamment permettre d'affiner la localisation des régions d'intérêt sur les groupes de liaison identifiés dans cette étude.

La densité de la carte génétique pourrait également être accrue en optimisant la ségrégation des marqueurs au sein des familles étudiées. En effet, seuls 31 - 38 % (96 à 117 sur 309 potentiels) des marqueurs SNP typés avec succès sur les familles sont informatifs. Et 20 - 24 % (23 à 27) de ces marqueurs informatifs ont un taux de recombinaison nul avec au moins un autre marqueur et n'apportent donc pas d'information supplémentaire [cf. **Partie III.3.2.3**]. Une solution pourrait consister à accroître le taux de recombinaisons entre marqueurs, et augmenter le nombre d'individus recombinants étudiés (Georges, 2007). Une méthode facile à envisager serait de produire une nouvelle descendance  $F_1$  puis  $F_2$ , en maximisant le déséquilibre de liaison entre les deux individus  $F_0$  utilisés pour le croisement. Pour augmenter la densité des crossing-over, une alternative réside dans l'utilisation de recombinants historiques, c'est-à-dire dans l'utilisation du déséquilibre de liaison entre les populations naturelles (Georges, 2007; Ytournal, 2008). En effet, il s'avère que les grand-parents utilisés pour produire les générations ségrégeantes de la présente étude proviennent tous les deux de la même localisation géographique, la Baie de Quiberon (Martin *et al.*, 1992; Lallias, 2007). Il s'agirait alors de croiser comme précédemment un individu issu d'une lignée sélectionnée pour la moindre mortalité associée à *B. ostreae* (provenant de la Baie de Quiberon), avec un individu sauvage issu d'une population génétiquement et géographiquement distincte et qui ne serait pas en contact avec *B. ostreae* (population naïve). Un individu provenant d'une population du Danemark, de Norvège ou de l'Est de la Méditerranée (Launey *et al.*, 2002, et cf. **Partie V**) pourrait par exemple être un bon candidat. La principale difficulté résiderait dans l'adaptation de cet individu aux conditions environnementales locales et dans le suivi du croisement. Ensuite, la génération  $F_2$  devrait ségréger davantage de marqueurs moléculaires que les familles étudiées dans le cadre de cette étude.

D'autre part, les résultats de la présente étude ont pu être comparés avec les QTL identifiés par Lallias et collaborateurs (famille 05.04, 2009a), grâce à la présence de marqueurs communs entre les cartes de liaison des différentes familles [cf. **Partie III.3.3.2**]. Au total, des QTL ont été identifiés sur six groupes de liaison différents. Deux groupes de liaison portant des QTL ont été identifiés à la fois chez les trois familles, et un autre est uniquement commun aux deux familles expérimentées en 2010-2011. Un autre GL portant un ou plusieurs QTL est également commun entre les familles cousines (mêmes grand-parents  $F_0$ ) 05.04 et 09.04. Ce différentiel de détection suggère d'une part que tous les marqueurs associés aux QTL ne ségrégent pas chez toutes les familles, ne permettant pas de détecter tous les QTL impliqués dans les mécanismes de réponse à la bonamiose. Ce phénomène a également pu être observé dans le cas d'un fond génétique identique (cas des familles 05.04 et 09.04), lorsque les grand-parents à l'origine des générations  $F_1$  ne sont pas issus de lignées pures. Il est donc nécessaire d'étudier différentes familles afin de détecter différentes régions du génome impliquées dans ces mécanismes.

D'autre part, ce différentiel suggère également que, malgré des conditions expérimentales analogues, il est possible que l'huître adapte ses réponses à chaque épisode infectieux (années 2006, 2010, 2011). C'est-à-dire que les gènes exprimés, provoquant un avantage ou un désavantage au moment où les phénotypes sont échantillonnés (ici à la mort de l'individu), seraient soumis à la sélection. Par conséquent, les individus présentant un différentiel de polymorphisme (lié à un marqueur moléculaire), en déséquilibre de liaison avec l'élément apportant un avantage ou un désavantage et donc soumis à la sélection, seraient alors détectables. Les autres gènes potentiellement impliqués n'étant pas soumis à la sélection au moment de l'échantillonnage, le polymorphisme lié à ces gènes serait distribué de façon analogue chez les individus sensibles et les individus résistants à la mortalité. Cet effet additif (allèle favorable, défavorable) serait alors « dilué » et donc non détecté. Les mécanismes de réponse de l'huître vis-à-vis de son parasite seraient un compromis entre le fonds génétique de l'hôte (régions QTL) et sa capacité à l'exprimer (physiologie), à une période donnée.

Un problème fréquemment rencontré en cartographie de QTL est l'hétérogénéité génétique de phénotypes semblables (Ytournel, 2008). Il s'avère donc souvent nécessaire de préciser le phénotype afin de cibler plus précisément les gènes impliqués (Le Bras *et al.*, 2011). Pour cela, il est intéressant de développer une approche plus fonctionnelle des mécanismes de réponse, notamment par l'étude d'un éventuel différentiel d'activités cellulaires ou d'expressions géniques en lien avec la réponse immunitaire. Cette approche est abordée dans la **Partie IV.3** du manuscrit, et correspond à la recherche de QTL d'expression (eQTL) et de QTL liés à des activités cellulaires impliquées dans les mécanismes de réponse de *O. edulis* vis-à-vis de la bonamiose. Elle s'appuie notamment sur les travaux réalisés par (Morga, 2010; Morga *et al.*, 2009, 2011a,b, 2012).

## IV.3 À l'échelle intra-familiale : approche eQTL

### IV.3.1 Introduction

Comme nous venons de le voir dans la **Partie IV.2**, plusieurs régions génomiques associées aux mécanismes de réponse de l'huître plate vis-à-vis de la bonamiose ont été identifiées. Quatre de ces QTL, communs à plusieurs familles ou épisodes infectieux, s'avèrent particulièrement prometteurs pour une implémentation dans un programme de sélection assistée par marqueurs. Néanmoins, pour qu'un tel programme soit efficace, il s'avère nécessaire d'affiner encore davantage la localisation des QTL (Spelman and van Arendonk, 1997), et de détecter notamment d'éventuels effets d'épistasie ou d'interférence avec d'autres fonctions biologiques (Danzmann *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2009). Ainsi, à l'heure actuelle, malgré la multitude d'études portant sur l'identification de QTL, sur une grande variété d'espèces, la plupart sont encore à l'étude où en phase préliminaire d'implémentation (Ibañez-Escriche and Gonzalez-Recio, 2011; Ødegård *et al.*, 2011).

Dans le cas de l'huître plate européenne, les variabilités individuelles de sensibilité à la bonamiose représentent un potentiel d'action pour la sélection (Hervio *et al.*, 1995). Cette sensibilité peut résulter d'une variation physiologique due à l'influence de l'environnement, de l'hérédité, ou à la réunion des deux (Gaffney and Bushek, 1996). Deux types de réponses physiologiques à la bonamiose ont déjà été étudiés (Morga *et al.*, 2009, 2011a,b, 2012; Martín-Gómez *et al.*, 2012). Il s'agit de réponses cellulaires (activités hémocytaires) et de réponses moléculaires (expression de certains gènes d'intérêt).

L'intérêt de la présente étude réside dans la combinaison d'une approche fonctionnelle avec une approche par cartographie afin d'identifier l'architecture génétique associée à la régulation de ces réponses. Cette étude est rendue possible grâce au caractère héritable des phénotypes liés à l'expression des gènes (Dimas and Dermitzakis, 2009). La cartographie de QTL liés à l'expression de gènes d'intérêt est nommée cartographie eQTL (*expression Quantitative Trait Loci*). Cette technique permet d'associer le polymorphisme d'une région du génome à la variation du niveau d'expression (nombre de transcrits) d'un gène mesuré.

Chez les espèces pour lesquelles un grand nombre de gènes a été séquencé, la découverte d'eQTL est généralement facilitée par l'utilisation d'une puce d'expression (microarray) regroupant plusieurs milliers de séquences de gènes cibles. Il s'agit alors de détecter des gènes candidats différentiellement exprimés entre deux phénotypes d'intérêt, parmi l'ensemble des gènes potentiels positionnés sur la puce (Liu *et al.*, 2001; Michaelson *et al.*, 2009; Verdugo *et al.*, 2010).

Une fois les régions eQTL primo-localisées, l'effort est dirigé vers une cartographie fine de ces régions. Il s'agit alors de typer un grand nombre de sites polymorphes situés à proximité physique du gène ou dans les régions régulatrices d'autres gènes, afin d'identifier le ou les variants (sites polymorphes) associés aux mécanismes de régulation des niveaux d'expression (Dixon *et al.*, 2007). Un variant cartographié à proximité du gène dont il modifie l'expression est nommé eQTL local

(*proximal variant*), alors qu'un variant situé à plus de 1 mégabase où sur un autre chromosome est nommé eQTL distant (*distal variant*) (Gilad *et al.*, 2008). Un eQTL local est souvent qualifié de *cis*-eQTL en raison du fait qu'il se situe souvent dans la région promotrice du gène, alors qu'un eQTL distant agit plus souvent en tant que facteur de transcription et est donc qualifié de *trans*-eQTL (Michaelson *et al.*, 2009).

Chez les mollusques bivalves, une puce d'expression est notamment disponible pour plusieurs espèces d'huîtres creuses (*C. virginica*, *C. gigas*, Jenny *et al.*, 2007). Malheureusement celles-ci ne sont pas utilisables pour l'huître plate européenne en raison de la distance génétique existant entre ces espèces.

Une autre approche consiste à identifier des gènes différentiellement exprimés entre deux phénotypes d'intérêt, par la technique d'hybridation soustractive et suppressive (SSH, Diatchenko *et al.*, 1996). Les gènes candidats ainsi identifiés sont ensuite validés individuellement par PCR en temps réel, puis cartographiés.

Une approche SSH a déjà été développée chez *O. edulis*, dans le contexte de la réponse à la bonamiose (Morga *et al.*, 2011a, 2012; Martín-Gómez *et al.*, 2012). Parmi les gènes candidats identifiés, 14 gènes ont par la suite été validés comme potentiellement impliqués dans la réponse de *O. edulis* vis-à-vis de *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2011a,b, 2012). Dans le cadre de la présente étude, 5 de ces gènes d'intérêt, impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation du parasite (Galectine, GU320697), dans les mécanismes de réponse à une infection et la détoxification (C1q, GU814271 ; Oe-SOD, GU320695) ou dans la régulation de l'apoptose (Fas ligand, GU320694 ; IAP, GU814273), ont été étudiés par PCR en temps réel puis cartographiés. Cette approche gènes candidats / cartographie a également été complétée par la cartographie de QTL liés à deux activités hémocytaires (capacité de phagocytose, production d'espèces oxygénées réactives), potentiellement influencées par l'infection à *Bonamia ostreae* (Morga *et al.*, 2009, 2011b), et étudiées par cytométrie en flux.

Pour cette étude, les marqueurs moléculaires utilisés pour la cartographie ont été développés de façon à maximiser la couverture du génome, pour une primo-localisation des régions QTL et eQTL. La cartographie consistait alors à identifier des régions du génome associées à la variabilité de l'activité hémocytaire mesurée ou impliquées dans les mécanismes de régulation de l'expression des gènes étudiés, sans pouvoir présumer ni de la nature, ni de la localisation exacte du polymorphisme à l'origine de la variation. Seules les régions génomiques participant à la cascade de régulation du paramètre considéré ont ainsi pu être détectées.

La cartographie des QTL associés aux deux activités hémocytaires et à l'expression des cinq gènes candidats a plusieurs objectifs. Il s'agit d'une part de préciser les phénotypes de réponse à la bonamiose en utilisant des données physiologiques fines (Nachtomy *et al.*, 2007; Le Bras *et al.*, 2011). D'autre part, il s'agit d'identifier les régions du génome impliquées dans la régulation de l'expression de ces paramètres, et de détecter un éventuel effet d'épistasie (interactions) entre

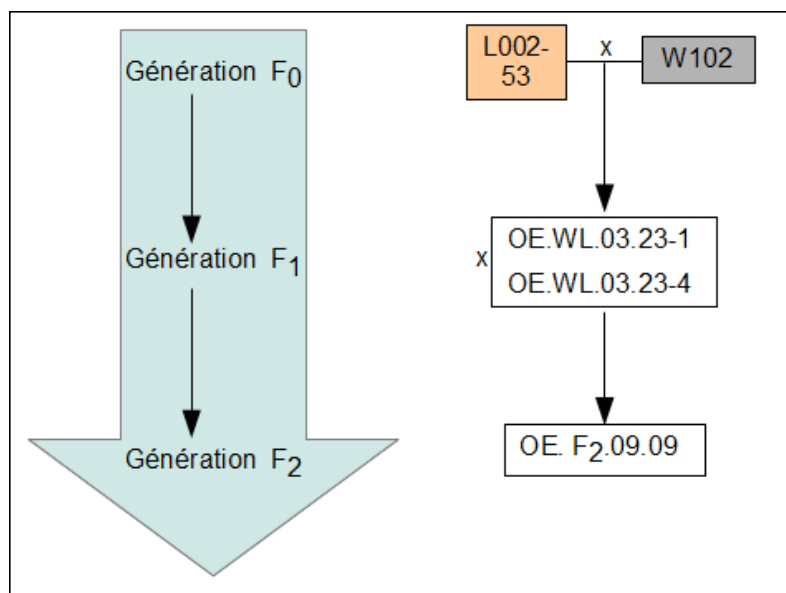
eux. Mais il s'agit également de détecter un éventuel recouvrement des régions régulatrices de ces gènes candidats avec les régions QTL déjà détectées dans le cadre de précédentes expériences d'infection (Lallias *et al.*, 2009a, et **Partie IV.2** du présent manuscrit).

Dans la présente étude, la diversité des réponses physiologiques à un même événement infectieux a été étudiée au sein d'un ensemble d'individus  $F_2$  issus d'une même famille (mêmes parents  $F_1$ ) et ayant le même parcours zootechnique. L'origine généalogique de chaque allèle au QTL et eQTL a été identifiée chez la famille ségrégeante expérimentée, grâce à la connaissance des génotypes des deux générations précédentes ( $F_1$  et  $F_0$ ).

## IV.3.2 Matériels et Méthodes

### IV.3.2.1 Carte d'identité de la famille testée

Les huîtres utilisées dans le cadre de cette expérimentation proviennent de la famille 09.09 qui a été produite à l'écloserie de La Tremblade en 2009. Il s'agit de la descendance de 2<sup>ème</sup> génération ( $F_2$ ) d'une famille ségrégeante produite par croisement bi-parental intra-familial de deux individus  $F_1$  pleins-frères (OE.WL.03.21-1 et OE.WL.03.21-4) provenant eux-même du croisement de deux individus grands-parents  $F_0$  provenant pour l'un (L002-53) d'une lignée consanguine ayant présenté de bonnes performances de survie vis à vis de la bonamiose, et pour l'autre (W102) du milieu naturel [**Figure 50** ; cf. **Partie II.1**].



**Figure 50** – Généalogie sur trois générations ( $F_0$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ) de la famille ségrégeante utilisée pour l'expérimentation d'infection par *B. ostreae*. Un individu grand-parent provient d'une lignée consanguine (en orange) ayant présenté de bonnes performances de survie vis à vis de la bonamiose, et l'autre d'un individu sauvage (en gris). La génération  $F_1$  est produite par croisement bi-parental intra-familial de deux individus pleins-frères.

Un peu plus de 300 huîtres âgées d'un an, représentant la diversité des phénotypes de tailles des individus disponibles dans la famille, ont été choisies pour l'infection expérimentale. La taille des

individus injectés varie de 1 à 4 cm de longueur. En considérant que la taille reflète des différences de fitness, et donc de génotypes, le choix des individus sur l'ensemble de la gamme de taille disponible permettait d'avoir une représentation de l'ensemble des génotypes produits par les individus parentaux.

#### IV.3.2.2 Infection expérimentale

La suspension à injecter a été obtenue par purification de cellules de *Bonamia ostreae* provenant de tissus infectés d'huître plate, selon un protocole adapté de [Mialhe et al. \(1988a\)](#). Le protocole de la purification est détaillé dans la **Partie IV.2.2.2**.

Le 13 avril 2010, trois huîtres hautement infectées par *B. ostreae* ont été traitées de façon à isoler et purifier le parasite. Un comptage sur cellule de Malassez a permis de mesurer une concentration en parasites de  $95.10^6$  cellules par mL. Pour effectuer l'injection intra-musculaire, les huîtres à injecter ont été préalablement anesthésiées dans un bain de chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ;  $\approx 50 \text{ g.L}^{-1}$ ) [cf. **Partie IV.2.2.3**].

Le 14 avril 2010, 100  $\mu\text{L}$  de la suspension parasitaire en *B. ostreae* ont été injectés dans le muscle adducteur de 313 huîtres, à raison de  $2,6.10^5$  parasites par individu, au moyen d'une seringue de 1 mL munie d'une aiguille 23G (0,6 x 25 mm).

La quantité de parasites injectés a été adaptée d'après les résultats des tests effectués par [Hervio et al. \(1995\)](#). Les individus testés dans la présente expérience étant plus jeunes que ceux utilisés par ces auteurs, et de plus petite taille, un témoin d'éventuelles mortalités liées à la technique d'injection était nécessaire. Pour cela, 70 individus supplémentaires ont été injectés avec l'eau de mer filtrée (EMF) ayant servi à diluer l'extrait de parasites purifiés.

Après injection, les 313 huîtres ont été réparties dans 6 bacs répliqués, à raison de 52-53 huîtres par bac. Les 70 individus témoins ont été répartis dans 2 bacs supplémentaires, à raison de 35 huîtres par bac. Toute la durée de l'expérience, les 8 bacs de 50 L étaient alimentés en eau de mer de façon continue et à débit moyen ( $60 \text{ L.h}^{-1}$ ). Un bulleur assurait l'oxygénation de l'eau. Chaque bac disposait d'un couvercle de plexiglas individuel, afin de limiter une éventuelle contamination extérieure. Les variations de température ont été enregistrées au moyen de thermo-boutons. Le nettoyage des bacs a été effectué une fois par semaine.

#### IV.3.2.3 Prélèvements et analyses de données

Après 60 jours d'expérience, les huîtres survivantes qui ont été injectées avec la suspension de *Bonamia ostreae* ont été sacrifiées et analysées.

##### IV.3.2.3.1 Prélèvements de tissus et extraction ADN

Sur chaque huître sacrifiée, un échantillon de tissu a été découpé dans les feuillets branchiaux et déposé dans un tube d'éthanol à  $70^\circ$ , numéroté avec le nom de l'échantillon.

L'ADN contenu dans les tissus a ensuite été extrait suivant le protocole QIAamp<sup>®</sup> DNA mini-kit (Qiagen). La qualité de l'extrait et sa concentration en ADN ont été mesurées. Les protocoles utilisés sont détaillés **Partie III.2.1.1.3**.

Les extraits d'ADN ont ensuite été dilués pour obtenir le génotype des individus, ainsi que pour détecter la charge en *Bonamia ostreae*, par PCR quantitative.

#### IV.3.2.3.2 PCR quantitative

La charge parasitaire des individus sacrifiés a été mesurée par une PCR quantitative ciblant un gène d'actine du parasite (Robert *et al.*, 2009). Le protocole est détaillé dans la **Partie IV.2.2.6**.

#### IV.3.2.3.3 Génotypage et construction de la carte génétique de liaison

Le génotypage de 384 SNP, issus de séquençage direct et de séquençage *in silico*, a été effectué à la plateforme génomique BeadXpress de Toulouse (GenoToul) via la chimie GoldenGate, et la technologie Veracode (Illumina).

D'autre part, 14 marqueurs microsatellites ont également été génotypés.

Les protocoles sont détaillés dans les **Parties III.3.1.3 et III.3.1.4**.

La carte de liaison a été construite à partir des génotypes microsatellites et SNP des individus, avec le logiciel JoinMap<sup>®</sup> 4 (van Ooijen, 2006). Les différentes étapes de cette construction sont détaillées dans la **Partie III.3.1.5**.

Pour pouvoir identifier l'individu grand-parent à l'origine de chaque QTL, les individus  $F_0$  ont également été génotypés avec les marqueurs moléculaires. Étant donné le faible volume et la faible concentration de l'ADN extrait disponible pour les analyses, le génome total de ces individus  $F_0$  a été au préalable amplifié avec le Kit Illustrate<sup>™</sup> amplification d'ADN génomique GenomiPhi<sup>™</sup> V2 (GE Healthcare) suivant le protocole décrit dans la **Partie III.2.1.1.4**.

#### IV.3.2.3.4 Prélèvements d'hémolymphe

Pour chaque huître sacrifiée, une ponction d'hémolymphe a été effectuée dans le muscle adducteur au moyen d'une seringue de 1 mL munie d'une aiguille 23G (0,6 x 25 mm). Les prélèvements d'hémolymphe ont été maintenus sur glace afin de limiter la dégradation des ARN et de limiter la formation d'agrégats.

L'hémolymphe étant utilisée pour deux types d'analyses, pour chaque individu, la moitié du volume total de l'échantillon a été prélevée et utilisée en cytométrie en flux. Le reste de l'échantillon a été centrifugé à 1500 g pendant 10 minutes. Un volume de 20  $\mu$ L de surnageant a été laissé au fond du tube et 10 volumes (200  $\mu$ L) de RNAlater<sup>®</sup> (Qiagen) ont été ajoutés. Le RNAlater<sup>®</sup> est un agent stabilisateur immédiat qui bloque la dégradation et la transcription des ARN et

permet ainsi leur stockage pour une utilisation ultérieure et ce, sans modification de la qualité de l'échantillon, même après congélation. Le tube a été mélangé doucement par rotation, puis congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour une utilisation ultérieure des échantillons pour la mesure d'expression des gènes.

#### IV.3.2.3.5 Cytométrie en flux

Étant donné que l'on s'intéresse à la diversité de la réponse cellulaire au sein de la famille ségrégeante étudiée, c'est-à-dire à la réponse de chacun des individus, chaque échantillon d'hémolymphe a été traité individuellement.

L'échantillon a tout d'abord été dilué avec de l'EMF, à volume équivalent, pour obtenir une concentration de  $10 \cdot 10^6$  cellules par mL. Chaque échantillon a ensuite été filtré sur une maille de  $75\ \mu\text{m}$  pour éliminer les débris tissulaires. Les individus étant de petite taille, les volumes d'hémolymphe prélevés et disponibles pour la cytométrie étaient relativement limités et n'ont pas permis d'effectuer des duplicats. Ainsi, seuls  $200\ \mu\text{L}$  d'hémolymphe par individu étaient disponibles pour chacune des activités cellulaires à mesurer.

##### IV.3.2.3.5.1 Capacité de phagocytose

La capacité de phagocytose des hémocytes a été mesurée à partir de l'internalisation de microbilles de  $1\ \mu\text{m}$  de diamètre (Fluospheres<sup>®</sup> carboxylate-modified microspheres, Interchim). Après dilution de la solution mère de microbilles au  $1/10^{\text{ème}}$ ,  $10\ \mu\text{L}$  ont été ajoutés à  $200\ \mu\text{L}$  d'hémolymphe avant incubation pendant 1 h à l'obscurité et à température ambiante (Gagnaire *et al.*, 2006). Les microbilles internalisées émettaient alors une fluorescence de couleur verte, correspondant à l'isothiocyanate de fluorescéine.

##### IV.3.2.3.5.2 Production d'Espèces Oxygénées Réactives (EOR)

La production d'EOR a été mesurée grâce à la 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), diluée dans du DMSO. Ce composé non fluorescent diffuse à l'intérieur des cellules où il est hydrolysé en DCFH. En présence d'hydrogène peroxyde ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le DCFH est oxydé en dichlorofluoresceine (DCF).

$2\ \mu\text{L}$  de DCFH-DA ( $1\ \text{mM}$ ) ont été ajoutés à  $200\ \mu\text{L}$  d'hémolymphe avant incubation pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante puis transfert sur glace pendant 5 min pour arrêter la réaction (Morga *et al.*, 2009). Lors de la formation du produit d'oxydation, une fluorescence de couleur verte était émise.

##### IV.3.2.3.5.3 Acquisition des données

Les mesures ont été réalisées au moyen d'un cytomètre analyseur EPICS<sup>®</sup> XL<sup>™</sup> (Beckman Coulter), sous le logiciel d'acquisition Expo XL4 (Beckman Coulter). Pour chacune des mesures,



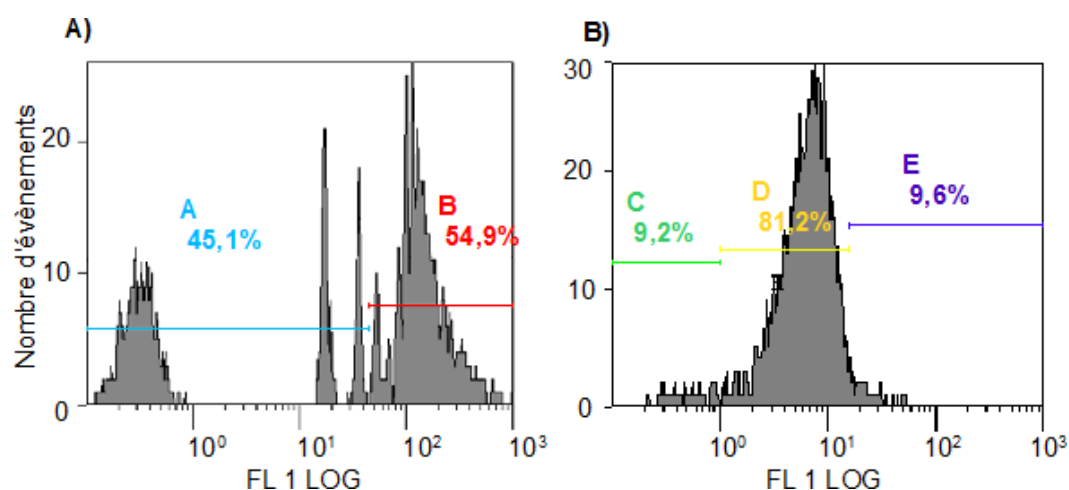
le temps maximal pour l'acquisition des données était limité à 300 secondes ou au passage de 5 000 cellules hémocytaires (ou événements), en flux lent, devant le faisceau du laser. Pour ne comptabiliser que les hémocytes, et ignorer les cellules parasitaires ou bactériennes de plus petite taille qui pourraient se trouver dans l'échantillon d'hémolymphe, un « discriminant » de valeur 25 a été choisi (Morga, comm. pers.). Le canal FL1 a été utilisé pour mesurer les longueurs d'ondes associées à la couleur verte (500 à 550 nm).

Pour chaque activité cellulaire mesurée, il a été nécessaire d'adapter les paramètres de saisie du cytomètre : 600 V pour la mesure de la production d'EOR, et 463 V pour la capacité de phagocytose (Morga, comm. pers.).

Les résultats de l'acquisition sont présentés sous forme d'histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité de la fluorescence en logarithme et l'axe des ordonnées représente le nombre d'événements (cellules hémocytaires) [Figure 51]. Des sous-catégories d'événements ont été définies et appliquées à tous les échantillons.

Pour déterminer le pourcentage de cellules positives à la phagocytose, un niveau de fluorescence équivalent à l'internalisation d'au moins trois microbilles a été considéré. En effet, un niveau de fluorescence plus faible (équivalent à 1 ou 2 microbilles) correspond généralement à la fluorescence émise par les microbilles collées à la surface des cellules (Gagnaire, 2005). Par conséquent, la capacité phagocytaire a été considérée négative pour les hémocytes ayant intégré de 0 à 2 microsphères (Gagnaire *et al.*, 2006) [Figure 51].

Pour la production d'EOR, trois catégories ont été distinguées : une absence de production, une faible production et une forte production [Figure 51]. Pour chacune de ces catégories, le pourcentage de cellules a été déterminé.



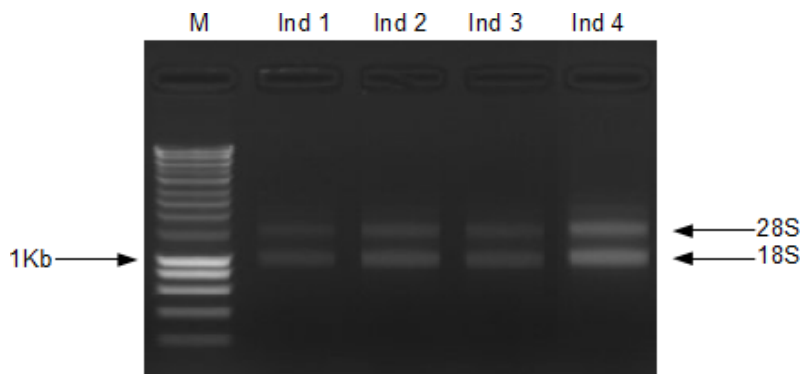
**Figure 51** – Présentation des résultats de mesure des activités cellulaires en cytométrie de flux. **A)** Capacité de phagocytose. **B)** Production d'Espèces Oxygénées Réactives (EOR). L'axe des abscisses représente l'intensité de la fluorescence mesurée en logarithme. **A, B, C, D, E** : Sous-catégories définies pour tous les échantillons, en pourcentage d'événements. La capacité de phagocytose est considérée positive pour les hémocytes ayant internalisé au moins 3 microsphères (**B**), et négative pour les hémocytes ayant intégré de 0 à 2 microsphères (**A**). La production d'EOR est négative pour des niveaux de fluorescence inférieurs à 100 (**C**), faible pour des niveaux de fluorescence compris entre 10<sup>0</sup> et 1,5.10<sup>1</sup> (**D**) et forte pour une fluorescence supérieure (**E**).

#### IV.3.2.3.6 Purification de l'ARN total et synthèse des ADN complémentaires

Chaque échantillon d'hémolymphe a été traité individuellement. Les échantillons congelés dans le RNAlater<sup>®</sup> ont été décongelés lentement sur glace. Deux centrifugations successives de 10 minutes à 2000 g et 18 °C ont permis d'éliminer progressivement tout le surnageant.

Après élimination du surnageant, les ARN ont été purifiés suivant le protocole RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen). Pour ce faire, les hémocytes contenus dans chaque échantillon ont tout d'abord été lysés dans un mélange composé de Buffer RLT et de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Le lysat a ensuite été filtré sur une colonne d'extraction QIAshredder (Qiagen), puis précipité avec de l'éthanol 70° avant transfert sur colonne RNeasy. Un premier lavage avec du Buffer RW1 a été effectué avant élimination de l'ADN résiduel par traitement à la DNase I (RNase-Free DNase Set, Qiagen). Après une incubation de 18 min à la DNase, un nouveau lavage avec du Buffer RW1 a été effectué avant deux lavages successifs avec un Buffer RPE. L'élution finale a été effectuée dans 30  $\mu$ L d'eau Milli-Q<sup>®</sup>.

La concentration en ARN des échantillons a ensuite été mesurée à 260 nm et 280 nm au moyen d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Le rapport des valeurs d'absorbance 260/280 nm a permis d'estimer la pureté de l'extrait. Un ratio compris entre 1,8 et 2,0 dénotait un extrait d'ARN de bonne qualité, c'est-à-dire sans contamination par des protéines ou par les produits utilisés pour la purification. La qualité des ARN a également été vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 % [Figure 52].



**Figure 52** – Profil électrophorétique des ARN purifiés et traités à la DNase. La bande la plus intense du marqueur de taille (M) est de 1000 bases. Les profils des 4 individus traités (Ind 1 à 4) présentent 2 bandes plus intenses correspondant aux ARN 18S et 28S. La netteté de ces bandes est signe d'ARN de bonne qualité.

Avant la réalisation d'une PCR d'expression comparative, il est important de vérifier l'absence d'ADN résiduel après la purification d'ARN total. Pour ce faire, une PCR en conditions normales a été effectuée sur les ARN purifiés préalablement dilués au 1/30<sup>ème</sup>, en ciblant le gène de ménage (ici le facteur d'élongation 1 alpha) et un gène d'intérêt. Cette PCR de vérification est dite « no-RT PCR » car elle se déroule avant la rétro-transcription des ARN. Pour chaque gène, population et condition, la réaction a été faite en duplicat. Le mélange réactionnel de 25  $\mu$ L comprenait 5  $\mu$ L d'ARN (dilution 1/30), 12,5  $\mu$ L de Brilliant<sup>®</sup> II SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix (Stratagene),

2,5  $\mu$ L de chacune des amorces du gène cible (dilutions voir **Table 24**) et 2,5  $\mu$ L d'eau Milli-Q<sup>®</sup>. La réaction a lieu dans une microplaque de 96 puits disposée dans un Thermocycleur Mx3005P (Quantitative PCR Systems, Stratagene), selon le profil thermique suivant : 1 cycle de dénaturation de 10 min à 95 °C, suivi de 40 cycles d'amplification composés de 2 étapes (10 s à 95 °C, 30 s à 60 °C), puis d'un dernier cycle de 3 étapes (1 min à 95 °C, 30 s à 60 °C, 30 s à 95 °C). La mesure de la fluorescence s'effectuait à la fin de chacun des 40 cycles, et la mesure des valeurs de la courbe de dissociation s'effectuait au cours du dernier cycle lors de l'augmentation progressive de la température par paliers de 0,5 °C toutes les 10 s de 60 °C à 95 °C.

L'absence d'ADN résiduel se traduisait par l'absence d'amplification, pour chacun des puits contenant l'ARN purifié.

**Table 24** – Caractéristiques des six gènes utilisés pour la PCR d'expression comparative. Le facteur d'élongation 1 alpha (EF1- $\alpha$ ) est utilisé comme gène de ménage et les gènes Fas ligand, Oe-SOD, Galectine, C1q et IAP sont les cinq gènes candidats potentiellement impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la bonamiose. F : amorce Forward ; R : amorce Reverse. T<sub>m</sub> : Température optimale d'amplification.

Nom du gène	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence des amorces	Concentration des amorces ( $\mu$ M)	T <sub>m</sub> (°C)	Efficacité	Source(s)
EF1 $\alpha$	EU851798	F : GTCGCTCACAGAAGCTGTACC R : CCAGGGTGGTTCAAGATGAT	3	82	99,70%	Morga, comm. Pers.
Fas ligand	GU320894	F : TTTGGGCAGTGG TGTAAGTG R : TAGCCCTGTTTC TCCACCAG	2,5	79	100,80%	Morga, comm. Pers.
Oe-SOD	GU320895	F : TCGTCAA TGTCAGCGTGAA R : AAATGTTGGGGCTGGTGA	3	79,5	108,30%	Morga, comm. Pers.
Galectine	GU320897	F : TCGGAGGTCGCCCTTAAT R : TTGCCGTGAACAATCAACA	3	80	102,70%	Morga, comm. Pers.
C1q	GU814271	F : CAGTCCCTCAGAGCCTGTTC R : ACAGGTATACGCCGGTTTTG	2,5	81,4	97,00%	Morga, comm. Pers.
IAP	GU814273	F : CTACCTCCAGGATTGTCA R : CACCACTCTCCTCCATGTCA	2,5	80	102,00%	Morga, comm. Pers.

Après vérification de l'absence d'ADN résiduel, les ARN purifiés ont été rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Pour ce faire, la synthèse des ADNc a été effectuée en deux étapes : un mélange réactionnel composé de 500 ng d'ARN purifiés (volume  $\leq$  11,5  $\mu$ L), de 1  $\mu$ L d'Oligo (dt)<sub>20</sub>, de 0,5  $\mu$ L de dNTP (20 mM) et d'eau Milli-Q<sup>®</sup> (q.s.p 13  $\mu$ L) a tout d'abord été dénaturé à 65 °C pendant 5 min. Après refroidissement sur glace, 4  $\mu$ L de Tampon 5x, 1  $\mu$ L de DTT (0,1 M), 1  $\mu$ L de Rnase Out (400 U/ $\mu$ L) et 1  $\mu$ L de SuperScript III RT (200 U/ $\mu$ L, Invitrogen<sup>™</sup>) ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été incubé 1 h à 50 °C puis inactivé 15 min à 70 °C avant congélation pour stockage à -20 °C.

#### IV.3.2.3.7 PCR en temps réel

Cinq gènes potentiellement impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la bonamiose ont été étudiés (Morga *et al.*, 2011a,b, et Morga, comm. pers.) : Fas ligand, Oe-SOD, Galectine, C1q et IAP. Le facteur d'élongation 1 Alpha (EF1- $\alpha$ ) a été utilisé comme gène de ménage (ou normalisateur, Morga, 2010). Les caractéristiques des six gènes utilisés sont récapitulées dans la **Table 24**.

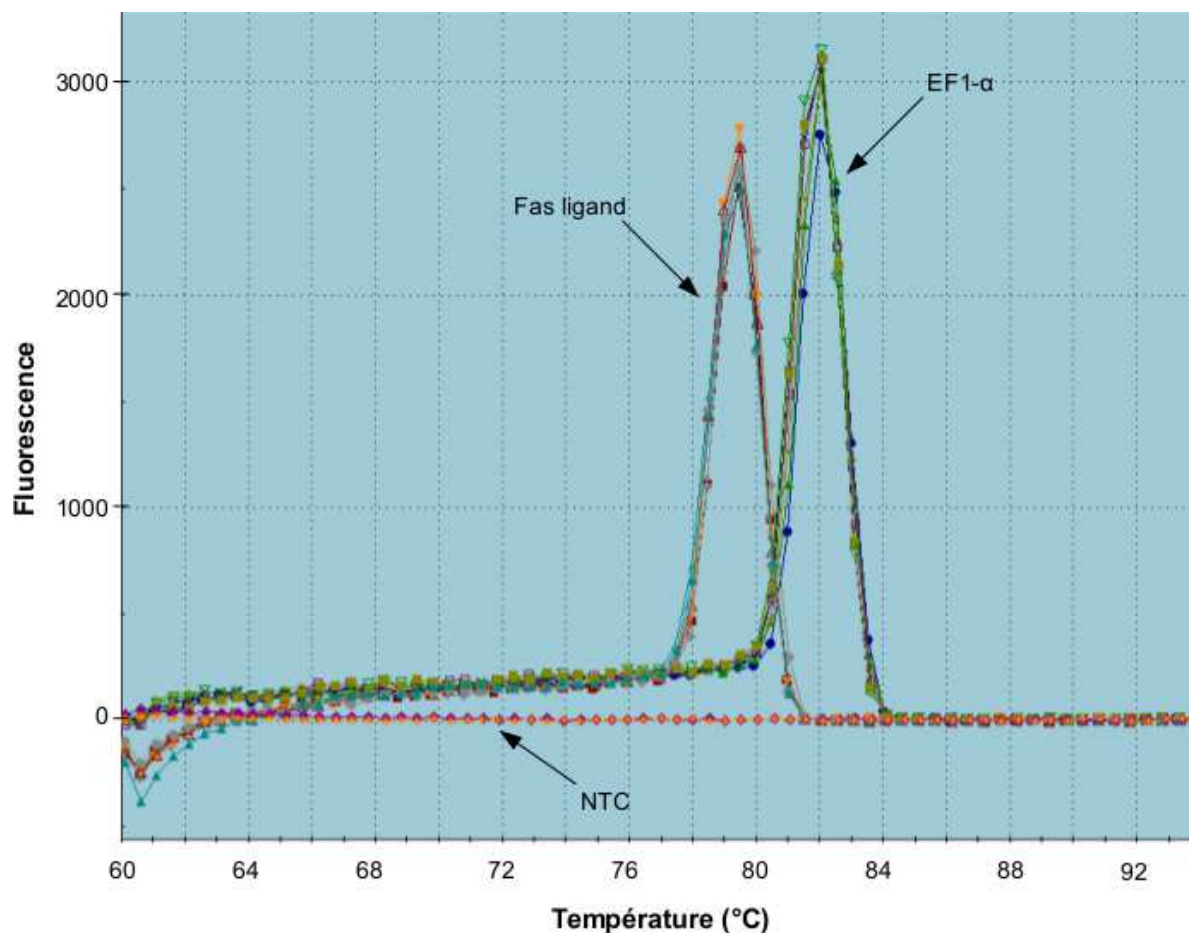
La PCR d'expression comparative a été réalisée à partir des ADNc dilués au  $1/30^{\text{ème}}$ . Pour chaque individu et chacun des 6 gènes, la réaction a été faite en duplicat. Le mélange réactionnel et le profil thermique étaient identiques à ceux de la no-RT PCR.

Afin de pouvoir effectuer les analyses d'expression relative dans des conditions optimales, un pool d'ADNc a été constitué à partir du regroupement de 11  $\mu\text{L}$  d'ADNc dilués au  $1/30^{\text{ème}}$  de chacun des individus. Le pool ainsi constitué a permis de calibrer les différentes microplaques utilisées pour l'analyse d'expression des 6 gènes sur tous les individus. Pour cela, sur chaque microplaque de 96 puits, 12 puits ont systématiquement été réservés pour les réactions de PCR sur le pool d'ADNc (6 gènes x 2 réplicats). En comptant les réplicats et les échantillons témoins dépourvus d'ADNc permettant de repérer une éventuelle contamination (NTC), une même plaque a permis l'analyse des 6 gènes pour 6 individus et le pool de calibration [**Figure 53**].

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pool 1 NORM A	Pool 1 NORM A	Pool 2 IAP A	Pool 2 IAP A	Pool 3 C1q A	Pool 3 C1q A	Pool 4 SOD A	Pool 4 SOD A	Pool 5 Fas A	Pool 5 Fas A	Pool 6 Gal A	Pool 6 Gal A
B	Ind1 7 NORM B	Ind1 7 NORM B	Ind1 8 IAP B	Ind1 8 IAP B	Ind1 9 C1q B	Ind1 9 C1q B	Ind1 10 SOD B	Ind1 10 SOD B	Ind1 11 Fas B	Ind1 11 Fas B	Ind1 12 Gal B	Ind1 12 Gal B
C	Ind2 13 NORM C	Ind2 13 NORM C	Ind2 14 IAP C	Ind2 14 IAP C	Ind2 15 C1q C	Ind2 15 C1q C	Ind2 16 SOD C	Ind2 16 SOD C	Ind2 17 Fas C	Ind2 17 Fas C	Ind2 18 Gal C	Ind2 18 Gal C
D	Ind3 19 NORM D	Ind3 19 NORM D	Ind3 20 IAP D	Ind3 20 IAP D	Ind3 21 C1q D	Ind3 21 C1q D	Ind3 22 SOD D	Ind3 22 SOD D	Ind3 23 Fas D	Ind3 23 Fas D	Ind3 24 Gal D	Ind3 24 Gal D
E	Ind4 25 NORM E	Ind4 25 NORM E	Ind4 26 IAP E	Ind4 26 IAP E	Ind4 27 C1q E	Ind4 27 C1q E	Ind4 28 SOD E	Ind4 28 SOD E	Ind4 29 Fas E	Ind4 29 Fas E	Ind4 30 Gal E	Ind4 30 Gal E
F	Ind5 31 NORM F	Ind5 31 NORM F	Ind5 32 IAP F	Ind5 32 IAP F	Ind5 33 C1q F	Ind5 33 C1q F	Ind5 34 SOD F	Ind5 34 SOD F	Ind5 35 Fas F	Ind5 35 Fas F	Ind5 36 Gal F	Ind5 36 Gal F
G	Ind6 37 NORM G	Ind6 37 NORM G	Ind6 38 IAP G	Ind6 38 IAP G	Ind6 39 C1q G	Ind6 39 C1q G	Ind6 40 SOD G	Ind6 40 SOD G	Ind6 41 Fas G	Ind6 41 Fas G	Ind6 42 Gal G	Ind6 42 Gal G
H	NTC 43 NORM	NTC 43 NORM	NTC 44 IAP	NTC 44 IAP	NTC 45 C1q	NTC 45 C1q	NTC 46 SOD	NTC 46 SOD	NTC 47 Fas	NTC 47 Fas	NTC 48 Gal	NTC 48 Gal

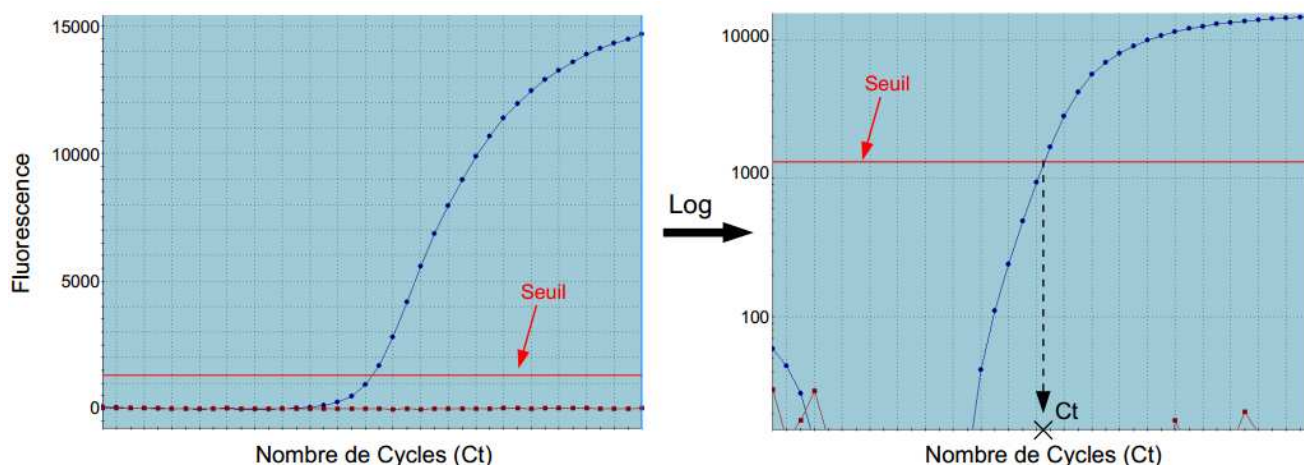
**Figure 53** – Plan de plaque pour la PCR d'expression comparative. Le facteur d'élongation 1 alpha (EF1- $\alpha$ ) est utilisé comme gène de ménage ou normalisateur (**NORM**) et les gènes **IAP**, **C1q**, **SOD**, Fas ligand (**Fas**), Galectine (**Gal**) sont les cinq gènes candidats potentiellement impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la bonamiose. Chaque ligne correspond à un type d'échantillon : ligne A : pool de calibration (**Pool**) ; ligne B à G : 6 individus analysés (**Ind1** à **Ind6**) ; ligne H : témoin négatif dépourvu d'ARN permettant de détecter une éventuelle contamination (**NTC**). Les nombres 1 à 48 permettent d'identifier les répliquats d'une même réaction.

Les données d'expression ont été acquises, au cours de la PCR, sous le logiciel MxPro (Stratagene). À l'issue de la PCR, pour chaque échantillon de chacun des six gènes, la courbe de dissociation a été systématiquement observée. La spécificité de la réaction d'amplification a alors été vérifiée par la présence d'un unique pic de dissociation [Figure 54].



**Figure 54** – Courbes de dissociation des gènes EF1- $\alpha$  et Fas ligand. La présence d'un pic unique de dissociation, pour chacun des gènes, traduit la spécificité de la réaction d'amplification. Chaque courbe correspond à l'amplification d'un gène, pour un individu différent. Les courbes de valeurs nulles correspondent aux échantillons témoins dépourvus d'ADNc (NTC).

Une fois la spécificité de la réaction d'amplification vérifiée, individuellement pour chacun des gènes, une transformation logarithmique a été appliquée sur les courbes d'amplification [Figure 55]. Le seuil de fluorescence a alors été déplacé dans la partie rectiligne de la courbe. Le cycle à partir duquel un signal de fluorescence était détectable correspond à la valeur du Ct propre à cet échantillon, pour ce gène. Sur chaque microplaque, et ce pour chacun des gènes, un même seuil de fluorescence a été appliqué à chacun des échantillons analysés.



**Figure 55** – Transformation logarithmique de la courbe d'amplification d'un gène, ici le gène EF1- $\alpha$ , pour le choix du seuil de fluorescence à appliquer à tous les échantillons analysés pour ce gène, sur la même microplaque. Le seuil est choisi dans la partie la plus rectiligne de la courbe transformée en Log. Le point de croisement entre le seuil et la courbe d'amplification d'un échantillon détermine la valeur du Ct propre à cet échantillon, pour ce gène.

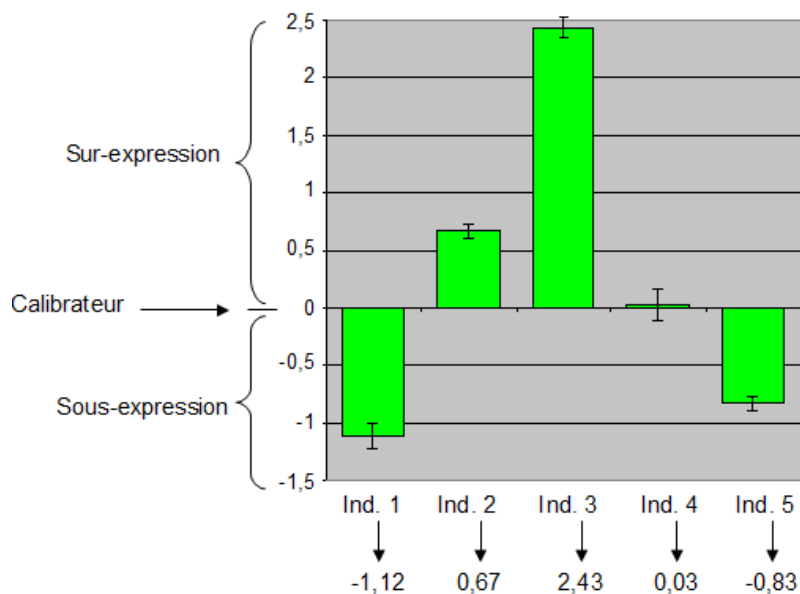
Un intervalle maximal de  $[-0,5 Ct ; 0,5 Ct]$  a été accepté entre les différents réplicats d'un même échantillon. Après validation des réplicats, l'analyse comparative portait sur la moyenne de leurs valeurs de Ct, et un écart-type a été calculé.

L'expression des 5 gènes d'intérêt a été calculée par la méthode dite du «  $\Delta\Delta Ct$  » de Pfaffl (2003). Cette méthode de calcul, sous forme de ratio, a permis d'effectuer trois corrections successives de la valeur d'expression. Pour ce faire, indépendamment pour chacun des 6 gènes (5 gènes d'intérêt + gène de ménage), les valeurs d'expression ont tout d'abord été calibrées par les valeurs du pool d'ADNc ( $\Delta Ct = Ct_{pool} - Ct_{échantillon}$ ). Toujours indépendamment pour chacun des gènes, ces valeurs ont ensuite été corrigées par la valeur d'efficacité de la réaction d'amplification propre à chaque gène ( $E^{\Delta Ct}$ ). La valeur d'efficacité pour un gène est spécifique des conditions de PCR utilisées pour amplifier ce gène. Elle est définie par la courbe standard lors de la mise au point des conditions de PCR. Une efficacité optimale est proche de 100 %.

Pour finir, pour chaque gène d'intérêt (GI), les valeurs ont ensuite été normalisées par la valeur d'expression du gène de ménage (GM).

$$ratio = \frac{(E_{GI})^{\Delta Ct_{GI}(pool-échantillon)}}{(E_{GM})^{\Delta Ct_{GM}(pool-échantillon)}}$$

Pour un échantillon donné, une fois la correction relative au gène de ménage effectuée, le gène d'intérêt est apparu sur-exprimé ou sous-exprimé par rapport au calibrateur (ici le pool d'ADNc) ; on parle de quantité relative au calibrateur. Les valeurs sont ensuite transformées en  $\text{Log}_2$  pour la normalisation des séries quantitatives [Figure 56].



**Figure 56** – Exemple de quantités relatives d'expression d'un gène d'intérêt, par rapport au calibrateur ramené à zéro, pour 5 individus différents (Ind. 1 à 5).

#### IV.3.2.3.8 Coupe sagittale de tissus

Pour chaque individu sacrifié, une section de tissus incluant manteau, branchies, cœur, et glande digestive a été effectuée à l'aide de deux lames de microtome [Figure 57].



**Figure 57** – Plan de coupe sagittale (trait rouge) de tissus passant par le cœur, la glande digestive, les branchies, etc., chez une huître plate européenne. Photo : E. Harrang.

La section de tissus découpée a ensuite été déposée dans une cassette numérotée, puis a été plongée dans un bain de fixation, constitué au  $\frac{9}{10}$  de « Davidson » (formaldéhyde à 36 %, glycérol, éthanol 95° et d'eau de mer filtrée) et au  $\frac{1}{10}$  d'acide acétique. Après fixation, les tissus ont été déshydratés par immersion dans un bain d'éthanol absolu, avant inclusion en paraffine. L'analyse a été faite par observation en microscopie optique.



#### IV.3.2.3.9 Analyses statistiques

La dispersion des valeurs quantitatives d'expression relative de chacun des 5 gènes d'intérêt ainsi que de celles des 2 activités hémostatiques a été représentée par les statistiques descriptives (minimum, 1<sup>er</sup> quartile, médiane, 3<sup>ème</sup> quartile, maximum) de la boîte à moustaches de Tukey. La normalité de la distribution quantitative de ces 7 paramètres a ensuite été examinée par le test de Shapiro-Wilk. L'hypothèse nulle de normalité de la distribution a été rejetée si P-value < 0,01. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R project version 2.1.4.1. (R Development Core Team, 2011 ; <http://www.r-project.org/>).

#### IV.3.2.3.10 Analyses QTL et eQTL

La cartographie QTL et eQTL a été réalisée avec le logiciel MapQTL<sup>®</sup> 5 (van Ooijen, 2004) à partir de la carte génétique de liaison de la famille 09.09 précédemment construite ainsi que des données phénotypiques quantitatives de réponses fonctionnelles (2 paramètres hémostatiques, expression de 5 gènes d'intérêt) et des génotypes. Ce logiciel permet de détecter la présence de régions QTL liées à l'expression d'un ou plusieurs gènes d'intérêt (eQTL) mais également liées à la réponse immunitaire cellulaire (QTL), puis de positionner ces régions sur la carte génétique de liaison. La recherche de QTL et eQTL a été effectuée indépendamment pour chaque caractère phénotypique (n = 7). Les régions identifiées ont ensuite été comparées.

La méthode de cartographie qui a été utilisée est celle de la cartographie par intervalle (Lander and Botstein, 1989). Le protocole détaillé est décrit dans la **Partie IV.2.2.8**.

La nomenclature des QTL (eQTL) a été adaptée d'après la description de Cui *et al.* (2008) : elle commence avec la lettre « q », suivie d'une abréviation du nom du caractère étudié, puis du numéro du groupe de liaison, et enfin du numéro du QTL (eQTL) affectant ce caractère sur le groupe de liaison.

### IV.3.3 Résultats

Au cours de l'expérience,  $16,9 \pm 6$  % des huîtres injectées avec la solution purifiée de *Bonamia ostreae* (Bo) sont mortes, dans les 6 bacs répliqués. Il est à noter que  $10 \pm 2$  % des huîtres injectées avec la solution témoin (EMF) sont également mortes dans les 2 bacs répliqués. Ces deux proportions ne sont pas significativement différentes ( $\chi_2 = 1,77$  ddl = 1, p = 0,183). L'occurrence de mortalités dans les bacs reflète une mortalité résiduelle qui peut s'expliquer par le fait que certains individus étaient de très petite taille au début de l'expérience. Une injection pratiquée dans le muscle adducteur provoque nécessairement un stress chez les huîtres, pouvant parfois conduire à la mort des individus les plus faibles.

Soixante jours après le début de l'expérience, 260 huîtres survivantes ayant été injectées avec la suspension de *B. ostreae* ont été sacrifiées et analysées. Pendant ces 2 mois, en raison des condi-

tions expérimentales peu favorables à la croissance, toutes les huîtres n'ont pas poussé. Seules 125 huîtres (48 %) ont atteint la taille minimale de 3 cm de longueur et de largeur (sans tenir compte de la pousse récente de la coquille), et ont donc pu être utilisées pour les prélèvements d'hémolymphe. En effet, des tests préliminaires ont mis en évidence la difficulté à recueillir un volume d'échantillon suffisant pour réaliser les analyses chez des individus de plus petites dimensions. Le volume d'hémolymphe prélevé sur ces 125 huîtres n'a cependant pas toujours été suffisant pour réaliser toutes les analyses prévues. Ainsi, l'expression des gènes d'intérêt a pu être étudiée sur les 125 huîtres échantillonnées mais les paramètres hématocytaires n'ont pu être mesurés que sur 61 d'entre-elles.

#### IV.3.3.1 Carte génétique de liaison

Afin d'optimiser la construction de la carte de liaison, les 260 huîtres sacrifiées ont été typées avec les 14 marqueurs microsatellites. Mais, pour des raisons de plan de charge, seuls les 125 individus pour lesquels des échantillons d'hémolymphe ont également été prélevés ont été typés avec les marqueurs SNP. Les 2 parents  $F_1$  et les 2 grand-parents  $F_0$  ont également été typés avec l'ensemble des marqueurs moléculaires.

La carte génétique de liaison pour la famille 09.09 a été construite à partir des données de génotypage d'un total de 260 individus  $F_2$  pour 14 marqueurs microsatellites et de 125 individus  $F_2$  pour 115 marqueurs moléculaires de type SNP [Partie III.3.2.3.2]. Au final, 126 marqueurs ont été positionnés sur 10 GL, à raison de 2 à 34 marqueurs sur chaque GL, pour une longueur totale de 327,64 cM.

#### IV.3.3.2 Détection de *Bonamia ostreae*

L'analyse en PCR quantitative des 260 huîtres sacrifiées a révélé de rares échantillons positifs ( $n = 6/260$ ) pour des valeurs de Ct extrêmement élevées ( $> 35$  cycles) situées en dehors de la courbe standard et donc non quantifiables. De plus, malgré plusieurs analyses des mêmes échantillons, aucune mesure n'a pu être validée par réplicat.

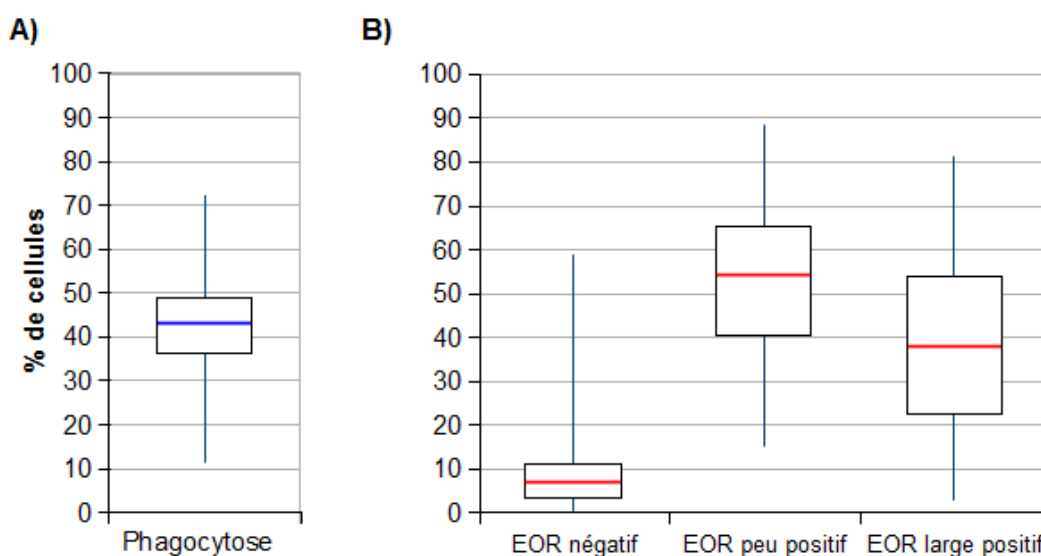
Pour vérifier cette absence de détection de *B. ostreae*, des cellules parasitaires ont été recherchées dans les tissus (manteau, branchies, cœur et glande digestive) de plusieurs individus ( $n = 10$ ). Les coupes histologiques observées n'ont pas permis d'identifier de parasites, confirmant ainsi les résultats obtenus en PCR quantitative.

#### IV.3.3.3 Réponses cellulaires

La production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et les capacités de phagocytose ont été analysées respectivement chez 61 et 34 huîtres. Cette différence d'effectifs s'explique par le fait que le volume du prélèvement d'hémolymphe effectué sur les huîtres sacrifiées n'a pas été suffisant pour effectuer toutes les analyses (expression génique et paramètres hématocytaires). Néanmoins, les deux paramètres hématocytaires ont été analysés simultanément chez 34 huîtres.

Comme attendu, les résultats présentent une grande variabilité quantitative inter-individuelle de ces deux activités hémostatiques chez les individus de la famille 09.09 ayant été injectés avec la même suspension de *B. ostreae* [Figure 58].

Le pourcentage de cellules hémostatiques positives pour l'activité de phagocytose varie de 11,6 % à 72,2 % suivant les individus avec une valeur médiane à 43,3 %. 50 % des individus présentent entre 36,1 % et 49,1 % de cellules positives pour cette activité. La distribution des valeurs quantitatives de cette activité suit une distribution normale ( $W = 0,983$  P-value = 0,85).



**Figure 58** – Distributions quantitatives en boîte à moustaches de Tukey (minimum, 1<sup>er</sup> quartile, médiane, 3<sup>ème</sup> quartile, maximum) de la proportion de cellules hémostatiques **A**) positives pour l'activité de phagocytose ; **B**) négatives, faiblement positives ou fortement positives pour la production d'espèces oxygénées réactives (EOR).

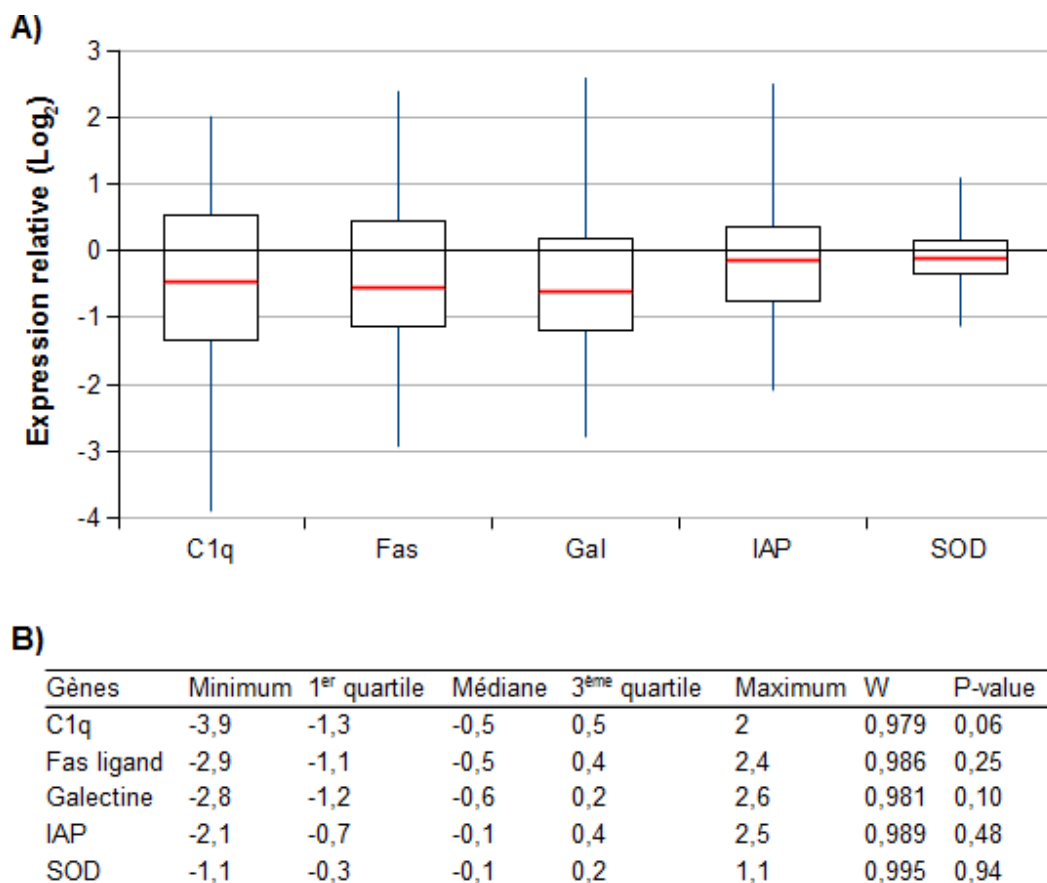
Le pourcentage de cellules hémostatiques négatives pour la production des EOR varie de 0,6 % à 58,8 % suivant les individus, avec une valeur médiane à 7,1 %, et une distribution entre 3,4 % et 11,2 % pour 50 % des individus. La distribution des valeurs quantitatives négatives pour cette activité ne suit pas une loi normale ( $W = 0,704$  P-value =  $8,6 \cdot 10^{-10}$ ).

Le pourcentage de cellules hémostatiques présentant une faible production d'EOR varie de 15,4 % à 88,4 % suivant les individus, avec une valeur médiane à 54,2 %, et une distribution entre 40,4 % et 65,5 % pour 50 % des individus. Le pourcentage de cellules hémostatiques présentant une forte production d'EOR varie de 3,1 % à 81,2 % suivant les individus, avec une valeur médiane à 38,2 %, et une distribution entre 22,5 % et 53,8 % pour 50 % des individus. Les valeurs quantitatives des cellules hémostatiques présentant une faible ou une forte activité de production des EOR suivent une distribution normale (respectivement  $W = 0,986$  P-value = 0,72 et  $W = 0,966$  P-value = 0,08).

#### IV.3.3.4 Réponses moléculaires

L'expression de 5 gènes potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose a été étudiée chez 125 individus.

Comme attendu, les résultats de l'expression des 5 gènes étudiés présentent une grande variabilité quantitative inter-individuelle. La distribution quantitative des valeurs d'expression est présentée **Figure 59**, après corrections de normalisation par le gène de ménage et de calibration (pool d'ADNc). Les valeurs d'expression présentées sont des quantités relatives au calibrateur qui sert de référence (zéro d'expression), transformées en  $\text{Log}_2$  pour la normalisation des séries quantitatives.



**Figure 59 – A) et B)** Distribution quantitative en boîte à moustaches de Tukey (minimum, 1<sup>er</sup> quartile, médiane, 3<sup>ème</sup> quartile, maximum) des valeurs d'expression relative au calibrateur des cinq gènes d'intérêt C1q, Fas ligand (Fas), Galectine (Gal), IAP, SOD, chez les 125 individus de la famille 09.09 injectés avec une solution purifiée de *Bonamia ostreae*. Les distributions des valeurs quantitatives des 5 gènes suivent toutes une loi normale (W; P-value > 0,05).

#### IV.3.3.5 Détection de QTL et eQTL

Cette analyse étant sensible à la normalité de la distribution des valeurs quantitatives étudiées, seuls les paramètres suivant une loi normale sont analysés. De plus, afin d'optimiser la détection de QTL (eQTL), si un même paramètre est décrit en plusieurs catégories (ex. : négatif, faible, fort), l'analyse est effectuée sur la catégorie maximisant la variance du paramètre. Ainsi, pour la production d'EOR, l'analyse porte sur le pourcentage de cellules présentant une forte activité de production d'EOR. Dans le même temps, l'expression des cinq gènes d'intérêt ainsi que l'activité de phagocytose sont conservés pour l'analyse QTL et eQTL. La recherche de régions QTL et eQTL est effectuée indépendamment pour chacun des 10 groupes de liaison de la carte génétique de

liaison, pour chacun des 7 caractères phénotypiques étudiés (5 gènes, 2 paramètres hématocytaires).

Le test de cartographie par intervalle (*Interval Mapping*, IM) a permis d'identifier cinq QTL (eQTL) significatifs ( $P < 0,05$ ) et huit autres QTL (eQTL) présumés ( $P \approx 0,10$ ) [Table 25; Figure 60]. Parmi les eQTL cartographiés, seuls deux eQTL du gène de l'IAP dépassent le seuil de significativité de la carte globale de liaison. Chaque caractère étudié est contrôlé par 1 à 4 QTL ou eQTL, significatifs ou présumés, dispersés sur un ou plusieurs GL.

Les trois eQTL significatifs pour l'IAP sont dispersés sur deux groupes de liaison différents (2 eQTL sur le GL 8 et 1 eQTL sur le GL 10). Ces trois eQTL expliquent respectivement 10,7 %, 36,6 % et 23,1 % de la variance phénotypique liée à l'expression du gène de l'IAP. Un autre eQTL significatif a été cartographié pour la SOD (GL 8) avec une variance phénotypique liée à l'expression de ce gène de 12,2 %. Le QTL significatif pour la production d'espèces oxygénées réactives (EOR), situé sur le GL 5, explique 18,6 % de la variance phénotypique de cette activité hématocytaire.

Les deux eQTL présumés pour le gène C1q sont dispersés sur deux groupes de liaison différents (GL 2 et GL 4). Les deux eQTL présumés pour Fas ligand sont dispersés sur 2 GL (GL 2 et GL 6) et un eQTL présumé pour la Galectine a été cartographié sur le GL 7. Les deux QTL présumés liés à la capacité de phagocytose sont dispersés sur 2 GL (GL 3 et GL 6). Un eQTL présumé pour le gène de l'IAP a également été cartographié sur le GL 7.

L'effet additif ainsi que le(s) grand-parent(s) à l'origine du ou des allèle(s) associés à la région d'intérêt ont été déterminés pour les QTL (eQTL) significatifs et présumés [Table 25; Figure 60].

Les eQTL pour le gène C1q sont :

- sur le GL 2, un eQTL associé à une augmentation de l'expression du gène. Il provient de chacun des deux grand-parents, et est associé aux marqueurs snp\_Contig856\_367 (originaire des 2 grand-parents), snp\_Contig27991\_707 (origine L002-53), snp\_Contig17209\_306 (origine L002-53), snp\_Contig33356\_534 (origine L002-53), snp\_Contig3015\_924 (origine W102).
- sur le GL 4, ni l'effet additif, ni le grand-parent à l'origine de l'eQTL n'ont pu être déterminés à cause de la complexité de la distribution des fréquences alléliques pour l'expression du gène ;

Les eQTL pour le gène Fas ligand sont :

- sur le GL 2, un eQTL associé à une augmentation de l'expression du gène. Il provient de chacun des deux grand-parents, et est associé aux marqueurs snp\_Contig856\_367 (originaire des 2 grand-parents), snp\_Contig27991\_707 (origine L002-53), snp\_Contig17209\_306 (origine L002-53), snp\_Contig33356\_534 (origine L002-53), snp\_Contig3015\_924 (origine W102) ;
- sur le GL 6, un eQTL associé à une diminution de l'expression du gène. Originaire du grand-parent W102, il est associé au marqueur snp\_Contig3113\_1040.

Pour le gène de la Galectine, ni l'effet additif, ni le grand-parent à l'origine de l'eQTL présumé n'ont pu être déterminés.

Les eQTL pour le gène de l'IAP sont :

- sur le GL 7, un eQTL associé à une diminution de l'expression du gène. Originaire du grand-parent W102, il est associé aux marqueurs `snp_Contig25203_1036`, `snp_Contig12107_1447` et `snp_Contig26310_660` ;
- sur le GL 8, un eQTL associé à une diminution de l'expression du gène. Originaire du grand-parent W102, il est associé aux marqueurs `snp_Contig20694_1137` et `177a` ;
- sur le GL 10, un eQTL associé à une augmentation de l'expression du gène. Il provient de chacun des deux grand-parents, et est associé aux marqueurs `snp_Contig1580_1339` et `snp_Contig2045_1028`.

L'eQTL pour le gène de la SOD est cartographié sur le GL 8. Il est associé à une diminution de l'expression du gène, et est associé aux marqueurs `snp_Contig25296_950` (originaire du grand-parent L002-53) et `snp_Contig21305_770` (originaire des deux grand-parents).

Le QTL pour l'activité de production d'EOR est cartographié sur le GL 5. Il est associé à une augmentation de la production d'EOR. Originaire du grand-parent L002-53, il est associé aux marqueurs `EST26b-edu-1` et `snp_Contig19126_207`.

Les QTL pour l'activité de phagocytose sont :

- sur le GL 3, un QTL associé à une diminution de cette activité. Originaire du grand-parent L002-53, il est associé au marqueur `snp_Contig12804_335` ;
- sur le GL 6, un QTL associé à une augmentation de cette activité. D'origine multiple, il est associé aux marqueurs `snp_Contig4827_70` (originaire des deux grand-parents), `snp_Contig39831_152` (origine W102) et `snp_Contig11880_2611` (origine W102).

D'autre part, plusieurs QTL (eQTL) ont été co-localisés sur GL 2, GL 6, GL 7 et GL 8 avec parfois un chevauchement des intervalles de confiance sur GL 2, GL 7 et GL 8. En effet, sur le GL 8, un eQTL fortement significatif pour le gène de l'IAP et un eQTL significatif pour le gène de la SOD ont été co-localisés sur la région comprise entre les marqueurs `snp_Contig25296_950` et `snp_Contig21305_770`.

D'autre part, sur le GL 2, deux eQTL présumés (non significatifs), l'un pour le gène C1q et l'autre pour Fas ligand, ont été co-localisés sur la région comprise entre les marqueurs `snp_Contig856_367` et `snp_Contig17209_306`. Sur le GL 7, deux eQTL présumés (non significatifs), l'un pour le gène de la Galectine et l'autre pour l'IAP ont été co-localisés entre les marqueurs `snp_Contig25203_1036` et `snp_Contig1796_2371`.

De façon globale, la technique du MQM a permis de confirmer les positions et intervalles de confiance des QTL et eQTL détectés.

**Table 25** – Caractéristiques principales des QTL (eQTL) pour l'expression des gènes Fas ligand, Galectine, IAP, SOD, pour la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et pour la capacité de phagocytose des cellules hématocytaires.

	QTL (eQTL) <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	Intervalle de marqueurs <sup>c</sup>	LOD maximal <sup>d</sup>	Position sur le GL (cM) <sup>e</sup>	Intervalle de confiance (cM) <sup>f</sup>	LOD GL <sup>g</sup> P<0,05	LOD Carte <sup>h</sup> P<0,05	Variance expliquée <sup>i</sup>	Effet additif	Origine
Expression C1q	qC1q2-1	2	snp_Contig856_367 – snp_Contig17209_308	2,17	18,83	12 – 23,4	2,6	3,6		augmentation	2 lignées
Expression Fas ligand	qC1q4-1	4	199 – 243	2,40	0,00	0,0 – 5,2	2,6	3,6			
	qFas2-1	2	snp_Contig856_367 – snp_Contig3015_924	2,30	18,83	10,9 – 25,2	2,6	3,7		augmentation	2 lignées
Expression Galectine	qFas6-1	6	snp_Contig4827_70 – snp_Contig3113_1040	2,19	46,44	36,8 – 46,4	2,6	3,7		diminution	W 102
	qGal7-1	7	snp_Contig25203_1036 – snp_Contig12107_1447	1,90	0,00	0,0 – 19,7	2,3	3,7			
Expression IAP	qIAP7-1	7	snp_Contig12107_1447 – snp_Contig1796_2371	2,21	7,72	1,7 – 19,7	2,5	3,5		diminution	W 102
	qIAP8-1	8	snp_Contig20694_1137 – 177a	2,55*	0,00	0,0 – 25,7	2,3	3,5	10,7%	diminution	W 102
	qIAP8-2	8	snp_Contig40000_242 – snp_Contig21305_770	6,51****	25,69	22,6 – 25,7	2,3	3,5	36,6%		
Expression SOD	qIAP10-1	10	snp_Contig1580_1339 – snp_Contig2045_1028	6,92****	6,44	1,3 – 6,5	1	3,5	23,1%	augmentation	2 lignées
	qSOD8-1	8	snp_Contig25296_950 – snp_Contig21305_770	3,38**	25,69	22,8 – 25,7	2,5	3,6	12,2%	diminution	L002-53
Production EOR	qEOR5-1	5	B11 – snp_Contig21038_397	2,72*	20,54	18,1 – 28,0	2,4	3,6	18,6%	augmentation	L002-53
Capacité phagocytose	qPh3-1	3	snp_Contig12804_335 – 181	2,16	7,25	0,3 – 9,7	2,6	3,8		diminution	L002-53
	qPh6-1	6	snp_Contig39831_152 – snp_Contig11880_2811	2,05	7,64	1,4 – 36,1	2,7	3,8		augmentation	W 102, et les 2

<sup>a</sup> : Nom du QTL adapté de *Cui et al. (2008)* : lettre « q » suivie d'une abréviation du nom du caractère étudié, puis du numéro du groupe de liaison, et enfin du numéro du QTL (eQTL) affectant ce caractère sur le groupe de liaison.

<sup>b</sup> : Groupe de liaison (GL) sur lequel les QTL (eQTL) sont cartographiés.

<sup>c</sup> : Intervalle de marqueurs entre lesquels les QTL (eQTL) sont cartographiés.

<sup>d</sup> : LOD score maximal et niveau de significativité (aucune indication :  $P \approx 0,10$ ; \* :  $P < 0,05$ ; \*\* :  $P < 0,01$ ; \*\*\*\* :  $P < 0,001$ ).

<sup>e</sup> : Position la plus probable du QTL (eQTL) sur chaque GL.

<sup>f</sup> : Intervalle de confiance de la position du QTL (eQTL) sur chaque GL.

<sup>g</sup> : LOD score à  $P < 0,05$  obtenu après 1000 itérations par le test de permutation (*Churchill and Doerge, 1994*) et correspondant au seuil de significativité à appliquer au GL pour la détection d'un QTL (eQTL).

<sup>h</sup> : LOD score à  $P < 0,05$  de la carte globale de liaison obtenu après 1000 itérations par le test de permutation (*Churchill and Doerge, 1994*).

<sup>i</sup> : Pourcentage de la variance phénotypique totale du caractère expliquée par le QTL (eQTL) détecté. Les valeurs ne sont données que pour les QTL (eQTL) dont le LOD score dépasse le seuil de significativité du GL.

<sup>j</sup> : Estimation de l'effet phénotypique du QTL (eQTL). Un effet positif (+) augmente l'expression ou la production, alors qu'un effet négatif (-) la diminue.

<sup>k</sup> : Grand-parent(s) à l'origine de l'allèle au QTL (eQTL).

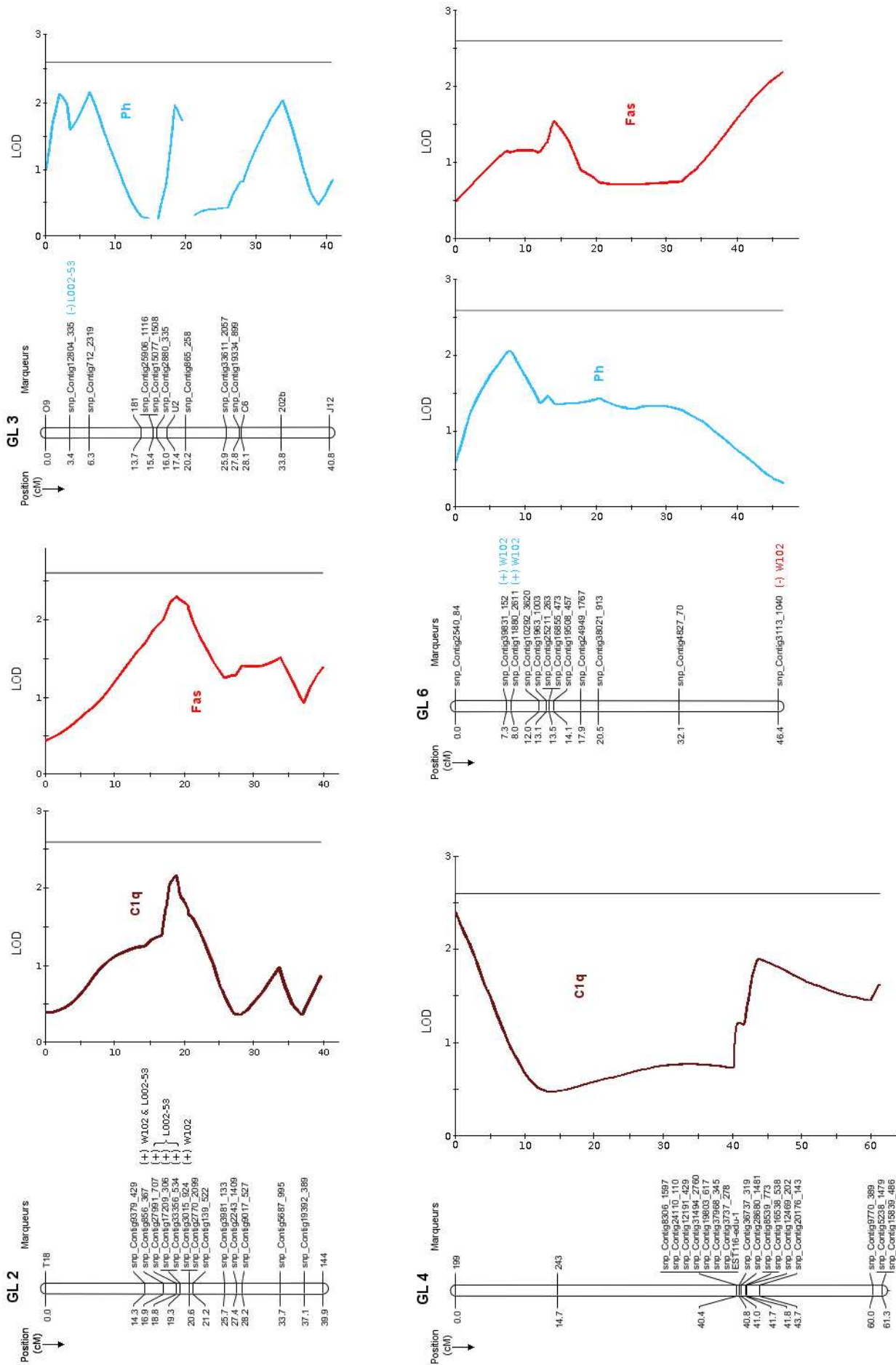


Figure 60 - Continue.



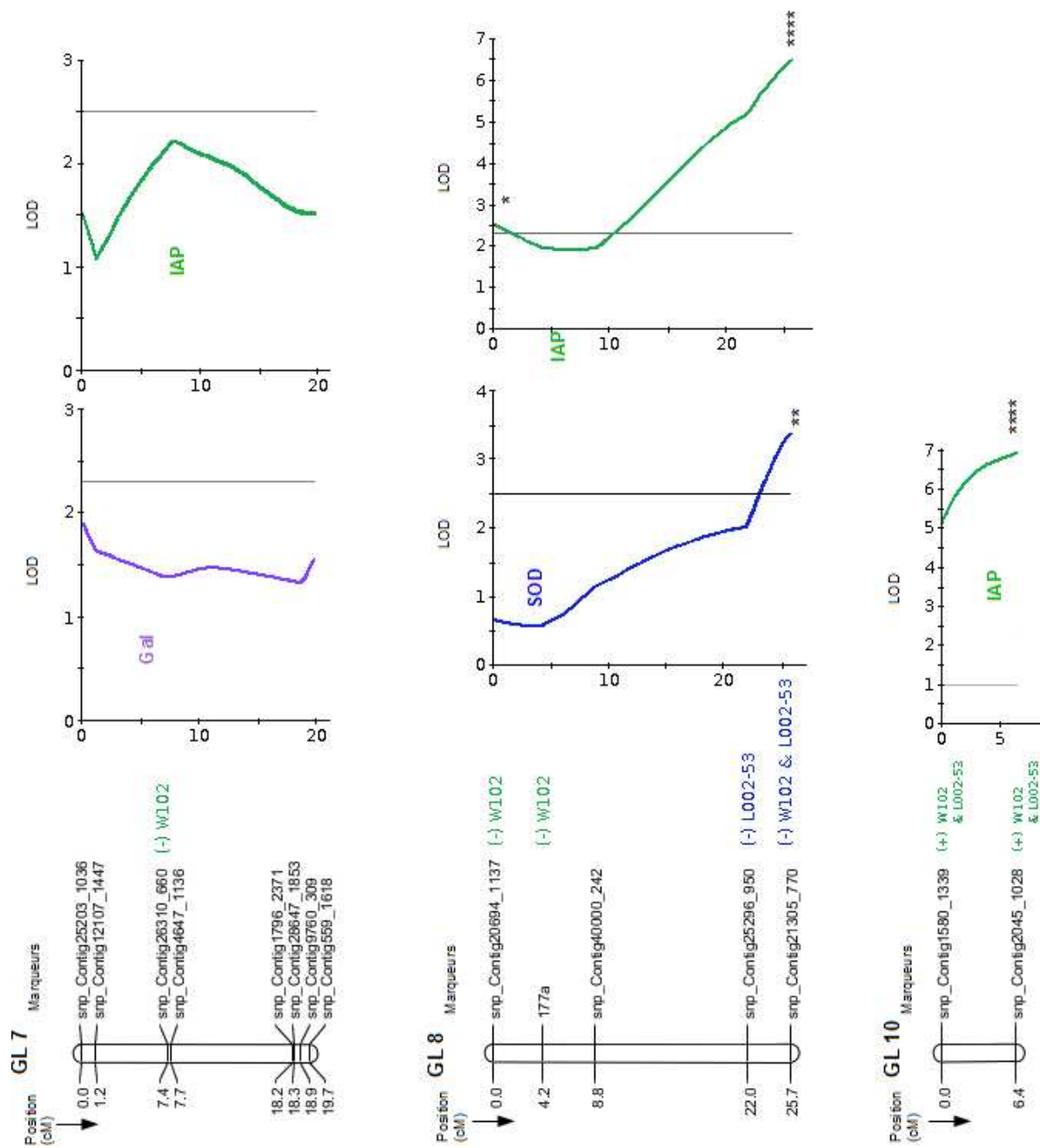
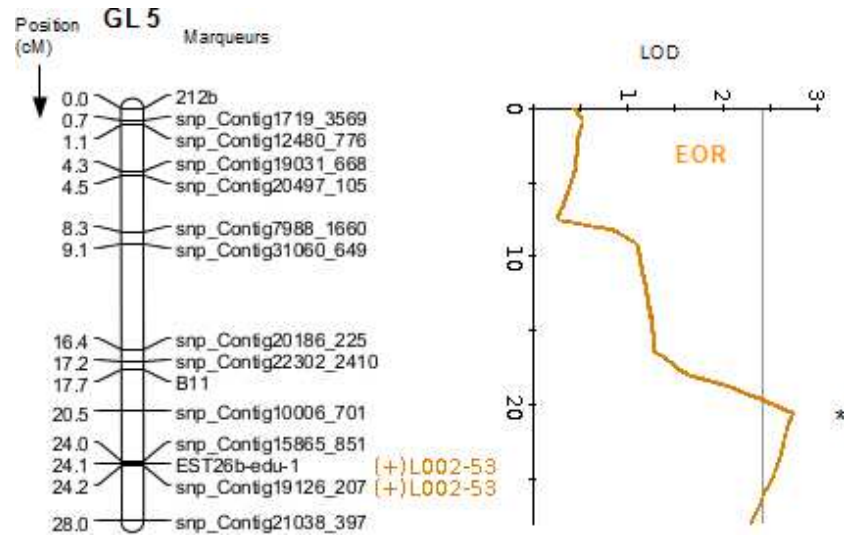


Figure 60 - Continue.



**Figure 60** – Distribution des LOD score le long des huit groupes de liaison (GL) regroupant les QTL et eQTL significatifs et présumés, cartographiés par la méthode de cartographie par intervalle. Sept paramètres sont étudiés : l'expression des gènes C1q, Fas ligand (Fas), Galectine (Gal), IAP, SOD, la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et la capacité de phagocytose (Ph) des cellules hématocytaires. Les régions QTL (eQTL) correspondent aux valeurs maximales de LOD. Les lignes correspondent aux seuils de significativité. Le plus haut niveau de significativité des QTL (eQTL) est indiqué au niveau du LOD maximal (aucune indication :  $P \approx 0,10$ ; \* :  $P < 0,05$ ; \*\* :  $P < 0,01$ ; \*\*\* :  $P < 0,001$ ). L'effet additif du QTL (eQTL) pour une diminution de l'activité (-) ou une augmentation de l'activité (+), ainsi que le grand-parent à l'origine de l'allèle au QTL sont indiqués sur le GL, à droite du nom des marqueurs moléculaires, de la couleur du paramètre concerné. Sur le GL2, les 2 paramètres présentent le même effet et la même origine.

## IV.3.4 Discussion

### IV.3.4.1 Détection du parasite

Sur les 260 huîtres injectées avec la suspension de *Bonamia ostreae*, les analyses en PCR quantitative et en histologie n'ont permis d'attester ni la présence, ni le développement, du parasite *B. ostreae*, à l'issue des deux mois d'expérimentation. En effet, des valeurs extrêmes de Ct ( $> 35$  cycles) ont été mesurées pour quelques échantillons, chez un seul des réplicats. Dans des conditions validées par réplicats, des valeurs extrêmes de Ct traduisent une charge en parasite d'un ordre inférieur à 200 copies (Robert *et al.*, 2009). À cet ordre de grandeur, la technique de PCR quantitative se révèle imprécise et il est possible de détecter un faux-positif ou une contamination. Étant donné qu'un signal de même nature a été détecté sur deux huîtres injectées avec la solution témoin (EMF), aucune huître analysée n'est considérée positive à *B. ostreae*.

Une hypothèse, pour expliquer cette absence de détection, réside dans l'origine généalogique et le parcours zootechnique de cette famille.

En effet, les individus  $F_2$  testés proviennent du croisement de deux individus  $F_1$  issus eux-mêmes du croisement d'un individu sauvage et d'un individu provenant d'une lignée ayant montré de très bonnes performances de survie vis-à-vis de la bonamiose. Le croisement des deux individus  $F_1$  ainsi obtenus permet une ségrégation des allèles des grand-parents dans la nouvelle génération  $F_2$ , créant de nouveaux assemblages alléliques. Les deux grand-parents présentant des phénotypes contrastés pour le caractère de résistance à *B. ostreae*, on s'attend logiquement à ce que certains individus  $F_2$  présentent alors de meilleures performances de survie que les autres, ces derniers étant plus fortement parasités.

Cependant, il ne faut pas oublier que la génération  $F_1$  a été produite en 2003 et que la génération  $F_2$  a, elle, été produite en 2009. Pendant ces six années de stabulations, les effectifs des individus  $F_1$  ont été sensiblement réduits à 8 individus survivants [cf. **Partie II.1**]. Cette diminution drastique des effectifs peut s'expliquer d'une part par les prélèvements d'individus pour d'autres plans de croisements, et d'autre part par les conditions de stabulations. En effet, les huîtres plates sont notamment sensibles aux variations brutales de températures et à des restrictions d'apports nutritifs, particulièrement en période hivernale. De plus, il est à noter que, lors de leur stabulation, ces huîtres n'étaient pas protégées du parasite responsable de la bonamiose. Effectivement, une analyse de détection de *B. ostreae*, réalisée en 2009 sur une partie des futurs géniteurs d'autres familles d'huîtres stabulées avec les  $F_1$ , a montré une fréquence de détection de *B. ostreae* de 16,7 % chez les huîtres analysées. Ainsi, il est fort probable que les géniteurs  $F_1$  survivants et donc utilisés pour produire les individus testés dans la présente étude soient les individus présentant les assemblages alléliques les plus favorables pour la survie, notamment vis-à-vis de la bonamiose. En effet, la sélection qui s'est alors opérée a réduit la diversité génétique des individus  $F_1$  (59,2 % de génotypes communs entre les deux parents  $F_1$ , pour les marqueurs testés), favorisant ainsi la transmission d'allèles favorables à la génération  $F_2$ , et augmentant ainsi le déséquilibre de liaison. L'absence de détection du parasite chez la  $F_2$ , malgré une injection de cellules parasitaires et une incubation de 2 mois, peut ainsi refléter de bonnes capacités de résistance de ces individus

vis-à-vis de *B. ostreae*.

D'autre part, environ 17 % des huîtres injectées avec la suspension parasitaire sont mortes avant la fin de l'expérience. Cette mortalité pourrait correspondre aux individus présentant les associations alléliques les moins favorables. Malheureusement, étant donnée la rapidité avec laquelle les tissus de ces individus se sont dégradés, aucun échantillon de qualité suffisante pour des analyses de détection du parasite n'a pu être collecté.

Une autre hypothèse réside dans la durée de l'expérimentation. En effet, la présente expérience a duré 2 mois à partir de la date d'injection, et il est possible que cette durée n'ait pas été suffisante pour que le parasite se développe. Effectivement, bien que la quantité de parasites injectés ( $2,6 \cdot 10^5$  parasites) par individu soit plus du double de celle identifiée par [Hervio et al. \(1995\)](#) comme nécessaire pour infecter plus de 50 % des individus injectés, ces mêmes auteurs ont également identifié que 4 mois d'incubation étaient nécessaires pour détecter les premières huîtres infectées. Cependant, pendant cette période, certaines huîtres meurent sans être détectées infectées. Dans la présente expérience, ces huîtres n'ont alors pu être utilisées pour la détection de QTL (eQTL). En effet, les analyses effectuées pour mesurer les 7 paramètres étudiés (expression de 5 gènes, 2 paramètres hématocytaires) nécessitaient du matériel biologique vivant. Au début de l'expérience, un peu plus de 300 individus ont été injectés. Ces individus étant de taille parfois très petite (entre 1 et 4 cm), seule une portion d'entre-eux a finalement pu être utilisée pour ces deux types d'analyses. De plus, étant donné que l'analyse QTL (eQTL) nécessite de maximiser les effectifs étudiés afin d'optimiser la puissance des tests, il s'agissait de disposer d'un maximum d'individus survivants à la fin de l'expérience afin d'effectuer les mesures. Étant donné les effectifs de départ, cette expérience n'a donc pu être maintenue plus longtemps, au risque de voir diminuer les effectifs des huîtres utilisables.

Néanmoins, ce résultat ne remet nullement en cause les autres résultats de l'expérience. Il retire seulement l'aspect recherche de QTL et eQTL liés à la présence et au développement de *B. ostreae*. Désormais, il s'agit d'associer les QTL et eQTL identifiés à des réponses de l'huître plate européenne suite à une injection de parasites.

#### IV.3.4.2 Détection de QTL et eQTL liés à la réponse à une injection de parasites

La présente étude est la première à combiner la cartographie génétique de liaison avec une approche fonctionnelle de la réponse à un parasite, à l'échelle des individus, chez une espèce de mollusque bivalve marin. En effet, jusqu'à présent il a souvent été identifié des QTL liés à la résistance ou à la survie vis-à-vis d'une maladie, à partir du regroupement des individus en deux catégories de phénotypes : survie/mortalité ou statut sain/infecté (ex. : [Yu and Guo, 2006](#); [Lallias et al., 2009a](#); [Sauvage et al., 2010](#)). Cependant, cette approche peut s'avérer inefficace pour détecter certaines régions QTL, notamment du fait qu'une hétérogénéité génétique peut parfois produire des phénotypes semblables ([Ytournal, 2008](#)). Dans cette étude, il s'agissait donc de préciser la variabilité quantitative et de cartographier des phénotypes de réponse à la bonamiose, sur des individus plein-frères appartenant à la même famille ségrégeante, c'est-à-dire génétiquement

différents mais issus des mêmes parents  $F_1$ .

Le premier objectif de la présente étude était de caractériser de façon plus précise les phénotypes de réponse à la bonamiose, en étudiant sept paramètres physiologiques précédemment identifiés (Morga *et al.*, 2009, 2011a,b, 2012) comme candidats à cette réponse. Comme nous venons de le voir dans la partie précédente de cette discussion [Partie IV.3.4.1], les analyses en PCR quantitative n'ont permis d'attester ni la présence, ni le développement, du parasite *B. ostreae*. Aussi, ce premier objectif n'a pu être rempli étant donné qu'aucune association n'a pu être faite entre la variation de ces sept paramètres physiologiques quantitatifs et la charge parasitaire des individus.

Le deuxième objectif de cette expérimentation résidait dans l'identification de régions du génome impliquées dans la cascade de régulation de l'expression des sept paramètres physiologiques potentiellement impliqués dans la réponse à *B. ostreae*. Pour cela, le génotype des individus sacrifiés à l'issue de l'expérience a été associé aux valeurs quantitatives d'expression de cinq gènes d'intérêt (IAP, C1q, SOD, Fas ligand, Galectine) et de deux activités hémocytaires (capacité de phagocytose, production d'EOR), pour la recherche de QTL et eQTL.

Au total, quatre eQTL significatifs et six eQTL présumés ainsi qu'un QTL significatif et deux QTL présumés, potentiellement impliqués dans la réponse à une infection à *Bonamia ostreae* chez l'huître plate européenne *Ostrea edulis*, ont été identifiés. Tous ces eQTL et QTL ont été cartographiés sur un total de huit groupes de liaison, de la carte génétique propre à la famille 09.09. Chaque paramètre mesuré a été associé avec une à quatre régions génomiques, dispersées sur un ou plusieurs groupements. Cette localisation multiple de QTL et/ou eQTL associés à l'expression d'un même paramètre suggère un effet d'épistasie ou de multigénie additive de la part de différents loci. En effet, plusieurs régions du génome semblent impliquées (caractère à déterminisme multigénique) dans l'expression de C1q, de l'IAP, de Fas ligand, ainsi que dans l'activité de phagocytose. Ces différents loci ont été identifiés pour le même effet ou pour un effet contraire, sans toutefois pouvoir présumer d'un effet parallèle, en interaction ou en cascade entre ces loci.

Même si l'on ne connaît pas la position des gènes étudiés sur la carte génétique de liaison, cette localisation multiple de QTL et/ou eQTL, sur plusieurs GL, suggère également une régulation polygénique en *trans* (facteur de transcription physiquement éloigné de la séquence du gène) plutôt que en *cis* (à proximité de la région promotrice du gène) des paramètres mesurés. Cependant, il ne faut pas oublier que peu de régions eQTL et QTL ont été détectées pour certains paramètres, suggérant que la couverture du génome utilisée pour cette étude n'était pas optimale, ou que les effectifs étudiés n'étaient pas suffisants. Il est ainsi possible que la présence d'eQTL ou QTL agissant en *cis* puisse être sous-estimée.

D'autre part, il est important de rappeler qu'il n'existe aucune carte génétique, riche en marqueurs moléculaires, qui puisse servir de référence pour l'huître plate européenne. En outre, chaque ana-

lyse nécessite la construction d'une carte génétique de liaison propre à chaque croisement étudié (Vignal *et al.*, 2002), dépendant du taux de recombinaison entre marqueurs à chaque génération. Aussi, la comparaison de cartes génétiques construites chez plusieurs familles ségrégeantes peut parfois apporter de nouveaux assemblages entre marqueurs et ainsi préciser les groupes de liaison. Dans la **Partie III.3.3.2** du présent manuscrit, la comparaison des cartes construites chez plusieurs familles a notamment permis de regrouper les GL 8 et GL 10, qui apparaissaient distincts chez la famille 09.09. Ainsi, il s'avère que les trois eQTL fortement significatifs associés au gène de l'IAP (*Inhibitor of apoptosis*) sont finalement positionnés sur le même groupe de liaison. Ces trois eQTL expliquent un total de 70,4 % de la variance liée à l'expression du gène. Or, la plupart des eQTL à effet fort (> 15-20 % de variance expliquée, Manly and Olson, 1999; Erickson *et al.*, 2004) sont souvent détectés à proximité physique du gène cible (Gilad *et al.*, 2008). Il est donc possible que deux de ces eQTL fortement significatifs (respectivement 36,6 % et 23,1 % de variance expliquée) agissent en *cis* et soient physiquement proches de la région promotrice du gène codant pour l'IAP. L'autre eQTL (10,7 % de variance expliquée) agirait en *trans* tout en étant situé sur le même chromosome, alors qu'un eQTL présumé agirait également en *trans* en étant situé sur le GL 7. Malheureusement, il n'a pas été possible de vérifier cette hypothèse puisque aucun SNP *in vitro* n'a pu être développé spécifiquement sur ce gène [cf. **Partie III.2**].

Cependant, un autre SNP *in vitro* ségrégeant chez une autre famille [05.04, cf. **Partie III.3.3.2**] a été cartographié sur ce GL à proximité de l'intervalle de confiance de l'eQTL qIAP8-1. Ce SNP, EST23-edu-12a, a été développé sur un EST homologue au gène codant pour la Tyrosyl-tRNA synthétase. Ce gène code pour une enzyme possédant deux activités cytokines distinctes, notamment impliquées dans les mécanismes de l'inflammation et de l'apoptose, via la production du TNF (*Tumor Necrosis Factor*), et d'interleukines (Wakasugi and Schimmel, 1999). La localisation de ce SNP à proximité de régions régulatrices de l'expression du gène IAP argumente en faveur de l'implication de cette région génomique dans la régulation des mécanismes de l'apoptose.

L'expression des gènes C1q, Fas ligand et Galectine a, quant à elle, été associée à des eQTL présumés. Pour expliquer cette absence de significativité, une première hypothèse réside dans la puissance du test d'association. En effet, il est possible que malgré l'étude de 125 individus, cet effectif ne soit pas suffisant pour affirmer statistiquement la probabilité d'existence de ces eQTL. Une autre hypothèse réside dans le fait que, comme aucun développement de *B. ostreae* n'a pu être détecté, il est possible que l'étude de ces trois gènes soit trop tardive dans la chronologie de l'expérience pour détecter un différentiel suffisant d'expression qui soit lié à des facteurs génétiques. En effet, chacun de ces trois gènes participe au déclenchement de différents mécanismes de réponses. Le gène de la Galectine est impliqué dans la reconnaissance des pathogènes potentiels, notamment *Perkinsus marinus* chez *C. virginica* dont il facilite la phagocytose (Tasumi and Vasta, 2007; Vasta, 2012). Ce gène est également impliqué dans l'initiation de la réponse immunitaire innée (Vasta, 2009), et indirectement impliqué dans l'apoptose (Tasumi and Vasta, 2007). Le gène C1q code une protéine clé de l'activation de la voie classique du complément (Kishore *et al.*, 2004). Le gène Fas-ligand code un ligand qui initie la cascade d'activation de l'apoptose (Opferman, 2008). Ainsi, il est possible que la variation d'expression détectée soit résiduelle et

faible par rapport à la variation possible de l'expression de ces gènes. La variation d'expression détectée chez ces trois gènes, bien que de variance supérieure à celle du gène de l'IAP (de 1,17 à 1,64 contre 0,74 pour l'IAP), peut ainsi correspondre à une variation liée à des facteurs non génétiques. En effet, les niveaux d'expression des gènes peuvent varier à cause de facteurs d'ordre environnemental, épigénétique, ou encore à cause de fluctuations aléatoires de l'expression (Gillad *et al.*, 2008). Il s'avère donc recommandable de considérer ces eQTL présumés avec précaution.

Par ailleurs, des SNP *in vitro* ont été développés spécifiquement sur des EST homologues aux gènes codants pour le C1q, la Galectine et Fas ligand. Cependant, le typage des SNP correspondant aux deux premiers gènes n'a malheureusement pas fonctionné [signal illisible, cf. **Partie III.3.1.3**]. Seul un SNP (EST 116-edu-1) positionné sur la séquence de l'EST homologue au gène codant pour Fas ligand a pu être cartographié chez la famille étudiée. Ce SNP ségrège sur le GL 4, et n'est donc pas associé aux deux eQTL présumés liés à l'expression du gène Fas ligand. En effet, les deux eQTL étant cartographiés sur les GL 2 et GL 6, il semble que ceux-ci agissent en *trans* comme facteurs de régulation.

Un autre SNP *in vitro* a été cartographié au sein d'un intervalle de confiance sur le GL 5, celui d'un QTL significatif lié à l'activité de production d'espèces oxygénées réactives (EOR). Il s'agit du SNP EST26b-edu-1 qui a été développé spécifiquement sur un EST homologue à un gène codant pour une enzyme de la famille des cytochromes P450 [**Partie III.2**]. Cependant, il s'avère que la séquence amplifiée contenant ce SNP ne s'aligne pas avec celle correspondant à l'EST. Ainsi, il est possible que les amorces utilisées pour l'amplification ne soient pas spécifiques, ou qu'elles s'accrochent sur un intron, et donc que le SNP soit positionné sur la séquence d'une autre enzyme de la famille des cytochromes P450, ou même sur un autre gène. Un BLAST effectué sur la séquence amplifiée n'a permis d'identifier aucune protéine homologue (meilleure E-value = 0,48). Le cytochrome P450 correspond à une famille d'enzymes impliquées notamment dans la détoxification xénobiotique et le stress oxydatif (Snyder, 2000; Hannemann *et al.*, 2007), via la production d'EOR Barouki2006.

La corrélation entre la présence d'un QTL significatif associé à la production d'EOR par les hématocytes et le SNP EST26b-edu-1 tend à argumenter que celui-ci est tout de même positionné sur une séquence de cytochrome P450, qui ne serait donc pas encore connue. Ce QTL, significatif malgré un effectif moyen d'individus analysés ( $n = 61$ ), est un QTL à effet fort expliquant 18,6 % de la variance liée à la production d'EOR.

D'autre part, un autre gène impliqué dans la détoxification des cellules par la transformation des EOR a été étudié par PCR en temps réel : le gène de la SOD cytoplasmique (*Super Oxide Dismutase*). Un eQTL fortement significatif a été cartographié pour ce gène sur le GL 8. Il s'agit d'un eQTL à effet modéré expliquant 12,2 % de la variance liée à l'expression du gène. Malheureusement, il n'est actuellement pas possible de prédire le caractère local ou distant de cet eQTL vis-à-vis du gène de la SOD, et encore moins de son action en *cis* ou en *trans*. En effet, étant donné que l'EST correspondant au gène codant pour la SOD n'a pu être amplifié, aucun SNP

*in vitro* n'a pu être développé spécifiquement sur ce gène pour être cartographié [cf. **Partie III.2**].

Pour finir, deux QTL présumés ont été cartographiés sur les GL 3 et GL 6 pour l'activité de phagocytose. Cette activité hémocytaire est impliquée dans les mécanismes de défense par élimination des particules exogènes (Canesi *et al.*, 2002). Cependant, il s'agit également d'une voie d'infection et de multiplication du parasite puisqu'il semblerait qu'elle puisse être détournée par certains parasites pour faciliter leur propre internalisation (Chagot *et al.*, 1992). L'absence de significativité des QTL est probablement à associer à la faible puissance du test dû aux faibles effectifs disponibles ( $n = 34$ ) pour étudier cette activité. En effet, selon Darvasi *et al.* (1993), la puissance de détection et la précision de la localisation d'un QTL dépendraient principalement de l'effectif des individus étudiés et de l'effet du QTL, plutôt que de la densité en marqueurs moléculaires de la carte de liaison. Ces deux QTL présumés sont donc à considérer avec précaution.

### Co-localisation de régions QTL et eQTL

Dans le cadre de cette étude, un certain nombre de QTL et eQTL significatifs ou présumés ont été co-localisés sur les mêmes groupes de liaison, avec parfois un recouvrement de leurs intervalles de confiance.

Tout d'abord, sur le GL 2, deux eQTL présumés, l'un pour le gène C1q et l'autre pour Fas ligand, présentent un recouvrement de leur intervalle de confiance, laissant supposer que la même région du génome est impliquée dans les mécanismes de régulation de l'expression de ces deux gènes. En effet, en plus de cette co-localisation, les marqueurs associés aux eQTL ont exactement le même effet additif (induction de l'expression) et le même grand-parent  $F_0$  à l'origine de chacun des allèles associés. Le gène C1q est impliqué dans la voie classique du complément (Kishore *et al.*, 2004), alors que le gène Fas ligand appartient à la super-famille des TNF (*Tumor Necrosis Factor*) et est impliqué dans l'apoptose (Opferman, 2008). Cependant, il existe certains aspects des mécanismes immunitaires et de l'homéostasie énergétique dans lesquels le gène C1q et la super-famille des TNF se rencontrent et ont un effet similaire ou opposé (Shapiro and Scherer, 1998; Kishore *et al.*, 2002). Ainsi, il est possible que la région eQTL identifiée corresponde effectivement à un élément régulateur intervenant simultanément dans les deux voies, celle du complément (via C1q) et celle de l'apoptose (via Fas ligand). Ce type de regroupement en points chauds (*hotspot*) de régions eQTL affectant les niveaux d'expression de plusieurs gènes, particulièrement d'eQTL agissant en *trans*, est nommé « master regulators » (Gilad *et al.*, 2008). Ces points chauds regroupent généralement des éléments régulateurs intervenant sur plusieurs gènes (parfois plusieurs centaines). Ils ont été identifiés chez plusieurs espèces notamment la souris (Mehrabian *et al.*, 2005) et *Arabidopsis thaliana* (West *et al.*, 2007). Cette forte concentration en eQTL suggère l'idée qu'une variation en un point donné d'un réseau peut affecter de nombreux autres gènes (Gilad *et al.*, 2008).

De la même façon, sur le GL 8 (+ GL 10, cf. plus haut), quatre eQTL significatifs sont co-localisés



sur le même groupe de liaison, à raison de trois eQTL pour le gène de l'IAP et un eQTL pour le gène de la SOD. Deux de ces eQTL, un pour chacun des deux gènes, présentent un recouvrement de leur intervalle de confiance, laissant supposer que la même région du génome soit impliquée dans les mécanismes de régulation de l'expression de ces deux gènes. Le gène IAP est un inhibiteur de la voie de l'apoptose (Deveraux *et al.*, 1997), alors que le gène codant la SOD cytoplasmique est impliqué dans la détoxification des cellules (Gonzalez *et al.*, 2005). En apparence, rien ne permet de prédire l'existence d'un même eQTL lié à la régulation de l'expression de ces deux gènes. Ainsi, il peut s'agir de plusieurs éléments régulateurs regroupés en un point chaud (eQTL *hotspot*, Gilad *et al.*, 2008) mais agissant chacun sur l'expression d'un gène. Ces éléments auraient alors une position physique relativement proche sur la carte génétique de liaison, non-distinguable avec la résolution actuelle de la carte. Il peut également s'agir d'un effet de pléiotropie (Erickson, 2005) de la part d'un unique eQTL qui serait alors positionné sur un gène régissant plusieurs effets phénotypiques apparemment indépendants (expression de l'IAP et de la SOD).

D'autre part, sur le GL 7, deux eQTL présumés sont co-localisés, l'un pour le gène de la Galectine, l'autre pour l'IAP. Comme nous l'avons vu plus haut, ces deux gènes sont impliqués dans les mécanismes de l'apoptose, l'un par inhibition (IAP) et l'autre indirectement (Galectine). Bien que les intervalles de confiance de ces deux eQTL se chevauchent, leur position la plus probable est distincte. Ainsi, il semblerait que deux éléments régulateurs potentiellement impliqués dans les mécanismes de l'apoptose soient situés dans deux régions différentes du même chromosome.

Pour finir, un autre eQTL présumé pour Fas ligand ainsi qu'un QTL présumé pour l'activité de phagocytose sont co-localisés sur le GL 6, mais sans chevauchement des intervalles de confiance puisqu'ils sont au contraire situés à chaque extrémité du GL.

Étant donné que certains paramètres étudiés appartiennent au même type de réponse (métabolisme oxydatif, apoptose), on aurait pu s'attendre à identifier davantage d'eQTL communs, notamment entre les gènes codant pour l'IAP (inactivation de l'apoptose) et Fas ligand (activation de l'apoptose) d'une part, et entre l'activité de production d'EOR (production de radicaux oxygénés) et le gène codant pour la SOD (élimination de ces radicaux) d'autre part. Cette absence de co-localisation se porte en faveur d'une complexité de la voie de l'apoptose et du métabolisme oxydatif. En effet, il est possible qu'il n'y ait pas ou peu de gènes communs entre la voie d'activation et d'inactivation de l'apoptose d'une part, et entre la production et la transformation des EOR d'autre part. Il est également possible que la puissance de l'analyse n'ait pas permis cette détection.

### Effet additif des allèles liés aux QTL et eQTL

Dans la présente étude, le grand-parent à l'origine des allèles liés à une induction ou à une inhibition de l'expression des gènes ou des activités hématocytaires, pour chacun des QTL et eQTL (excepté la Galectine), a pu être identifié. Étant donné qu'un différentiel d'expression de ces paramètres a déjà été relié avec la résistance ou la sensibilité à la bonamiose et avec le statut

infecté ou non-infecté à *B. ostreae*, il est intéressant de corrélérer cette information avec les résultats obtenus dans le cadre des expériences d'infection *in vitro* et *in vivo* avec le parasite *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2009, 2011a,b, 2012).

Chez les huîtres résistantes à la bonamiose il semble que l'expression des gènes codant la Galectine, l'IAP et Fas ligand soit supérieure aux niveaux d'expression des huîtres sensibles (Morga *et al.*, 2011a, 2012). La SOD cytoplasmique semble également sur-exprimée en présence du parasite (Morga *et al.*, 2011a). Dans la présente étude, l'effet additif de l'eQTL associé à l'expression de la Galectine (qGal7-1) n'a pas pu être identifié. Par ailleurs, l'eQTL lié à l'expression de la SOD cytoplasmique (qSOD8-1) est associé à un allèle inhibiteur transmis par le grand-parent issu de la lignée sélectionnée. Ce résultat ne concordant pas avec les observations de Morga et collaborateurs, il est possible que le mécanisme mis en jeu soit plus complexe, que la cinétique de l'infection soit différente, ou encore qu'un effet d'épistasie non identifié dans cette étude intervienne. Pour ce qui est de l'expression des gènes codant pour l'IAP et Fas ligand, les résultats obtenus sont en adéquation avec ceux de Morga et collaborateurs. En effet, pour trois eQTL identifiés (qFas2-1, qIAP7-1, qIAP8-1), l'allèle lié à l'inhibition de l'expression de ces deux gènes est bien transmis par le grand-parent issu de la lignée sauvage.

Pour le gène C1q, une tendance (non significatif) à la diminution de la production a été identifiée chez les huîtres résistantes à la bonamiose (Morga *et al.*, 2012). Dans la présente étude, il n'est pas possible d'apporter d'information étant donné que les deux grand-parents portent l'allèle à l'eQTL (qC1q2-1) qui est associé à une augmentation de l'expression du gène. D'autre part, la présence du parasite chez *O. edulis* semble être associée à une diminution de la production des EOR (Morga *et al.*, 2009, 2011b). Cette observation a été reliée à une possible modulation de l'activité des hémocytes de la part du parasite pour faciliter sa survie à l'intérieur des cellules. Ceci serait en adéquation avec le fait que, dans la présente étude, le grand-parent issu de la lignée sélectionnée soit à l'origine de l'allèle au QTL (qEOR5-1) lié à l'augmentation de la production d'EOR.

Pour finir, aucune différence significative n'a pu être reliée *in vitro* à l'activité de phagocytose dans le cas d'une comparaison entre des huîtres sensibles et résistantes à la bonamiose. Cependant, cette activité a tendance à varier au cours de l'infection, notamment par diminution de l'activité de phagocytose avec le temps d'exposition au parasite (Morga *et al.*, 2011b). Dans la présente étude, le grand-parent issu de la lignée sélectionnée est à l'origine de l'allèle au QTL (qPh3-1) lié à la diminution de cette activité.

Ainsi, une certaine adéquation réside entre la plupart de nos observations (effet additif, grand-parent à l'origine de l'allèle) et les résultats publiés sur le différentiel d'expression de gènes potentiellement impliqués dans la réponse de l'huître plate à *B. ostreae*. L'occurrence de cette concordance tend à prouver que les eQTL et QTL identifiés dans la présente étude sont des éléments majeurs de la régulation des gènes étudiés. Cependant, pour certains paramètres, peu de régions régulatrices ont été identifiées. Ainsi, étant donné que l'expression des gènes est généralement un caractère à déterminisme polygénique, il est possible que la puissance de l'analyse soit insuffisante pour détecter des eQTL et QTL à effet faible (< 1 % de variance expliquée) (Gilad *et al.*, 2008).

## Candidats positionnels à la réponse à la bonamiose

L'identification de régions eQTL et QTL liées à la régulation de l'expression des sept paramètres potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose apporte un éclairage nouveau sur la localisation des QTL précédemment identifiés dans le cadre d'expériences d'infection (Lallias *et al.*, 2009a, et **Partie IV.2** du présent manuscrit). En effet, il est intéressant de comparer les positions respectives des différents QTL et eQTL cartographiés afin de détecter un éventuel recouvrement des régions régulatrices ainsi détectées avec les régions QTL liées aux phénotypes de survie/mortalité ou aux phénotypes mort infecté/survivant non-infecté.

Au total, cinq groupes de liaison homologues différents présentent simultanément un ou plusieurs QTL et/ou eQTL identifiés à la fois dans cette étude et lors d'une expérience d'infection avec *B. ostreae* [**Figure 61**]. Sur le GL 3, un défaut de marqueurs communs entre les familles ne permet pas de conclure sur un possible recouvrement des positions entre l'eQTL associé à la phagocytose et les QTL liés à la réponse à la bonamiose. *A contrario*, les quatre autres groupements (GL 2, GL 5, GL 6, GL 8-10) présentent un recouvrement au moins partiel des régions régulatrices avec les QTL liés à la réponse à *B. ostreae*. Ainsi, l'eQTL lié aux gènes C1q et Fas ligand (GL 2), les eQTL liés aux gènes IAP et SOD (GL 8-10), ainsi que le QTL lié à la production d'EOR (GL 5) et le QTL lié à la phagocytose ainsi que l'eQTL lié au gène Fas ligand (GL 6) correspondent tous à des gènes candidats positionnels liés à la réponse à la bonamiose. C'est-à-dire que la concordance de position de régions régulatrices de ces gènes avec des QTL potentiellement impliqués dans la réponse à une infection à *B. ostreae* renforce l'intérêt pour l'étude de ces régions. Cependant, les régions QTL contiennent quelques centaines de gènes et l'intervalle de ces régions ne peut être réduit à la seule co-localisation de quelques QTL d'expression et QTL d'activités hémocytaires. En effet, sur une région QTL contenant près de 600 gènes, Wayne and McIntyre (2002) ont identifié 34 gènes différentiellement exprimés au sein de l'intervalle du QTL. Ainsi, il est probable que les régions QTL et eQTL identifiées ne se limitent pas à un seul gène différentiellement exprimé. L'approche de cartographie eQTL peut ainsi permettre d'identifier des gènes candidats positionnels mais est également dépendante de la résolution de la carte génétique utilisée.

D'autre part, deux groupes de liaison de la famille 09.09, portant des eQTL présumés, impliqués dans l'expression des gènes C1q (GL 4) et Galectine ainsi que IAP (GL 7), n'ont pas d'équivalent(s) chez les familles testées à la bonamiose. Une première hypothèse réside dans le fait que comme ces régions régulatrices ne sont pas significatives, il pourrait ainsi s'agir d'eQTL faux-positifs.

Une deuxième hypothèse réside dans le fait que ces eQTL présumés peuvent être spécifiques à la famille 09.09, au même titre que certains QTL identifiés en réponse à la bonamiose chez une seule des familles testées [cf. **Partie IV.2.4.2**]. Malheureusement, même si la famille 09.09 a également été testée au cours de l'expérience d'infection par cohabitation, les faibles effectifs d'huîtres mortes et de tissus disponibles n'ont pas permis d'effectuer la recherche de QTL chez cette famille [cf. **Partie IV.2.3.1**]. Il n'est ainsi pas possible de vérifier une éventuelle co-localisation des régions régulatrices avec des QTL qui auraient pu ségréger de façon spécifique chez cette famille.

Une troisième hypothèse réside dans le fait que ces eQTL sont peut-être bien impliqués dans la régulation des gènes étudiés, mais qu'ils ne sont pas impliqués dans la réponse à la bonamiose.

C'est-à-dire que la réponse à la parasitose n'impliquerait pas forcément tous les éléments de la cascade de régulation de l'expression des gènes participants à cette réponse. En effet, même si l'information apportée est importante pour la compréhension du contrôle génétique de la régulation des gènes, beaucoup d'eQTL détectés ne sont pas forcément impliqués dans la réponse à la maladie étudiée (de Koning *et al.*, 2005).

Une dernière hypothèse réside dans le fait que ces eQTL peuvent effectivement être impliqués dans la réponse à la bonamiose, mais que les QTL associés à ces éléments de réponse sont des QTL à effets faibles, qui n'ont pas pu être détectés dans les conditions expérimentales utilisées.

*A contrario*, aucune région régulatrice n'a été identifiée sur le GL 1 de la famille 09.09, alors que un ou plusieurs QTL ont été identifiés sur le GL homologue des autres familles testées à la bonamiose (**Partie IV.2.4.2**; Lallias *et al.*, 2009a). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence de détection. Tout d'abord, il peut s'agir de QTL ségrégeants uniquement chez ces familles et pas chez 09.09, ou alors associés à des eQTL ou QTL à effet faible qui n'ont pu être détectés.

Il peut également s'agir de QTL qui ne sont pas liés à l'expression des cinq gènes ciblés, ni aux deux activités hématocytaires étudiées. En effet, les mécanismes de réponse à la bonamiose impliquent d'autres gènes (CYP450, OGST, etc.) et d'autres activités hématocytaires (activités estérases) (Morga *et al.*, 2009, 2011a,b; Martín-Gómez *et al.*, 2012) que celles étudiées dans la présente expérience. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'expression de ces autres gènes afin de détecter les régions régulatrices qui leurs sont associées. Ceci permettrait potentiellement de co-localiser de nouveaux eQTL avec des QTL et/ou eQTL déjà identifiés, mais également de détecter de nouvelles régions génomiques potentiellement impliquées dans les mécanismes de réponse à la bonamiose.

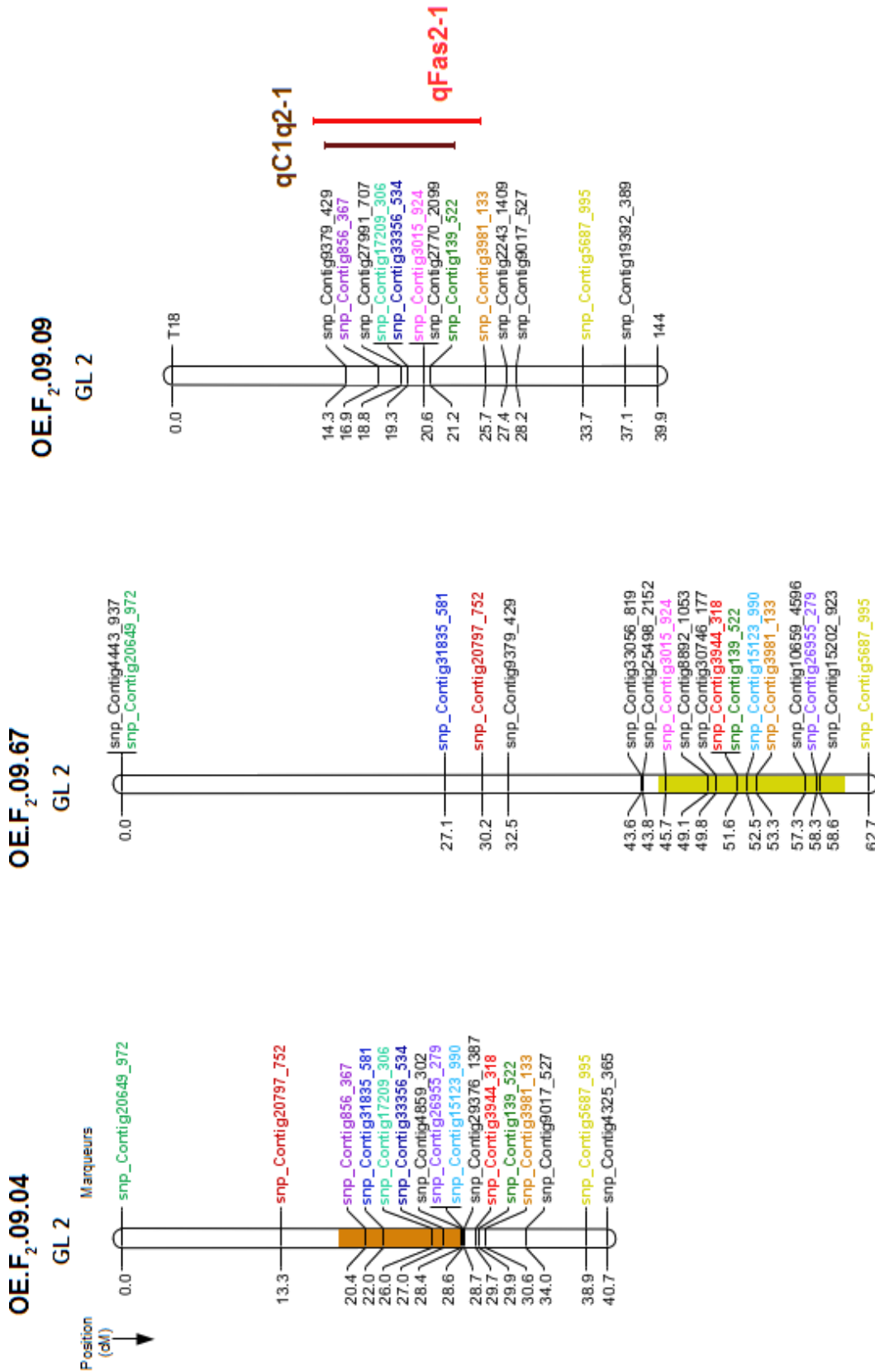


Figure 61 - Continue.

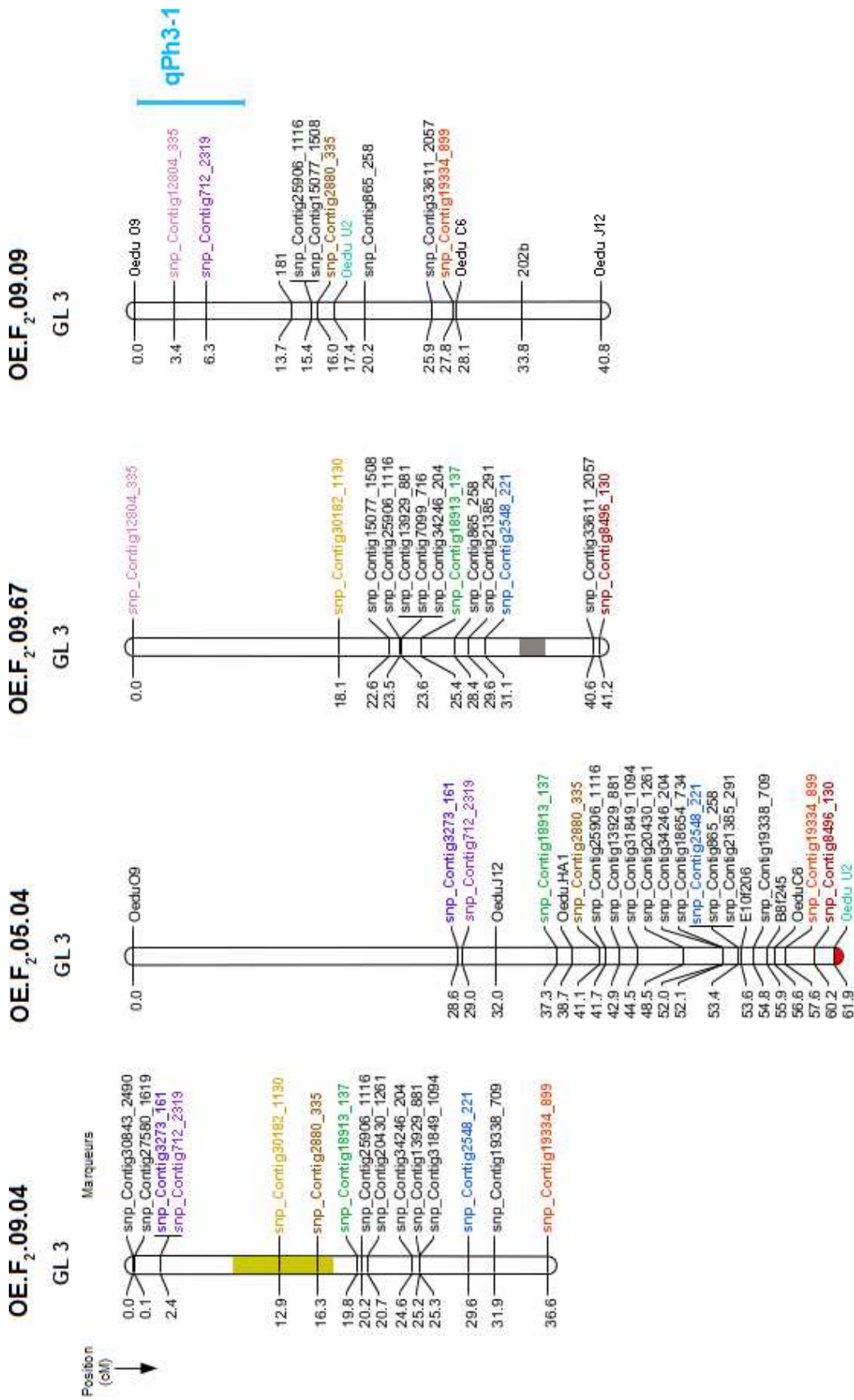


Figure 61 - Continue.

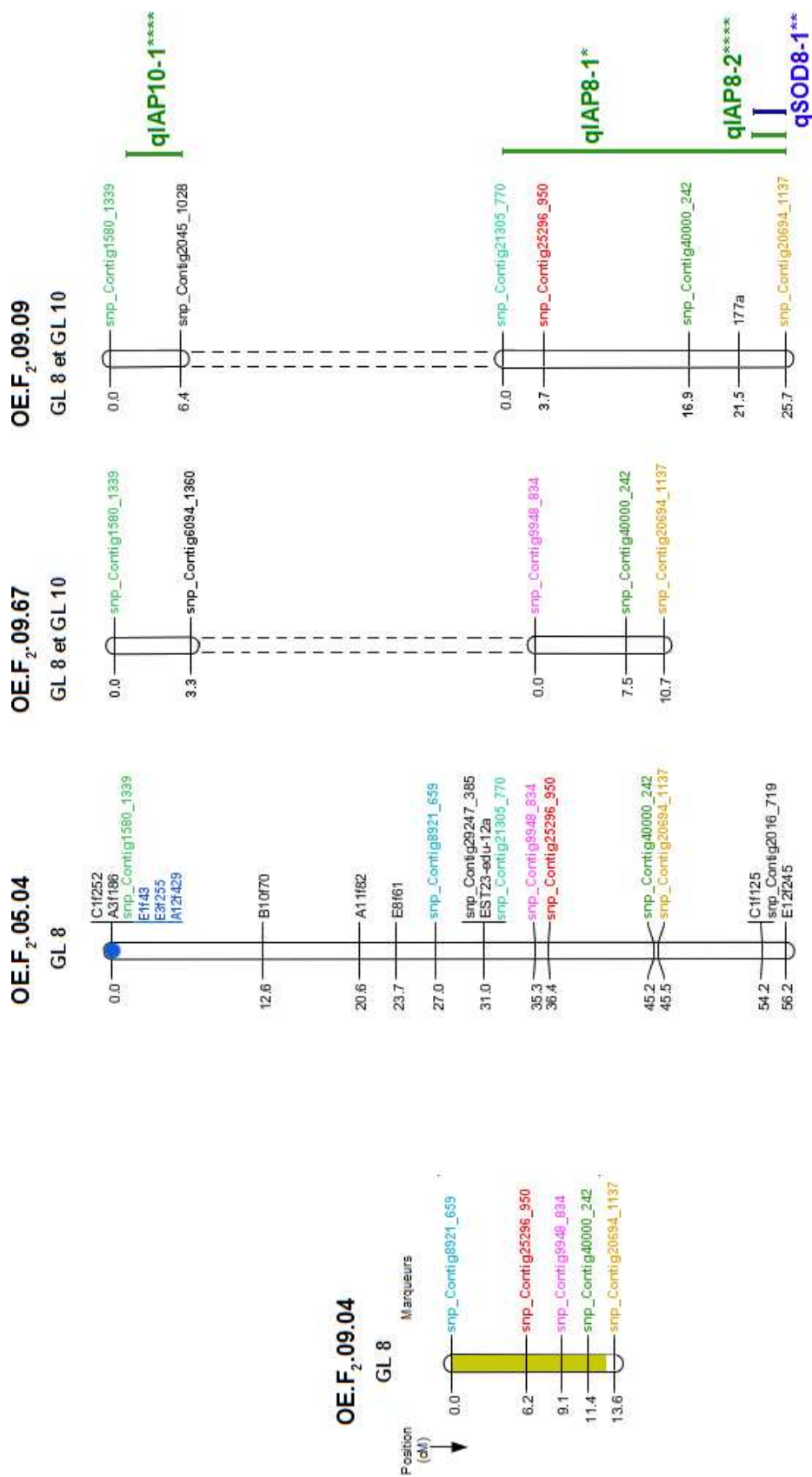
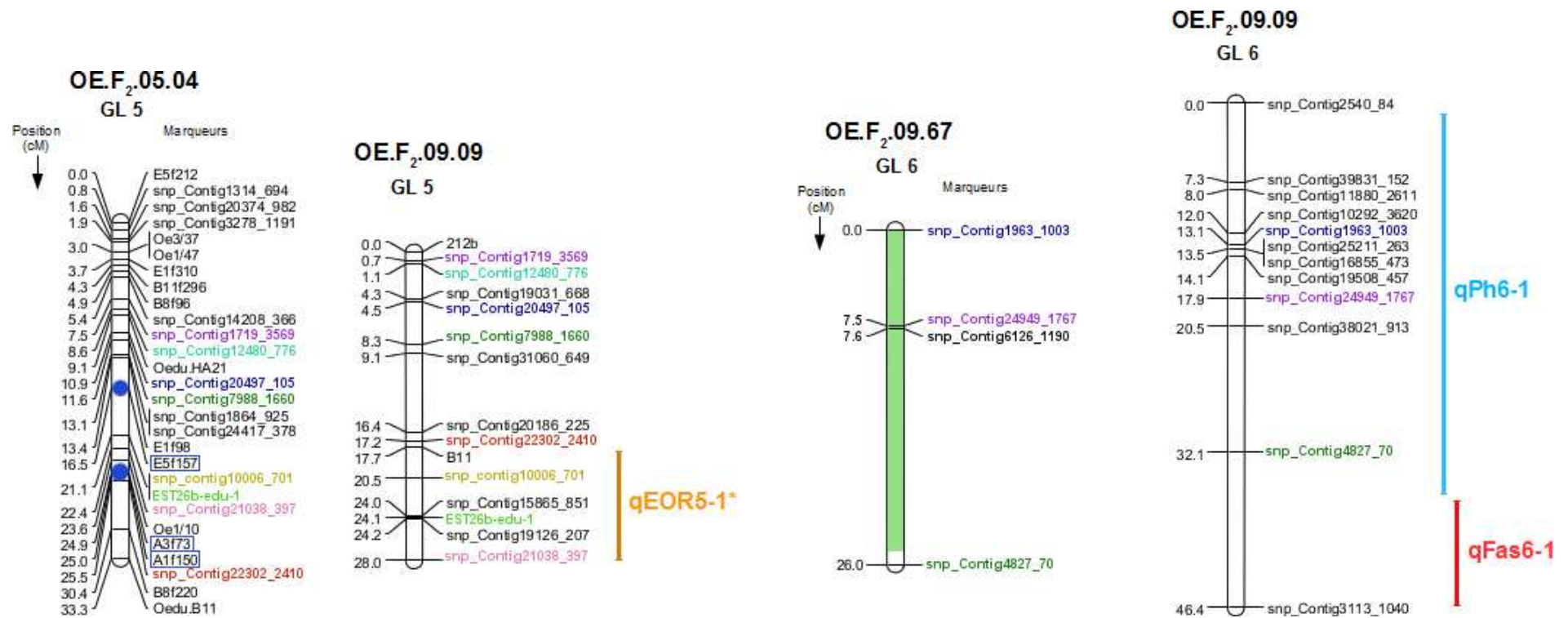


Figure 61 - Continue.



**Figure 61** – Cartographie comparée des QTL et eQTL liés à une infection à *B. ostreae*, et liés à l'expression de quatre gènes (C1q, Fas ligand, SOD, IAP) et de deux activités hémyocytaires (phagocytose, production d'EOR) potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose. Les comparaisons sont effectuées entre les familles OE.F<sub>2</sub>.09.04, OE.F<sub>2</sub>.05.04, OE.F<sub>2</sub>.09.67 [cf. **Partie IV.2.4.2**] et OE.F<sub>2</sub>.09.09. Cinq groupes de liaison (GL) sont comparés. Chaque marqueur en couleur est commun à au moins deux groupes homologues. L'intervalle de confiance des QTL est représenté par une couleur correspondant au seuil de significativité. Vert : NS ; Orange clair : P < 0,05 ; Orange foncé : P < 0,01 ; Gris : QTL douteux mentionné à titre d'information. Étant donné que des marqueurs ont été ajoutés sur la carte de la famille OE.F<sub>2</sub>.05.04, l'ordre des marqueurs et les distances sont modifiés par rapport aux données publiées (Lallias *et al.*, 2009a). Par conséquent, les marqueurs associés aux régions QTL ainsi que leur position sur le GL sont indiqués en bleu (points et encadrés). L'intervalle de confiance et le seuil de significativité (rien : NS ; \* : p < 0,05 ; \*\* : p < 0,01 ; \*\*\*\* : p < 0,001) des eQTL et QTL liés aux six paramètres quantitatifs sont indiqués avec une barre de couleur à droite du GL de la famille OE.F<sub>2</sub>.09.09. Le nom des eQTL et QTL est adapté de Cui *et al.* (2008).



### IV.3.5 Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la présente étude, les réponses fonctionnelles d'une famille ségrégeante soumise à une injection d'une suspension de *Bonamia ostreae* ont été étudiées à l'échelle des individus. L'injection de la suspension parasitaire n'a pas permis de déclencher le développement de la maladie, mais a néanmoins permis d'initier un différentiel de réponse à l'injection, entre les individus. Cinq gènes et deux activités hématocytaires préalablement identifiés comme potentiellement impliqués dans les mécanismes de réponse de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose (Morga *et al.*, 2009, 2011a,b, 2012) ont été étudiés par PCR en temps réel et par cytométrie en flux.

L'approche de « génétique génomique » (Jansen and Nap, 2001) utilisée a permis d'identifier des régions QTL et eQTL présumées ou significatives, pour chacun des cinq gènes et des deux activités hématocytaires. Les régions génomiques ainsi identifiées correspondent à des régions régulatrices de ces paramètres. Plusieurs eQTL et QTL ont été cartographiés sur les mêmes groupes de liaison, avec parfois un recouvrement des intervalles de confiance. Cette co-localisation suggère la présence de points chauds en eQTL ou de pléiotropie sur les GL 2 et GL 8-10, confirmant notamment l'intérêt d'affiner l'étude de ces groupements.

Dans cette étude, les QTL (et eQTL) ont été détectés à un instant donné de la cascade de régulation des gènes (2 mois après l'injection). Ainsi, il est possible que certaines régions génomiques potentiellement impliquées dans la réponse à la bonamiose n'aient pas été détectées. Afin d'optimiser la détection de QTL impliqués dans la régulation des gènes cibles, il pourrait s'avérer intéressant de combiner l'approche de cartographie avec une étude de la dynamique d'expression des gènes (Reis *et al.*, 2001), par exemple au cours d'une expérience d'infection avec *B. ostreae*.

D'autre part, la comparaison des positions de ces QTL et eQTL liés à la réponse à *B. ostreae* avec les QTL liés aux phénotypes de mort/survie ou aux phénotypes mort infecté/survivant non infecté à *B. ostreae* (cf. **Partie IV.2.4.2**; Lallias *et al.*, 2009a) a permis d'identifier neuf candidats positionnels pour la réponse à la bonamiose. Cette concordance positionnelle entre ces régions régulatrices et les QTL de réponse à la parasitose reflète l'importance de cibler spécifiquement ces régions génomiques lors de prochaines études. Il s'agirait notamment d'affiner leur localisation mais également de cartographier finement les gènes et de mieux caractériser les activités hématocytaires que ces eQTL et QTL régulent, afin de pouvoir préciser la nature des régions régulatrices, vis-à-vis de leur(s) effet(s) (*cis*, *trans*, *master regulators*).

L'approche de « génétique génomique » a pris son essor au cours des dix dernières années, particulièrement pour la recherche de QTL liés à des maladies affectant l'être humain (pour une revue voir Cookson *et al.*, 2009). Chez les espèces d'intérêt agronomique, des eQTL ont notamment été identifiés pour différents critères tels que la physiologie musculaire chez le porc (Liaubet *et al.*, 2011), la qualité de la viande chez le bœuf (Jiang *et al.*, 2009), la capacité d'acclimatation à l'eau de mer chez la truite arc-en-ciel (Le Bras *et al.*, 2011), mais également pour la résistance à la

maladie chez l'orge (Chen *et al.*, 2010), le poulet (Kaiser *et al.*, 2008) et le porc (Uddin *et al.*, 2011). Ces études ont notamment permis d'identifier des QTL impliqués dans plusieurs voies de régulation des mécanismes de l'immunité innée. Cependant, les cinq gènes et les deux activités hématocytaires potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose, et donc ciblés dans la présente étude, n'avaient pour l'instant pas encore été étudiés par cette approche.

Les QTL détectés par l'approche de « génétique génomique » s'avèrent particulièrement intéressants pour une implémentation dans un programme de sélection. En effet, l'étude des réseaux de gènes associés à plusieurs phénotypes d'intérêt permet notamment de détecter des interférences entre plusieurs fonctions biologiques (Perry *et al.*, 2003) ou plusieurs critères agronomiques d'intérêt (Jiang *et al.*, 2009), afin d'optimiser l'efficacité de la sélection. Les programmes de sélection sont alors basés sur les gènes différentiellement exprimés ou sur les régions génomiques impliqués dans le caractère d'intérêt via la mise en place d'une sélection assistée par marqueurs (MAS) ou d'une sélection assistée par gènes (GAS) (Dekkers, 2004).

Afin de pouvoir mettre en place un tel programme de sélection chez l'huître plate européenne, pour le caractère de la résistance à la bonamiose, il est tout d'abord primordial de préciser l'effet et la localisation des QTL et eQTL détectés dans la présente étude. Pour cela, il serait intéressant de développer des SNP de façon ciblée sur les gènes situés au sein des intervalles de confiance des QTL et eQTL, par une approche de cartographie fine [cf. **Partie III.3.4**].

Il est également nécessaire de reproduire l'approche de « génétique génomique » chez plusieurs autres familles d'huîtres plates afin de confirmer les résultats obtenus dans la présente étude, mais également d'identifier d'éventuelles régions régulatrices impliquées dans l'expression des gènes potentiellement liés à la réponse à la parasitose et qui n'auraient pas ségrégué chez la famille 09.09 [cf. **Partie IV.2.4.2**].

## IV.4 À l'échelle des populations

### IV.4.1 Introduction

Dans la **Partie IV.3**, nous avons étudié la variabilité inter-individuelle des réponses fonctionnelles potentiellement impliquées dans les mécanismes de résistance à la bonamiose. Cette variation peut également être étudiée à une autre échelle, celle des populations naturelles de l'huître plate européenne. En effet, comme nous le verrons dans la **Partie V**, malgré la connectivité du milieu marin et les fortes capacités de dispersion de *O. edulis* en phase larvaire planctonique, il s'avère que les populations naturelles de l'huître plate européenne sont génétiquement structurées par la distance géographique (Launey *et al.*, 2002). De plus, comme nous l'avons vu dans la **Partie I.2.2**, la bonamiose touche l'huître plate européenne sur plusieurs zones de son aire de répartition. Bien que le transfert de lots d'huîtres contaminées soit la principale cause d'expansion de la maladie et que cette pratique soit commune en ostréiculture, certaines zones géographiques ont cependant pu demeurer indemnes. Ainsi, certaines populations génétiquement différenciées possèdent un statut sanitaire différent vis-à-vis de la bonamiose. Dans ce contexte, il est intéressant d'étudier la variabilité des réponses de ces populations génétiquement et écologiquement distinctes, à un même épisode infectieux.

L'objectif de la présente partie de mes travaux est d'étudier la diversité de réponses à un même épisode infectieux, chez différentes populations naturelles. Pour ce faire, des individus provenant de trois populations naturelles d'*Ostrea edulis*, génétiquement et écologiquement distinctes, ont été expérimentalement soumis à une infection à *Bonamia ostreae*. À l'issue de l'expérimentation, les réponses à la parasitose ont été comparées et discutées à deux échelles. À l'échelle intrapopulationnelle, on s'intéresse à la capacité de la population à répondre à l'infection (comparaison des réponses entre un échantillon témoin injecté avec de l'eau de mer et un échantillon injecté avec une suspension parasitaire). À l'échelle inter-populationnelle, on s'intéresse à la variabilité des profils de réponses entre les populations (comparaison de l'intensité et du sens des réponses entre les populations). Deux types de réponses sont étudiées : les réponses cellulaires (activités des hémocytes), par la technique de cytométrie en flux, et les réponses moléculaires (expression de gènes), par la technique de PCR en temps réel. Les activités hémocytaires ciblées sont les activités de production d'espèces oxygénées réactives (EOR) et de phagocytose. Les gènes ciblés sont les gènes impliqués dans la reconnaissance du pathogène (Galectine), dans la voie classique du complément (C1q), dans la réponse oxydative (SOD cytoplasmique) et dans les mécanismes de l'apoptose (IAP, Fas ligand) d'autre part. Ces paramètres ont également été choisis du fait qu'ils ont été détectés modulés lors d'infections expérimentales chez plusieurs espèces de mollusques bivalves, en réponses à différents pathogènes (ex. : Gueguen *et al.*, 2003; Huvet *et al.*, 2004; Allam and Ford, 2006; Morga *et al.*, 2009, 2011a,b, 2012; Perrigault *et al.*, 2009; Prado-Alvarez *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Gestal *et al.*, 2010).

Il est à noter que la présente étude ne s'est pas déroulée de la façon dont elle avait été organisée. En effet, nous avons initialement prévu une expérience sur un mois, avec le sacrifice d'une partie

des individus, de chaque population et de chaque condition, à des intervalles de temps réguliers : 7, 15 puis 30 jours. En raison de fortes mortalités des huîtres testées avec la solution parasitaire, nous avons été obligé d'arrêter l'expérience de façon anticipée afin de pouvoir effectuer une partie des analyses prévues. Ainsi, malgré cet arrêt anticipé, la cinétique des mortalités et les réponses cellulaires et moléculaires observées à sept jours, chez les individus survivants et ceci pour chacune des populations, sont discutées dans cette étude préliminaire.

## IV.4.2 Matériels et Méthodes

### IV.4.2.1 Choix des trois populations *O. edulis* d'étude

Dans le cadre de cette expérimentation, le choix s'est porté sur trois populations naturelles d'*Ostrea edulis* ayant des histoires de vie différentes. Comme nous l'avons vu dans la **Partie I.2.2**, sur les côtes européennes, la bonamiose peut être due à deux espèces de parasites, *Bonamia ostreae* et *Bonamia exitiosa*. Aussi, nous avons choisi une population en contact depuis 1979 avec *B. ostreae*, site de Quiberon (Bretagne, France ; [Arzul et al., 2011](#)), une population au contact de *B. ostreae* et de *B. exitiosa*, site de l'étang de Diane (Corse, France ; [Arzul and Bouchoucha, 2008](#); [Guichard et al., 2010](#)), et une population naïve pour la bonamiose, site de Esbjerg (Danemark ; Décision européenne 2009/177/EC) [**Figure 62**].



**Figure 62** – Aire de distribution de l'huître plate Européenne *Ostrea edulis* (en vert), et localisation des trois populations naturelles de *Ostrea edulis* choisies pour l'expérimentation : population naïve de Esbjerg (Danemark, carré vert) ; population de Quiberon (Bretagne, France) au contact de *Bonamia ostreae* (carré rouge) ; population de l'étang de Diane (Corse, France) au contact de *Bonamia ostreae* et de *Bonamia exitiosa* (carré orange).

Étant donné que les trois lots d'huîtres provenaient du milieu naturel, une adaptation de plusieurs semaines aux conditions d'écloserie a été nécessaire. Ensuite, 200 individus de chacun des trois

lots ont été choisis pour l'infection expérimentale, à raison de 100 individus témoins injectés avec de l'eau de mer purifiée (EMF), et 100 individus testés injectés avec une solution purifiée de *Bonamia ostreae* (Bo).

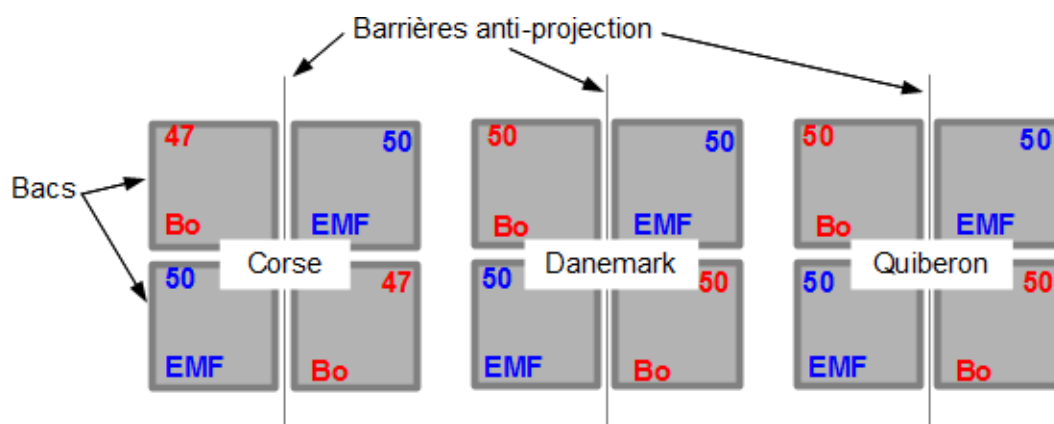
#### IV.4.2.2 Infection expérimentale

La suspension à injecter a été obtenue par purification de cellules de *Bonamia ostreae* provenant de tissus infectés d'huître plate, selon un protocole adapté de Mialhe *et al.* (1988a). Les protocoles de purification et d'injection sont détaillés **Partie IV.2.2.2** et **Partie IV.2.2.3**.

Afin de vérifier que seule l'espèce *Bonamia ostreae* a été purifiée et injectée, la suspension parasitaire a été contrôlée par PCR RFLP (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a) ainsi que par clonage (TA Cloning<sup>®</sup> Kit, Invitrogen<sup>™</sup>) et séquençage des produits d'amplification.

La quantité de parasites à injecter a été adaptée d'après les résultats des tests effectués par Hervio *et al.* (1995). En effet, ces auteurs ont montré que  $1,0 \cdot 10^5$  parasites étaient nécessaires pour infecter plus de 50 % des huîtres injectées, après 4 mois d'expérience. Dans le cas présent, l'expérimentation étant prévue pour 1 mois, il s'agissait de provoquer une infection plus rapidement. Pour cela, la quantité de parasites injectés a été triplée. Au total, 94 huîtres de la population de Corse, 100 huîtres de celle du Danemark et 100 huîtres de Quiberon ont été injectées à raison de  $3,3 \cdot 10^5$  cellules parasitaires (Bo) par individu. Les 300 huîtres témoin ont été injectées à raison de 100  $\mu$ L d'eau de mer filtrée (EMF).

Après injection, les 594 huîtres ont été installées dans le dispositif expérimental à raison de 50 huîtres par bac (47 huîtres corses pour la condition Bo), en séparant les trois populations et les deux conditions (injection Bo / EMF). Afin qu'il y ait un réplicat, deux bacs d'expérience ont été installés par condition et pour chaque population [Figure 63]. Cette étape correspondait au jour  $J_0$  de l'expérimentation.



**Figure 63** – Dispositif expérimental des lots témoins (EMF) et testés (Bo) des 3 populations naturelles (Corse, Danemark, Quiberon). Les effectifs d'huîtres sont indiqués dans le coin supérieur de chacun des bacs. Des barrières anti-projection sont installées entre les réplicats afin de limiter les projections entre les bacs.

Afin de cloisonner les différentes populations, chaque bac disposait d'un couvercle de polystyrène.

Les 12 bacs d'expérience de 150 L ont été alimentés en eau de mer, en continu et à faible débit ( $60 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Un bulleur assurait l'oxygénation de l'eau. Les variations de température ont été enregistrées au moyen de thermo-boutons. Le nettoyage des bacs a été effectué une fois par semaine.

#### IV.4.2.3 Prélèvements et analyses de données

Pour comparer les réponses immunitaires des trois populations, sans tenir compte de la variabilité individuelle des réponses au sein de ces populations, les échantillons d'un même bac expérimental ont été regroupés après prélèvement (Morga *et al.*, 2011b).

##### IV.4.2.3.1 Prélèvements d'hémolymphe

Pour chaque huître sacrifiée, une ponction d'hémolymphe a été effectuée dans le muscle adducteur.

L'hémolymphe étant utilisée pour deux types d'analyses, pour chaque individu, une portion de  $150 \mu\text{L}$  du volume total de l'échantillon d'hémolymphe a été prélevée et utilisée en cytométrie en flux. Le reste de l'échantillon a été stabilisé dans du RNAlater<sup>®</sup> (Qiagen), pour une utilisation ultérieure pour la mesure de l'expression des gènes.

Les protocoles sont détaillés dans la **Partie IV.3.2.3.4**.

##### IV.4.2.3.2 Cytométrie en flux

Les échantillons d'hémolymphe des individus provenant d'un même bac expérimental ont été regroupés pour former un « pool » d'hémolymphe. Ce pool a ensuite été dilué avec de l'eau de mer filtrée, pour obtenir une concentration de  $10^6$  cellules par mL.

Au total,  $200 \mu\text{L}$  ( $\approx 200\,000$  hémocytes) de chaque pool ont été nécessaires pour réaliser chaque mesure. Les mesures étant réalisées en triplicats, un total de  $600 \mu\text{L}$  d'hémolymphe a été nécessaire pour chacune des deux mesures d'activité cellulaire.

La capacité phagocytaire des hémocytes ainsi que la production d'espèces oxygénées réactives (EOR) ont été mesurées sur un cytomètre analyseur EPICS<sup>®</sup> XL<sup>™</sup> (Beckman Coulter), suivant les protocoles détaillés dans la **Partie IV.3.2.3.5**.

##### IV.4.2.3.3 Purification de l'ARN total et synthèse des ADN complémentaires

Après décongélation des échantillons d'hémolymphe congelés dans le RNAlater<sup>®</sup>, les échantillons provenant d'un même bac expérimental (même population et même condition Bo ou EMF) ont été regroupés dans un même tube.

Après élimination du surnageant, les ARN ont été extraits au TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>). Cette méthode d'extraction nécessite l'utilisation de Chloroforme alcool isoamylique pour séparer les ARN de l'ADN et des protéines. Ensuite, après une précipitation des ARN à l'Isopropanol froid,

un lavage à l'éthanol à 75 % a permis de laver les ARN. Ceux-ci ont ensuite été séchés sous hotte aspirante avant d'être remis en suspension dans 22  $\mu\text{L}$  d'eau Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore).

Afin d'éliminer l'ADN résiduel, les échantillons ARN ont ensuite été traités à la TURBO<sup>™</sup> DNase (Ambion). Ce traitement consistait en une incubation à 37 °C pendant 45 min d'un mélange réactionnel composé d'ARN, de DNase (2 U. $\mu\text{L}^{-1}$ ), Tampon 10 x et d'eau Milli-Q<sup>®</sup> (q.s.p 50  $\mu\text{L}$ ). La TURBO DNase a ensuite été inactivée par une nouvelle purification des ARN au TRIZOL<sup>®</sup>. L'éluion finale a été effectuée dans 22  $\mu\text{L}$  d'eau Milli-Q.

La concentration en ARN des échantillons a ensuite été mesurée à 260 nm au moyen d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La qualité des ARN a également été vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 %.

Après la purification d'ARN total, une no-RT PCR a été effectuée pour vérifier l'absence d'ADN résiduel. Les ARN purifiés ont ensuite été rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Les protocoles utilisés sont décrits dans la **Partie IV.3.2.3.6**.

#### IV.4.2.3.4 PCR en temps réel

La PCR d'expression comparative a été réalisée à partir des ADNc dilués au 1/30<sup>ème</sup>. Le mélange réactionnel et le profil thermique étaient identiques à ceux de la no-RT PCR.

Cinq gènes potentiellement impliqués dans la résistance ou la sensibilité à la bonamiose ont été étudiés (Morga *et al.*, 2011a,b, et Morga, comm. pers.) : Fas ligand (GU320694), Oe-SOD (GU320695), Galectine (GU320697), C1q (GU814271) et IAP (GU814273). Le facteur d'élongation 1 Alpha (EF1- $\alpha$ , EU651798) a été utilisé comme gène de ménage (ou normalisateur, Morga, 2010). Les caractéristiques des six gènes utilisés sont récapitulées dans la **Table 24**.

Afin de pouvoir effectuer les analyses d'expression relative dans des conditions optimales, pour un même gène d'intérêt étudié, les ADNc des trois populations (Corse, Danemark, Quiberon) et de leurs deux conditions (EMF et Bo), ainsi que leurs réplicats respectifs et des échantillons témoins dépourvus d'ADNc permettant de repérer une éventuelle contamination (NTC), ont été positionnés sur la même microplaque. De même, pour pouvoir effectuer la normalisation des valeurs d'expression par le gène de ménage, celui-ci a systématiquement été traité sur les échantillons, en parallèle aux autres gènes étudiés, sur chaque microplaque.

Les données d'expression ont été acquises, au cours de la PCR, sous le logiciel MxPro (Stratagene). À l'issue de la PCR, pour chaque échantillon de chacun des six gènes, la spécificité de la réaction d'amplification a ensuite été vérifiée par la présence d'un unique pic de dissociation pour chacun des gènes [**Figure 54**].

Un intervalle maximal de  $[-0,5 \text{ Ct} ; 0,5 \text{ Ct}]$  a été accepté entre les différents réplicats d'un même

échantillon. Après validation des répliqués, l'analyse comparative portait sur la moyenne de leurs valeurs de Ct, et un écart-type a été calculé.

L'expression des 5 gènes d'intérêt a été calculée par la méthode dite du «  $\Delta\Delta\text{Ct}$  » de Pfaffl (2003) [cf. **Partie IV.3.2.3.7 adaptée**]. Indépendamment pour chacun des gènes, la réponse spécifique à l'injection Bo a été obtenue par correction des valeurs d'expression pour la condition Bo, par la condition EMF ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{Bo} - \text{Ct}_{EMF}$ ). L'expression de chacun des gènes d'intérêt (GI) a ensuite été corrigée par la valeur d'efficacité de la réaction d'amplification propre à chaque gène ( $E^{\Delta\text{Ct}}$ ), puis normalisée par la valeur d'expression du gène de ménage (GM) :

$$ratio = \frac{(E_{GI})^{\Delta\text{Ct}_{GI}(Bo-EMF)}}{(E_{GM})^{\Delta\text{Ct}_{GM}(Bo-EMF)}}$$

Pour un échantillon donné, une fois les corrections et calibrations effectuées, le gène d'intérêt est apparu sur-exprimé ou sous-exprimé par rapport au calibrateur (condition EMF). Les valeurs ont ensuite été transformées en  $\text{Log}_2$  pour la normalisation des séries quantitatives.

#### IV.4.2.3.5 Analyses statistiques

La différence d'activités hématocytaires ou d'expression génique a été testée statistiquement pour une même population entre les conditions Bo et EMF (échelle intra-population), ou entre les trois populations pour la réponse spécifique à l'injection Bo (échelle inter-population). Comme nous l'avons vu **Partie IV.3.3.3** et **Partie IV.3.3.4**, la distribution des valeurs quantitatives pour ces activités et la distribution des valeurs d'expression génique suivent une loi normale ; des tests paramétriques ont donc été utilisés. Les différences ont été testées au moyen du test du  $\chi_2$  d'homogénéité sur les valeurs moyennes entre les répliqués ( $n = 2$ ). La significativité des tests a été établie pour une valeur de  $p < 0,05$ . Une tendance a été donnée pour les  $p$ -values  $< 0,10$ . Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R project version 2.1.4.1. (R Development Core Team, 2011 ; <http://www.r-project.org/>).

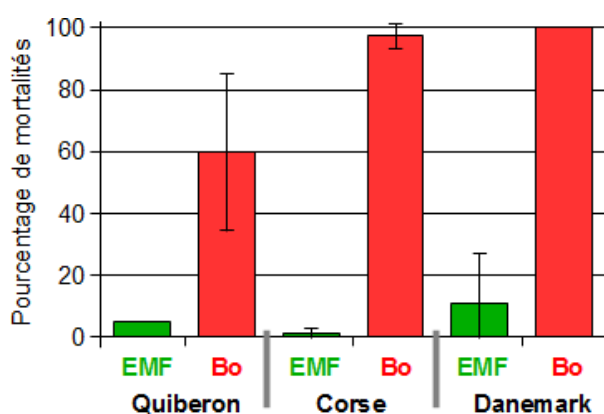
### IV.4.3 Résultats

#### IV.4.3.1 Arrêt prématuré de l'expérience

Initialement prévue pour une durée d'un mois, la présente expérimentation a dû être interrompue une semaine après son lancement (à J<sub>7</sub>) en raison de fortes mortalités des huîtres injectées avec la suspension parasitaire, et ce chez les trois populations (Corse, Danemark, Quiberon) [**Figure 64**]. Les premières mortalités ont été observées dès le troisième jour (J<sub>3</sub>) suivant le lancement de l'expérience, et ce, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'huîtres survivantes pour les populations de Corse et du Danemark [**Figure 65-A**]. En revanche, 60 % des huîtres de Quiberon, injectées Bo, ont survécu au-delà de la première semaine. La température de l'eau était identique entre les bacs, et est restée stable pendant cette période, variant d'une amplitude de 1,2°C [**Figure 65-B**].



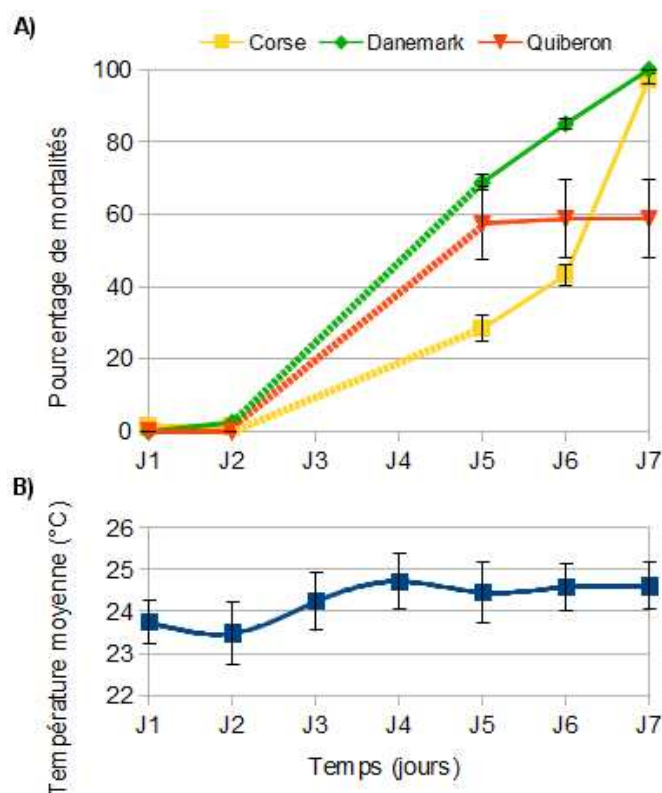
Aucun autre paramètre environnemental n'a été mesuré. Sur les 50 huîtres testées de chaque bac, les pourcentages de mortalités sont calculés sur 40 huîtres, à la fin de J<sub>7</sub>. En effet, malgré les mortalités, des prélèvements d'hémolymphe ont pu être effectués sur quelques individus survivants ( $n \leq 10$ ), le matin de J<sub>7</sub>. Les effectifs des individus biopsés sont récapitulés dans la **Table 26**. Les prélèvements d'hémolymphe n'étant effectués que sur des individus vivants, pour les populations Corse et Danemark les effectifs par réplicat sont inférieurs à dix car les autres individus étaient « baillants », c'est-à-dire que leur muscle adducteur ne permettait pas aux deux valves de se fermer complètement ou de rester fermées plus de quelques secondes. Les tissus de l'huître sont alors souvent en phase de dégradation et ne sont donc pas exploitables pour des mesures d'expression de gènes et des analyses en cytométrie en flux.



**Figure 64** – Pourcentages de mortalités des lots d'huîtres des 3 populations (Corse, Danemark, Quiberon) testées, au bout d'une semaine d'expérimentation. EMF : huîtres injectées avec de l'eau de mer filtrée (= condition témoin) ; Bo : huîtres injectées avec la suspension parasitaire (= condition test). Un écart-type est calculé entre les deux réplicats de la même condition, pour la même population. Pour Quiberon-EMF et Danemark-Bo, les écart-types sont égaux à zéro.

**Table 26** – Effectifs des individus biopsés à J<sub>7</sub>, par population (Corse, Danemark, Quiberon) et par condition (EMF, Bo). Un réplicat est disponible par condition (EMF 1, EMF 2, Bo 1, Bo 2). EMF : huîtres injectées avec de l'eau de mer filtrée (= condition témoin) ; Bo : huîtres injectées avec la suspension parasitaire (= condition test).

Population	Corse				Danemark				Quiberon			
	EMF 1	EMF 2	Bo 1	Bo 2	EMF 1	EMF 2	Bo 1	Bo 2	EMF 1	EMF 2	Bo 1	Bo 2
Effectifs	10	10	4	8	10	10	1	1	10	10	10	10



**Figure 65** – **A)** Cinétique de l'épisode de mortalités ayant touché les huîtres plates, des 3 populations naturelles, injectées avec la suspension parasitaire au jour  $J_0$ . L'épisode de mortalités commence à  $J_3$ . Les portions en pointillés traduisent l'absence de données pour les jours  $J_3$  et  $J_4$ . Un écart-type est calculé entre les deux réplicats d'une même population. **B)** Température journalière moyenne de l'eau de mer contenue dans les bacs expérimentaux. L'écart-type est calculé entre les bacs contenant les 3 populations étudiées.

#### IV.4.3.2 Recherche des causes de l'épisode de mortalités

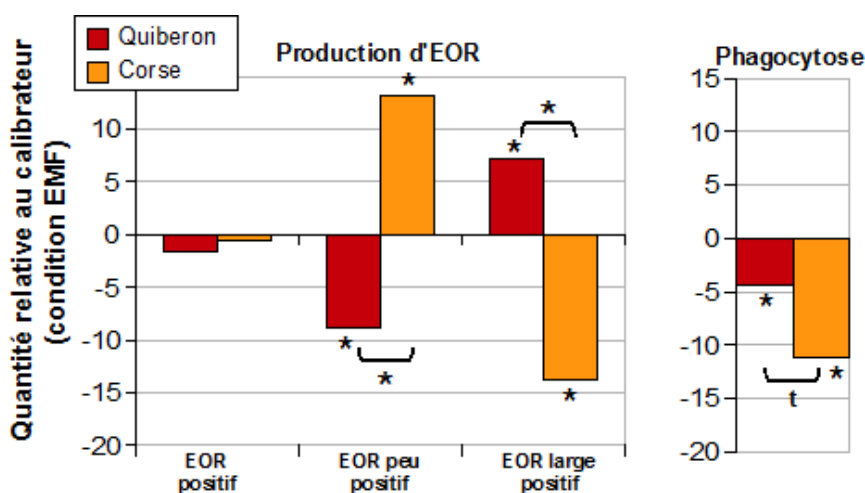
En réaction à cet épisode brutal de mortalités, alors que celles-ci n'étaient pas attendues dans un délai aussi court après l'infection expérimentale, des analyses ont été effectuées sur plusieurs huîtres mortes au cours de la première semaine : 3 huîtres de la population du Danemark, 3 huîtres de celle de Quiberon et 2 huîtres de celle de Corse.

La recherche d'agent(s) infectieux a porté sur les agents reconnus pour provoquer des mortalités rapides chez les huîtres, tels que le virus OsHV-1 (Arzul and Renault, 2002) et les bactéries du genre *Vibrio* (*V. aestuarianus*, *V. splendidus*, Garnier *et al.*, 2007). Le parasite injecté aux huîtres, *Bonamia ostreae*, a également été recherché. Les analyses sur les 8 huîtres ont été réalisées par PCR en temps réel (Pépin *et al.*, 2008; Robert *et al.*, 2009; Saulnier *et al.*, 2009), et se sont révélées négatives quel que soit l'agent testé.

#### IV.4.3.3 Réponses cellulaires

Les huîtres survivantes aux mortalités des premiers jours d'expérimentation, et sacrifiées à J<sub>7</sub> [Table 26], ont été analysées en cytométrie en flux.

La réponse spécifique à l'injection de la suspension Bo ( $\Delta = \%_{Bo} - \%_{EMF}$ ), pour les activités de production d'EOR et de phagocytose, est étudiée chez les populations de Corse et de Quiberon. Étant donné que la population du Danemark ne représente que deux individus pour la condition Bo, elle a été écartée de l'analyse [Figure 66].



**Figure 66** – Quantités relatives de cellules hémocytaires positives, faiblement positives et fortement positives pour la production d'EOR, et positives pour l'activité de phagocytose, par rapport aux quantités obtenues pour la condition EMF (calibrateur) ramenées à zéro, pour la réponse spécifique à l'injection de la suspension Bo. La production d'EOR et l'activité de phagocytose sont soit plus importantes, soit plus faibles que celles obtenues pour la condition EMF (égales à zéro). Les comparaisons sont effectuées entre les conditions EMF et Bo, et entre Quiberon (rouge) et Corse (orange) (accolades). t : tendances ( $p < 0,10$ ) ; \* : significativité ( $p < 0,05$ ).

Les huîtres de Quiberon et de Corse présentent la même proportion d'hémocytes pour la production totale d'EOR. Cette proportion n'est pas différente entre les conditions EMF et Bo. Cependant, les huîtres de Quiberon présentent significativement moins d'hémocytes pour la production faiblement positive d'EOR, et par conséquent significativement plus de cellules à la production fortement positive d'EOR, en réponse à l'injection Bo, mais également par rapport à la réponse des huîtres de Corse à la condition Bo.

Les huîtres de Corse présentent significativement plus d'hémocytes pour la production faiblement positive d'EOR, et par conséquent significativement moins de cellules à la production fortement positive d'EOR, en réponse à l'injection Bo.

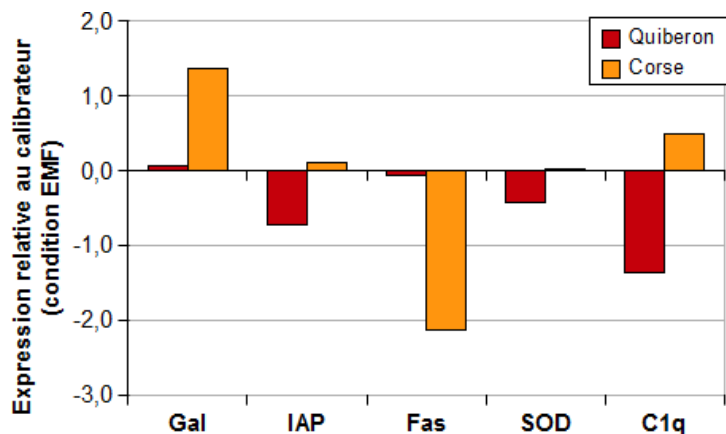
Les huîtres des deux populations présentent une capacité de phagocytose significativement moindre en réponse à l'injection Bo, par rapport à l'injection EMF. Cependant, cette activité tend à diminuer davantage chez les huîtres de Corse que chez les huîtres de Quiberon ( $p < 0,10$ ).

#### IV.4.3.4 Réponses moléculaires

Les huîtres survivantes aux mortalités des premiers jours d'expérimentation, et sacrifiées à J<sub>7</sub> [Table 26], ont été analysées en PCR en temps réel.

La réponse spécifique à l'injection de la suspension Bo, pour l'expression des cinq gènes ciblés, est étudiée chez les populations de Corse et de Quiberon. Étant donné que la population du Danemark ne représente que deux individus pour la condition Bo, elle a été écartée de l'analyse [Figure 67].

Il n'y a pas de différence significative d'expression génique entre les deux populations, ni entre les conditions EMF et Bo pour chaque population. Cependant, le gène de la Galectine est sur-exprimé chez la population Corse en réponse à l'injection Bo par rapport à l'injection EMF, alors que le gène Fas ligand est sous-exprimé. Pour les huîtres de Quiberon, les gènes C1q, IAP et SOD sont sous-exprimés en réponse à l'injection Bo par rapport à l'injection EMF.



**Figure 67** – Quantités relatives d'expression des gènes de la Galectine (Gal), IAP, Fas ligand (Fas), SOD, C1q, pour les populations de Quiberon (rouge) et de Corse (orange) pour la condition Bo par rapport aux quantités obtenues pour la condition EMF (calibrateur) ramenées à zéro. Les gènes sont soit sous-exprimés, soit sur-exprimés par rapport au calibrateur. Les comparaisons sont effectuées entre les conditions EMF et Bo.

## IV.4.4 Discussion

### IV.4.4.1 Épisode de mortalités

La présente étude avait pour objectif d'étudier la diversité de réponse, à un même épisode infectieux, chez des huîtres provenant de trois populations naturelles génétiquement et écologiquement distinctes. Cette expérience était initialement prévue pour une durée d'un mois, mais elle a dû être interrompue à cause de fortes mortalités des huîtres injectées avec la suspension parasitaire, et ce chez les trois populations (Corse, Danemark, Quiberon).

Les premières mortalités ont été signalées le troisième jour et le quatrième jour après le lancement de l'expérience. Malheureusement, ces deux jours correspondaient au week-end et les huîtres mortes n'ont pas été dénombrées, ce qui explique le manque de données en cinétique pour ces deux jours. Les tissus des huîtres mortes étaient très dégradés (déliquescents) et ont été congelés pour analyses ultérieures. Il n'y avait donc aucun tissu frais disponible pour effectuer une culture bactérienne afin de rechercher un éventuel pathogène, telle qu'une bactérie très virulente qui aurait été concentrée lors de la purification de *B. ostreae*.

De façon intéressante, les huîtres de Quiberon utilisées dans la présente expérience (injectées à raison de  $0,33 \cdot 10^6$  parasites par individu) et celles qui ont été injectées dans l'expérience d'infection par cohabitation [ $0,5 \cdot 10^6$  ou  $1 \cdot 10^6$  parasites par individu ; cf. **Partie IV.2.2.3**] proviennent d'un même échantillonnage (site et date). Or, les huîtres sur-infectées par injection d'une quantité équivalente, voire supérieure, de parasites présentaient, cinq jours après l'injection (à J<sub>5</sub>), un taux de mortalité beaucoup plus faible que dans la présente expérience (7 % contre près de 60 %). Ainsi, le délai de trois jours avant les premières mortalités s'avère relativement court pour un développement du parasite *Bonamia ostreae*, et *a fortiori* pour le déclenchement d'un important épisode de mortalités associées à ce développement.

Pour tenter de comprendre la cause de cet épisode brutal de mortalités, les agents infectieux reconnus pour provoquer des mortalités rapides chez les huîtres ont été recherchés sur plusieurs huîtres mortes issues des trois populations. Parmi ces agents, les analyses se sont portées sur l'Herpès virus de l'huître (OsHV-1), qui est potentiellement responsable des épisodes de mortalités chez *Crassostrea gigas* (Arzul and Renault, 2002). *Vibrio splendidus* et *Vibrio aestuarianus*, connus chez *C. gigas* et *C. virginica* (Garnier *et al.*, 2007) pour induire des mortalités chez leur hôte, ont également été ciblés. Les analyses sur les huîtres mortes se sont toutes révélées négatives, y compris la recherche de *B. ostreae*, dont un éventuel développement aurait pu expliquer les mortalités. Les analyses ont été réalisées à partir du broyat de la totalité des tissus de l'huître. Cependant, la présence de *B. ostreae* a été confirmée au sein de la suspension parasitaire injectée aux huîtres. Par conséquent, l'appellation « Bo » a été conservée pour désigner la condition des huîtres injectées avec la suspension parasitaire.

Au cours de l'expérience, la température de l'eau est restée relativement stable, autour de 23-

24 °C. Cependant, une augmentation de 1 °C de la température de l'eau, entre le deuxième et le quatrième jour d'expérience, coïncide avec le début des mortalités. Néanmoins, il apparaît peu probable que cette différence de températures suffise à provoquer le développement d'un agent infectieux. En effet, il n'est pas rare que la température de l'eau évolue d'un degré voire davantage au sein d'une même journée, sans que cela provoque des mortalités.

Une autre hypothèse pour expliquer cet épisode de mortalités réside dans la concentration de la suspension parasitaire injectée. Comme nous l'avons vu, seul le parasite *Bonamia ostreae* a été détecté au sein de la suspension. Le volume et la concentration des cellules de *B. ostreae* injectées aux huîtres testées ont été adaptés d'après les résultats des tests effectués par [Hervio et al. \(1995\)](#). Il est cependant possible que la suspension parasitaire ait été trop concentrée. En effet, le comptage sur cellule de Malassez, des cellules de *B. ostreae* isolées par purification, est une méthode peu reproductible d'un expérimentateur à l'autre. Il est ainsi possible que j'ai sous-estimé la concentration cellulaire.

Comme nous venons de le voir, il est difficile d'affirmer que le parasite *Bonamia ostreae* soit à l'origine des mortalités observées. Pourtant, la différence très significative de mortalités observées entre les conditions EMF et « Bo » ( $p < 0,001$ ), et ceci quelle que soit la population considérée, est bien due à l'isolat purifié et dilué dans le même échantillon d'EMF que celui utilisé pour l'injection témoin.

Il est cependant à noter que les huîtres provenant de Quiberon correspondent à la seule population étudiée dont une partie des effectifs a survécu au-delà de la première semaine d'expérimentation (40 % de survie). De façon intéressante, il est également à noter qu'une fois passée cette première semaine, il n'y a pas eu de mortalité supplémentaire pour les huîtres de Quiberon. Le taux de survie observé sur cette population est équivalent aux taux de survie déjà observés sur des huîtres *O. edulis* issues de captage naturel, de l'ordre de 53 à 66 % pour des huîtres testées en milieu naturel, et de 32 % à 48 % pour des huîtres injectées avec *B. ostreae* au laboratoire ([Martin et al., 1992](#)).

D'autre part, la cinétique de l'épisode de mortalités reprend le profil des courbes de mortalités obtenues par [Culloty et al. \(2004\)](#) pour des populations naturelles et une population sélectionnée d'*O. edulis*, testées sur plusieurs milieux naturels où le parasite est présent.

La population du Danemark présente un profil de mortalités similaire aux populations pour lesquelles le parasite n'a jamais été détecté, testées sur un site distant de leur milieu naturel ([Culloty et al., 2004](#)). En effet, avec une augmentation brutale des mortalités, rapides et totales, cette population a le comportement type d'une population naïve, qui n'a apparemment jamais rencontré ce type d'épisode infectieux.

La population de Corse présente, quant à elle, un profil de mortalités similaire aux populations pour lesquelles le parasite est détecté depuis plus de 10 ans, et qui sont testées dans leur milieu naturel ([Culloty et al., 2004](#)). En effet, avec une augmentation progressive et linéaire des mortalités au début de l'épisode infectieux, cette population semble refléter un effet d'adaptation vis-à-vis du parasite. Cependant, les huîtres ne semblent pas parvenir à stopper l'infection puisque les

mortalités augmentent de façon fulgurante dès le sixième jour d'expérience.

Pour finir, la population de Quiberon présente un profil similaire aux populations sélectionnées pour la résistance au parasite, avec néanmoins une variation des scores de survie en fonction du milieu test (Culloty *et al.*, 2004). En effet, après une augmentation rapide des mortalités à 60 % chez la population de Quiberon, celles-ci n'évoluent plus de façon significative. Cette population présente le comportement typique d'une population dont les huîtres sensibles meurent rapidement et les huîtres résistantes survivent. Ainsi, il est possible que la population de Quiberon ait développé une résistance naturelle vis-à-vis du contenu de la suspension parasitaire injectée.

Ces trois populations suivant toutes un profil de mortalités différent, il est par conséquent très intéressant d'étudier, pour chacune d'elle, un éventuel différentiel de réponses fonctionnelles à l'injection d'une solution parasitaire (« Bo »).

#### IV.4.4.2 Réponses fonctionnelles à un épisode infectieux

Étant donné que seules deux huîtres de la population du Danemark ont survécu au-delà d'une semaine, cette population n'a pas été conservée pour les analyses.

Les réponses cellulaires et moléculaires ont été étudiées pour les populations de Corse et de Quiberon, en comparant les réponses obtenues après injection d'eau de mer filtrée (EMF) et celles obtenues après injection d'une suspension infectieuse. Le parasite *Bonamia ostreae* ayant bien été détecté dans cette suspension, la dénomination « Bo » a été conservée.

Les huîtres originaires de Quiberon sont confrontées au parasite *B. ostreae* depuis plus de 30 ans (Arzul *et al.*, 2011). Ces huîtres présentent, après injection de parasites, une moindre expression des gènes IAP, SOD et C1q par rapport à la condition témoin (injection d'EMF). Le C1q est impliqué dans la voie classique du complément (Kishore *et al.*, 2004) alors que l'IAP est un inhibiteur de la voie de l'apoptose (Deveraux *et al.*, 1997), et que la SOD cytoplasmique est impliquée dans la détoxification des cellules par la transformation des EOR (Gonzalez *et al.*, 2005). Ces gènes sont généralement sur-exprimés lors d'une réponse à un pathogène comme chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Gestal *et al.*, 2010), la clam *Mercenaria mercenaria* (Perrigault *et al.*, 2009), la palourde *Ruditapes decussatus* (Prado-Alvarez *et al.*, 2009) et l'huître plate *Ostrea edulis* (Morga *et al.*, 2011b), ou en réponse à un stress environnemental chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Boutet *et al.*, 2004). L'expression plus faible des gènes codant pour IAP, C1q et SOD dans le cas de la réponse à l'injection Bo reflète une possible adaptation des huîtres de Quiberon à une infection avec le parasite *B. ostreae*. Néanmoins, il semble que cette réponse décroisse avec le temps depuis l'injection, particulièrement pour la cavortin (homologue de la SOD) chez *C. gigas*, en réponse à *Vibrio splendidus* (Huvet *et al.*, 2004). Les résultats de précédentes études suggèrent en effet que le rôle de ces gènes puisse être plus précoce au cours de la réponse (Huvet *et al.*, 2004; Morga *et al.*, 2011b). Dans ce cas, il est également possible que ces gènes n'aient plus un rôle prépondérant dans les mécanismes de réponse de l'hôte, sept jours après l'injection.

L'expression du gène de la SOD est à relier à la production d'espèces oxygénées réactives. En effet, les EOR sont des agents cytotoxiques produits par les cellules ayant une activité de phagocytose

(Anderson, 2001). Ces agents participent à la dégradation oxydative des particules xénobiotiques. Lorsqu'ils sont produits et s'accumulent en grandes quantités, ils deviennent toxiques pour l'individu. La SOD cytoplasmique intervient alors dans la détoxification des cellules par la transformation des EOR (Gonzalez *et al.*, 2005). Dans la présente étude, les huîtres injectées Bo présentent significativement davantage de cellules produisant une forte proportion d'EOR que les huîtres injectées EMF. Cette plus forte production d'EOR pourrait ainsi être reliée avec une moindre transformation de la part de la SOD. Cependant, la proportion totale de cellules hémocytaires produisant des EOR diminue légèrement.

La population de Corse est, quant à elle, au contact des parasites *B. ostreae* et *B. exitiosa* (Arzul and Bouchoucha, 2008; Guichard *et al.*, 2010). Les huîtres originaires de Corse présentent, après injection de parasites, une diminution significative de la proportion de cellules présentant une forte production d'espèces oxygénées réactives (EOR). La diminution de cette activité est en adéquation avec les résultats obtenus au cours d'études *in vitro* (Morga *et al.*, 2009, 2011b) et *in vivo* (Morga, 2010) des relations entre *O. edulis* et son parasite *B. ostreae*. Le gène codant pour la SOD cytoplasmique intervenant notamment dans ce mécanisme (Gonzalez *et al.*, 2005), on aurait pu s'attendre à ce que l'expression de ce gène soit différentiellement modulée entre les populations, en réponse au stress oxydatif. Or, aucune différence n'est observée en réponse à l'injection Bo. La diminution de la proportion de cellules fortement productrices d'EOR suggère donc une diminution de l'investissement cellulaire dans la réponse oxydative de la part des huîtres de Corse.

D'autre part, les huîtres originaires de Corse présentent, après injection de parasites, une sur-expression du gène de la Galectine et une sous-expression du gène Fas ligand.

La Galectine est impliquée dans la reconnaissance des pathogènes potentiels. Généralement, cette reconnaissance permet de faciliter la phagocytose des organismes pathogènes (Tasumi and Vasta, 2007; Vasta, 2012), afin de déclencher ensuite la dégradation oxydative. Cependant, dans le cas des huîtres de Corse, l'augmentation de l'expression de la Galectine n'est pas associée à une augmentation mais à une diminution significative de la phagocytose. Une diminution significative de l'activité de phagocytose est également observée chez les huîtres de Quiberon injectées Bo. Ces observations sont en accord avec les résultats de précédents travaux d'injection du parasite *B. ostreae* chez des huîtres résistantes Morga2010. En effet, il ne faut pas oublier que *B. ostreae* semble survivre, à la dégradation oxydative, à l'intérieur des hémocytes (Chagot *et al.*, 1992; Mourton *et al.*, 1992). Étant donnée que la phagocytose, en internalisant le parasite, pourrait également favoriser son développement, il ne serait pas étonnant que les huîtres résistantes modulent cette activité.

Fas ligand initie la cascade d'activation de l'apoptose (Opferman, 2008). La diminution de l'expression de ce gène chez les huîtres Corse injectées Bo est à relier à la diminution de cette réponse, à 3 et 5 jours, chez des huîtres sauvages également infectées par injection avec *B. ostreae* (Morga, 2010), alors que les huîtres résistantes sur-expriment ce gène lors d'une infection avec le même parasite.



Toutefois, ces observations sont à considérer avec précaution, notamment parce qu'il est possible que les variations d'expression observées entre les populations soient liées à la diversité génétique présente entre ces populations (Oleksiak *et al.*, 2002; Whitehead and Crawford, 2006a). Taris *et al.* (2008) ont identifié une méthode pour vérifier un éventuel biais dans la variation de l'expression des gènes, qui serait du à la diversité génétique entre les populations étudiées. Un contrôle systématique des courbes de dissociation et d'amplification des gènes permettrait ainsi de détecter les artefacts ou les biais lors d'une analyse d'expression de gènes par PCR en temps réel (Taris *et al.*, 2008). Dans la présente étude, ces courbes ont été systématiquement contrôlées, et aucun gène ne présentait un profil susceptible de produire un résultat biaisé. D'autre part, dans le cas présent, les gènes étudiés sont des gènes liés aux réponses immunitaires, ou au métabolisme oxydatif. Par conséquent, on s'attend à ce que ces gènes subissent des forces de sélection stabilisante importantes, réduisant alors le polymorphisme non-synonyme de séquence. Cette hypothèse a notamment été testée dans le cadre d'une étude de la diversité génétique des populations naturelles d'*Ostrea edulis*. Les résultats de cette étude de diversité sont présentés en **Partie V**.

#### IV.4.5 Conclusion et perspectives

L'objectif de la présente étude était d'estimer la diversité de réponses à un même épisode infectieux, chez trois populations naturelles d'*Ostrea edulis*, génétiquement et géographiquement distinctes. À cette fin, notre choix s'est porté sur une population au contact de *Bonamia ostreae* depuis l'émergence de la parasitose (Quiberon; Arzul *et al.*, 2011), mais également sur une population au contact de *B. ostreae* et de *B. exitiosa* (Corse; Arzul and Bouchouca, 2008; Guichard *et al.*, 2010), ainsi que sur une population naïve pour la bonamiose (Danemark; Décision européenne 2009/177/EC). Une partie des huîtres provenant de ces trois populations a été injectée avec une suspension parasitaire (condition Bo), l'autre partie étant injectée avec de l'eau de mer filtrée (condition EMF). Il s'agissait d'étudier la diversité des réponses à l'injection, estimées par l'étude de réponses cellulaires (deux activités hémocytaires) et de réponses moléculaires (expression de cinq gènes).

Bien que cette étude ne se soit pas déroulée comme prévu en raison d'un épisode brutal de mortalités dès le troisième jour d'expérience, les résultats obtenus permettent d'observer des différences : 1- dans la cinétique de l'épisode de mortalités ; 2- dans les réponses fonctionnelles observées chez les individus survivants, au septième jour d'expérience.

En outre, de façon très intéressante, après analyse des résultats, le différentiel de réponses entre les trois populations génétiquement et géographiquement distinctes apparaît représentatif des profils de réponses attendus suite à une infection avec le parasite *Bonamia ostreae*. De plus, des tendances similaires aux résultats obtenus dans de précédentes études sur les interactions entre *O. edulis* et ce parasite ont été mises en évidence. Ainsi, il est fort possible que l'épisode infectieux ait effectivement été déclenché par l'injection de *B. ostreae*, et ceci malgré le fait que ce parasite n'ait pas été détecté au sein des individus, et malgré le fait que l'on ne s'attendait pas à un épisode de mortalités de cette ampleur.

Tout d'abord, la cinétique de l'épisode de mortalités a permis d'identifier un profil de réactions

différent entre les populations. Les huîtres provenant de Quiberon (population structurellement en contact avec *B. ostreae*) présentaient un profil de mortalités similaire à celui d'une population sélectionnée pour la résistance à la parasitose. C'est-à-dire qu'une partie des huîtres sont mortes au cours des premiers jours de l'épisode infectieux mais que, ensuite, les mortalités ont complètement cessé. Il est ainsi possible que les huîtres sensibles soient mortes rapidement (60 % des effectifs) et que les huîtres résistantes aient survécu (40 %). Ce résultat suggère un effet de la sélection naturelle pour une résistance à la bonamiose des huîtres de la population de Quiberon.

Chez les deux autres populations, toutes les huîtres sont mortes au cours de la première semaine d'expérience, avec néanmoins une différence dans le profil des courbes de mortalités. En effet, les huîtres de Corse (contact supposé récent avec *B. ostreae* et peut-être plus ancien avec *B. exitiosa*) présentaient moins de mortalités au début de l'épisode infectieux, suggérant que ces huîtres avaient mis en place une réponse au parasite. Cependant, au bout de quelques jours, les mortalités se sont de nouveau accélérées, ce qui peut refléter une inefficacité des mécanismes de réponse potentiellement mis en place. Les huîtres du Danemark ont, quant à elles, été décimées de façon rapide et totale, reflétant une sensibilité au parasite.

Malgré cet épisode de mortalités, et le fait qu'aucun pathogène n'ait été détecté au sein des huîtres mortes analysées, quelques huîtres de deux populations, survivantes au septième jour d'expérience, ont pu être sacrifiées afin d'étudier les réponses cellulaires et moléculaires, comme cela était prévu.

La méthode d'infection par injection à l'avantage d'appliquer la même pression parasitaire à chacun des individus étudiés, et ceci au même moment. Elle permet ainsi d'améliorer les comparaisons entre les individus, ou entre les populations. Cependant, il s'agit d'une méthode intrusive qui ne reproduit pas les conditions d'infection rencontrées par les huîtres dans le milieu naturel. Elle est également stressante pour les individus car elle produit des lésions tissulaires, et déclenche ainsi des réponses immunitaires qui peuvent fausser les réponses étudiées. Pour contourner ce phénomène, les comparaisons entre populations ont été effectuées après correction des réponses à la condition Bo, par la condition EMF. C'est-à-dire que l'étude de la diversité des réponses a porté sur le différentiel de réponses entre les valeurs moyennes des deux conditions.

La comparaison du différentiel de réponses hématocytaires entre les conditions Bo et EMF a mis en évidence une potentielle adaptation des huîtres de Quiberon et de Corse en réponse à l'agent pathogène responsable de l'épisode de mortalités. En effet, après injection de *Bonamia ostreae*, les hématocytes de ces huîtres produisaient moins d'espèces oxygénées réactives et diminuaient également leur activité de phagocytose. Ces réponses pourraient s'expliquer soit par l'élimination du parasite *Bonamia ostreae*, soit par la mise en place d'un mécanisme cellulaire permettant d'éviter la dispersion des parasites. Néanmoins, les profils d'expression des gènes divergent entre les huîtres des deux populations. Ainsi, malgré des profils de réponses similaires entre ces populations pour les activités hématocytaires étudiées, il est possible que les mortalités observées chez les huîtres corses reflètent une réponse moléculaire non adaptée à une infection à *B. ostreae*.

Les différentes réponses observées entre les huîtres des trois populations suggèrent que la population de Quiberon a potentiellement développé une résistance naturelle à la bonamiose, alors qu'il est possible que les huîtres danoises et corses soient mortes rapidement d'une infection à *B. ostreae*, avant même que le développement du parasite soit suffisamment important pour être détectable.

Dans ce contexte, l'étude combinée de la diversité des réponses fonctionnelles à un même événement infectieux, et de la diversité génétique des populations apparaît particulièrement intéressante pour estimer la différenciation génétique des populations naturelles de *O. edulis*, ainsi que les effets de cette différenciation. En effet, il serait alors possible d'estimer les effets de la dérive génétique ou de la sélection naturelle sur la variation des profils d'expression des gènes (Whitehead and Crawford, 2006b; Emerson and Li, 2010). Cette information permettrait alors de mieux comprendre et estimer les capacités de réponse de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose. Cet aspect est particulièrement important dans le contexte de la relance de la culture de l'huître plate par l'identification de populations potentiellement moins sensibles aux épizooties (ex. : Culloty and Mulcahy, 2001; da Silva *et al.*, 2005). Pour cela, la diversité génétique ainsi que la structure des populations naturelles de *Ostrea edulis* à l'échelle de son aire de répartition ont été étudiées. Des signatures de la sélection naturelle ont également été recherchées dans les populations structurées. Les résultats de ces études sont présentés dans la **Partie V** du présent manuscrit.

D'autre part, la présente étude se base sur l'analyse différentielle de seulement 7 paramètres physiologiques. Afin de préciser le profil réactionnel de populations potentiellement intéressantes pour les programmes de sélection, il pourrait être intéressant d'utiliser des puces d'expression (microarray). Cette technique permettrait d'étudier simultanément davantage de gènes et davantage de populations, et ainsi d'identifier des profils similaires d'expression de groupes de gènes corrélés, à travers différents bagages génétiques (Cowley *et al.*, 2009). Cependant, il est important de garder à l'esprit qu'une différence d'expression génique est difficile à interpréter, notamment en raison de la multitude de produits protéiques pouvant être associés à chaque ANRm (Schadt and Lum, 2006), mais également en raison des possibles interactions protéine-protéine, de la difficulté à définir les catégories fonctionnelles, ainsi que du fait que les fonctions cellulaires sont notamment contrôlées par la phosphorylation, d'autres voies de signalisation, etc. (Schadt and Lum, 2006). Ainsi, il s'avère primordial de mener de front les études de cartographie génétique permettant d'identifier les régions génomiques impliquées dans les mécanismes de régulation des gènes [cf. **Partie IV.3**] différemment exprimés entre des populations de susceptibilités différentes à la parasitose.

## Cinquième partie

# Diversité et structure génétique

## V.1 Introduction

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente [**Partie IV.4**], chez l’huître plate européenne, les profils d’expression de certains gènes varient en réponse à une injection de parasites en fonction de l’origine géographique des huîtres analysées. Néanmoins, l’origine de la variation des niveaux d’expression des gènes peut avoir différentes causes, notamment une régulation lors de la transcription ou de la traduction. Cette variation peut également être influencée par des facteurs d’ordres épigénétiques (méthylation / acétylation, [Gilad \*et al.\*, 2008](#)), mais également par la diversité génétique entre les populations ([Oleksiak \*et al.\*, 2002](#); [Whitehead and Crawford, 2006a](#)). Dans le cadre de cette étude [**Partie IV.4**], la variation de l’expression génique pourrait être reliée à la présence ou l’absence d’un primo-contact avec le parasite étudié, et/ou à la différenciation génétique entre les populations naturelles étudiées. Afin de mieux appréhender la diversité des réponses des populations de l’huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose, il s’avère important de mieux comprendre la diversité génétique et la structure des populations de l’hôte.

Les mollusques bivalves marins se distinguent des autres espèces animales par trois particularités démographiques : une très forte fécondité en phase gamétique, un fort potentiel de dispersion passive à longue distance en phase larvaire planctonique, et une très grande taille des populations en phase adulte benthique. Ces caractéristiques, proches de certaines plantes terrestres (modèle « Orme-huître », [Williams, 1975](#)), prédisent naturellement une très forte diversité génétique chez ces espèces. Cette diversité représenterait alors un large potentiel d’action pour la sélection naturelle, en réponse à une importante mortalité dès les premières phases du développement larvaire [voir **Partie II.1.3.3** pour un exemple de mortalités larvaires]. Un autre attendu est une faible différenciation et une faible structuration des populations de ces espèces.

Cependant, plusieurs études ont mis en évidence une réalité toute autre. En effet, les bivalves marins se caractérisent également par une diversité génétique forte (ex. : [Sauvage \*et al.\*, 2007](#)) mais beaucoup plus faible que celle attendue avec une grande taille de populations. Cette réduction de la diversité est également associée à une très grande variance individuelle de succès à la reproduction (ex. : [Hedgecock \*et al.\*, 2007](#); [Lallias \*et al.\*, 2010](#); [Hedgecock and Pudovkin, 2011](#)), ainsi qu’une importante fragmentation de leurs habitats. Ces particularités constituent ce que l’on appelle classiquement la « loterie du recrutement » (*Sweepstakes Reproductive Success*, [Hedgecock, 1994](#)). Ce paradoxe se traduit par une accumulation de faibles chances de succès à la reproduction de la part d’un individu, en raison de la nécessité de conditions océanographiques propices à la maturation des gamètes, à la fécondation (interne chez la femelle pour *O. edulis*), au développement larvaire (partiellement intra-palléal chez l’huître plate), à la fixation benthique

et au recrutement des adultes dans une population de reproducteurs (Hedgecock and Pudovkin, 2011). La première conséquence de ce paradoxe serait ainsi une taille efficace des populations plus faible qu'attendue, et donc un rôle plus important qu'attendu de la dérive génétique, sur les régions neutres du génome.

Afin de tester cette théorie, il s'avère important de mettre à l'épreuve chacune des hypothèses formulées, et ceci chez plusieurs espèces de bivalves marins. Chez les huîtres, la diversité génétique apparaît particulièrement forte (Sauvage *et al.*, 2007) mais elle a été caractérisée sur des populations d'écloserie et non sur des populations naturelles. D'autre part, les outils moléculaires développés en **Partie III.2** du présent manuscrit s'avèrent particulièrement intéressants pour une analyse robuste de la différenciation et de la structure génétique des populations naturelles de l'huître plate européenne, et pour détecter d'éventuelles signatures de la sélection ou d'adaptation locale.

Dans ce contexte, la présente partie de mes travaux consistait d'une part à estimer la diversité nucléotidique de l'huître plate européenne [**Partie V.2**], et d'autre part à caractériser la distribution spatiale de la diversité de *O. edulis* à travers son aire de distribution [**Partie V.3**].

## V.2 Diversité génétique chez *Ostrea edulis*

Cette partie est présentée sous la forme d'un article, qui a été soumis à la revue *Genetics*. Cet article est présenté ci-dessous, après la version en français du résumé.

### **Un important fardeau génétique contribue à une forte diversité protéique chez un bivalve marin avec une reproduction par « loterie »**

Estelle Harrang, Sylvie Lapègue, Benjamin Morga, Nicolas Bierne

Les bivalves marins présentent une des plus fortes diversités protéiques jamais observées chez les Eucaryotes, positionnant ce groupe animal au cœur de la controverse neutraliste-sélectionniste sur le maintien de la variabilité génétique. Alors qu'il est désormais admis qu'une grande diversité protéique est probablement la conséquence d'une grande taille de population, il s'avère nécessaire d'évaluer de façon rigoureuse la diversité nucléotidique silencieuse des populations naturelles de bivalves marins, ce qui n'a encore jamais été fait. Le polymorphisme de séquence ADN a été étudié sur un ensemble de 37 loci nucléaires sur des échantillons sauvages de l'huître plate européenne *Ostrea edulis*. La diversité silencieuse s'est révélée être seulement modérée (0,7 %), et sans écart à l'équilibre démographique sous le modèle de Wright-Fisher. Ceci suggère que la taille effective de la population n'est peut-être pas aussi grande que l'on aurait pu s'y attendre. En accord avec l'hétérozygotie allozymique, la diversité non-synonyme s'est révélée être assez forte (0,3 %), de sorte que le ratio de la diversité non-synonyme par la diversité silencieuse atteint une valeur rarement observée chez les autres organismes (0,56). Nous avons estimé que 1/4 des mutations affectant les acides aminés sont neutres chez *O. edulis*, et que 1/3 sont suffisamment faiblement sélectionnées pour ségréger à faible fréquence. Enfin, nous avons déduit qu'une huître est susceptible de présenter plus de 3900 allèles non-neutres (soit  $3,4 \text{ cM}^{-1}$ ). Nous concluons qu'une forte ségrégation de polymorphismes non-neutres affectant les acides aminés contribue à expliquer la forte diversité protéique chez *O. edulis*. La répartition inégale de la descendance des bivalves marins pourrait produire un plus grand découplage entre  $N_e$  et  $N$  que chez les autres organismes ayant une plus faible fécondité. Nous suggérons que ceci pourrait expliquer pourquoi une forte ségrégation de mutations délétères pourrait être maintenue pour une taille effective donnée en mutations silencieuses.

*Article soumis à Genetics (Society of America)*

**A high genetic load contributes to high protein diversity in a marine bivalve with sweepstakes reproduction**

Estelle Harrang\*, Sylvie Lapègue\*, Benjamin Morga\*, Nicolas Bierne<sup>§, \*\*</sup>

\*Ifremer, Laboratoire de génétique et pathologie, avenue de Mus de Loup 17390 La Tremblade, France

§Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

\*\*ISEM - CNRS, UMR5554, Station Biologique, 2 rue des Chantiers, 34200 Sète, France

### V.2.1 Abstract

Marine bivalves show amongst the highest allozyme diversity ever reported in Eukaryotes, putting them historically at the heart of the neutralist-selectionist controversy on the maintenance of genetic variation. While it is now acknowledged that a high diversity is most probably a simple consequence of a large population size, convincing support for this explanation would require a rigorous assessment of the silent nucleotide diversity in natural populations of marine bivalves, which has not yet been done. This study investigated DNA sequence polymorphism in a set of 37 nuclear loci in wild samples of the flat oyster *Ostrea edulis*. Silent diversity was found to be only moderate (0.7%), and there was no departure from demographic equilibrium under the Wright-Fisher model, suggesting that the effective population size might not be as large as might have been expected. In accordance with allozyme heterozygosity, non-synonymous diversity was comparatively very high (0.3%), so that the non-synonymous to silent diversity ratio reached a value rarely observed in any other organism (0.56). We estimated that 1/4 of amino acid-changing mutations behave as neutral in *O. edulis*, and as many as 1/3 are sufficiently weakly selected to segregate at low frequency in the polymorphism. Finally, we inferred that one oyster is expected to carry more than 3900 non-neutral alleles (or  $3,4 \text{ cM}^{-1}$ ). We conclude that a high load of segregating non-neutral amino-acid polymorphisms contributes to high protein diversity in *O. edulis*. The skewed offspring distribution of marine bivalves might produce a greater decoupling between  $N_e$  and  $N$  than in other organisms with lower fecundities, and we suggest this could explain why a higher segregating load could be maintained for a given silent mutation effective size.

**Key words:** Nucleotide polymorphism, marine bivalve, deleterious mutations, genetic load, *Ostrea edulis*



## V.2.2 Introduction

Marine bivalves are recognized as being among the most polymorphic of all animal species. First observed with allozyme markers (Ward *et al.* (2000); Bazin *et al.* (2006)), this high polymorphism now appears to be confirmed at the nucleotide level (Sauvage *et al.* (2007); Arias *et al.* (2009); Zhang and Guo (2010)). However, the cause of the extreme heterozygosity of marine bivalves has remained controversial, and its investigation has been hampered by several factors. First, the diversity of functional markers (e.g. allozymes or non-synonymous polymorphisms) depends on the concomitant effects of population size and selective constraints on these markers, while the diversity of non-functional markers (e.g. synonymous or non-coding polymorphisms) only depends on the population size (Kimura (1983)). Ideally, genetic diversity should only be estimated using non-functional polymorphisms (*i.e.* silent diversity). Second, although silent diversity has now been evaluated in a few bivalve species, these studies were designed to discover single nucleotide polymorphisms (SNPs) and used individuals sampled from hatcheries rather than the wild, precluding an inference of the frequency of mutations in natural populations. Furthermore, the use of SNP density as a measure of diversity does not provide an accurate statistic for rigorous comparison among species and can be misleading. Thirdly, extreme polymorphism is sometimes prone to selectionist interpretations. This was true at the allozyme time during which numerous studies questioned neutrality of these markers in marine mollusks (Koehn and Shumway (1982); Koehn (1990); Karl and Avise (1992); Mitton (1993); Mitton (1997); Riginos *et al.* (2002)). It is therefore crucial to build a clearer picture by evaluating the genomic average of diversity of various categories of substitutions from a large panel of genes in different species of bivalves. Only knowledge of this kind would allow us to confidently say that the diversity of a specific protein was extreme. Finally, and perhaps most importantly, large variation in reproductive success owing to a skewed offspring distribution can lead to effective population sizes several orders of magnitude below census numbers and the effective size of marine populations might not be as large as was first anticipated (Hedgecock (1994); Hedgecock and Pudovkin (2011)). A skewed offspring distribution can also complicate the interpretation of descriptive statistics of genetic variation as this creates deviation from the standard Wright-Fisher model and the Kingman's coalescent (Sargsyan and Wakeley (2008), Eldon and Wakeley (2009), Der *et al.* (2012)). All these caveats may have fueled the doubt cast on the simplest hypothesis: that the extreme protein diversity of marine mollusks is a direct consequence of their large population size. The present paper addresses this doubt.

We studied DNA sequence polymorphism in the flat oyster *Ostrea edulis* by direct re-sequencing of 37 loci identified from EST libraries (Morga *et al.* (2011a), Morga *et al.* (2012)). Samples were taken from different natural populations throughout the distribution area of *O. edulis* in Europe. The aim of this study was first to obtain a new estimate of silent diversity based on wild samples in an additional species of bivalve, and secondly to verify whether purifying selection could be relaxed in marine bivalves, as suggested by Sauvage (Sauvage *et al.* (2007)), by further investigating the potentially non-neutral nature of segregating non-synonymous polymorphisms.

## V.2.3 Materials and Methods

### V.2.3.1 Sampling and molecular protocols

We used 16 oysters from 4 different natural populations collected on the Atlantic and Mediterranean coasts, in Italy, Greece and France. Genomic DNA was extracted from samples of gill tissue using the Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Quality and concentration were assessed on a 1% agarose gel and by using an Eppendorf<sup>®</sup> BioPhotometer. Concentrations were equilibrated to 100 ng.μL<sup>-1</sup> per DNA sample.

Primers were designed from 114 EST sequences, using the online software Primer3 (Rozen and Skaletsky (2000)). Expected fragment lengths in the absence of introns varied between 160 bp and 660 bp depending on the EST used. The PCR protocol was the same as in Sauvage (Sauvage *et al.* (2007)). Purified PCR products were then sequenced with both the forward and the reverse primers, using the ABI Prism BigDye v3 Terminator Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) in an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems). A second PCR amplification and a second sequencing reaction allowed the removal of most of the artifactual mutations inherently produced during the experiments.

### V.2.3.2 Analysis of DNA sequence polymorphism

Sequence alignment was performed with ClustalW via the BioEdit interface (Hall (1999)). Verification by eye and multiple alignments of sequences obtained from different PCR and sequencing reactions for the same individual were used to correct for artifactual mutations. All sites with two simultaneous fluorescent signals were considered to be heterozygous sites if the intensity of the least intense peak was above 30% of the intensity of the most intense peak. The cDNA was used to identify intronic regions. A BLAST homology search was performed on GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to identify orthologous sequences which, together with ORF-Finder (Rombel *et al.* (2002)), enabled the annotation of Open Reading Frames (ORFs) and UTR regions. Annotations were further investigated and confirmed with Artemis (Rutherford *et al.* (2009)). As we used direct sequencing, sequences stopped at the first heterozygous indel, sometimes producing sequences of variable lengths (L). For this reason, some sequences were too short for the analysis and we obtained variable sample sizes. The validity of each SNP was checked individually on nucleotide sequences and sequence alignments.

SNPs were classified as synonymous and non-synonymous in coding regions, and as non-coding in intronic and UTR regions. Synonymous and non-coding SNPs were classified as silent. Genetic diversity was analyzed with DnaSP v5.10 (Librado and Rozas (2009)). Haplotypes were reconstructed for each sequence using the PHASE algorithm (Stephens *et al.* (2001)). We computed the nucleotide diversity ( $\pi$ , Nei (1987)) and Watterson's theta ( $\theta$ , Watterson (1975)) for each site category: synonymous ( $\pi_s$ ,  $\theta_s$ ), non-synonymous ( $\pi_n$ ,  $\theta_n$ ), non-coding ( $\pi_{nc}$ ,  $\theta_{nc}$ ) and silent ( $\pi_{si}$ ,  $\theta_{si}$ ). Departure from the expectations of mutation/drift equilibrium under the Wright-Fisher model

was evaluated with silent sites, using Tajima's D statistic (Tajima (1989)), which is a standardized measure of the difference between the two diversity estimators ( $\pi$  and  $\theta$ ). Genetic structure, as measured by  $F_{ST}$  statistics (Wright (1951)), was analyzed with Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.* (2005)) among all populations, and between Mediterranean and Atlantic populations. Linkage disequilibrium estimated by the average of  $r^2$  (Hill and Robertson (1968)) over all pairwise comparisons ( $ZnS$ , Kelly (1997)) was also calculated for all SNPs and parsimony-informative SNPs.

ORFs were used to compute the GC content at the third codon position (GC3) and to measure the Effective Number of Codons (ENC) with DnaSP v5.10 (Librado and Rozas (2009)).

### Estimating the fractions of non-synonymous mutations that are neutral, weakly selected or strongly deleterious

We used the method of Fay *et al.* (2001) to partition amino acid mutations into three categories: neutral, slightly selected and strongly deleterious. The format of our dataset did not allow us to estimate a more detailed distribution of fitness effects (*e.g.*, Eyre-Walker *et al.* (2006)). Although simpler, the method of Fay *et al.* (2001) does not rely on a specific population genetic model (*e.g.* the Wright-Fisher model), and in the spirit of the McDonald-Kreitman approach (1991) it capitalizes on the fact that neutral and potentially selected sites are interspersed with each other throughout a gene. Such sites are therefore expected to have the same evolutionary history and sampling (*i.e.*, a shared genealogy). A possible deviation from the standard coalescent, as could be expected in marine species with a skewed offspring distribution (Eldon and Wakeley (2009)), is not expected to bias the method, which simply assumes shared genealogies for the two categories of mutations whatever their shapes (*e.g.*, standard, multifurcating, star-like...). The neutral class,  $f_0$ , was estimated from common SNPs; the slightly selected class,  $f_1$ , accounted for the excess of low frequency amino acid SNPs; and the strongly deleterious class,  $f_2$ , was deduced from the synonymous diversity as those non-synonymous SNPs that were lacking from the sample. SNPs were classified into frequency categories: those with a minor variant frequency below 0.1, those with a frequency between 0.1 and 0.2, and those with a frequency above 0.2. In addition, following the idea of Fay *et al.* (2001) that deleterious mutations are not expected to spread on a wide geographical scale, we also classified SNPs as shared or non-shared between populations or between the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. The comparison of the  $\theta_n/\theta_{si}$  ratio among categories allowed  $f_0$ ,  $f_1$  and  $f_2$  to be estimated (Fay *et al.* (2001)).

The number of non-synonymous SNPs expected if they were all neutral was estimated from the observed number of silent SNPs and used to calculate the proportion of non-neutral non-synonymous SNPs in the sample. Estimating the number of heterozygote non-neutral amino-acid mutations an individual carries would require knowledge of the frequency of these mutations in the population. An underestimation and thus conservative estimate can nonetheless be obtained following Fay *et al.* (2001) by assuming non-neutral non-synonymous alleles are present only once

in the sample.

## V.2.4 Results

### DNA polymorphism in *O. edulis*

From the 114 loci that we attempted to amplify, 13 presented no amplification signal, which could be explained by the presence of an intron within the priming sequences or a long intron between the two primers, and 47 presented a multibanded pattern. Among the 54 loci that produced a single-banded pattern on agarose gel, 10 produced an unreadable electropherogram (overlapping peaks), 2 were composed of very large introns (>1000 bp), which precluded a forward/reverse sequencing double check, and 2 could not be aligned with their corresponding cDNA, indicating a lack of specificity of the primers or PCR conditions. Forty loci produced usable sequence sets and were long enough to be annotated and deposited in the GenBank database (Accession numbers JN680816 to JN680855). Among these, 23 were composed of 1 to 3 large introns, with an individual length from 92 to 983 bp and a total length per locus from 92 to more than 1250 bp. The primers are listed in supplementary **Table S1** and a polymorphism analysis of the 40 nuclear loci is shown in **Table S2**. Three loci were mitochondrial (JN680816, JN680817, JN680826) and were discarded from subsequent analyses due to the specific characteristics of mitochondria (uniparental inheritance, non-recombining, higher selective constraint on mitochondrial than nuclear proteins), as is usual practice in similar studies, including those with which we compare our data in the Discussion section. A total of 16,525 base pairs of the European flat oyster genome were successfully sequenced and analyzed (37 nuclear loci, **Table S2**). Twenty-six of the 37 loci contained at least one non-coding region (intron and/or UTR), and one locus was entirely non-coding. A total of 283 SNPs were identified (**Table S3**) of which 28% were non-synonymous, 12% were synonymous and 60% were non-coding. Only one locus was monomorphic. An average density of 1 SNP every 76 bp was observed in coding regions and 1 every 47 bp in non-coding regions, which are comparable densities to those observed in the cupped oyster *Crassostrea gigas* (Sauvage *et al.* (2007)).

The average nucleotide diversity at synonymous sites was  $\pi_s = 0.006$  (range: 0 to 0.08) and the average Watterson's theta of  $\theta_s = 0.005$ . The average nucleotide diversity at non-coding sites was  $\pi_{nc} = 0.005$  (range: 0 to 0.017) with an average Watterson's theta of  $\theta_{nc} = 0.006$ . Synonymous and non-coding diversities were not significantly different from each other (nucleotide diversity  $t = 0.97$ ;  $df = 36$ ;  $p = 0.34$ ; Watterson's theta:  $t = 0.29$ ;  $df = 36$ ;  $p = 0.77$ ) so we combined the two categories of polymorphism into a single category (silent mutations). The average nucleotide diversity at silent sites was  $\pi_{si} = 0.0067$  (range: 0 to 0.08) with an average Watterson's theta of  $\theta_{si} = 0.0065$ . The similarity between the two estimators ( $\pi_{si}$  and  $\theta_{si}$ ) suggests an absence of any strong deviation from the expectation of demographic equilibrium under a Wright-Fisher model.

The average nucleotide diversity at non-synonymous sites was  $\pi_n = 0.0025$  (range: 0 to 0.014) and was lower than the Watterson's theta, which was  $\theta_n = 0.0035$ . This illustrates that non-synonymous polymorphisms tend to segregate at low frequency. The non-synonymous to silent

diversity ratios were  $\pi_n/\pi_{si} = 0.38$  and  $\theta_n/\theta_{si} = 0.56$ . In order to be conservative in our conclusions, and to display a genome-wide trend without the influence of specific loci that might cause downward  $\theta_{si}$  or upward  $\theta_n/\theta_{si}$  bias, we plotted the distributions of  $\theta_n$ ,  $\theta_{si}$  and  $\theta_n/\theta_{si}$  across loci (**Figure 68**). One locus with a very high  $\theta_n/\theta_{si}$  ratio was removed from further analysis as it could have artificially increased our estimates. One locus showed a surprisingly high silent diversity. This locus was also the only one exhibiting a significant positive Tajima's D, which would suggest it could be under balancing selection or that we might have amplified paralogous sequences. Including this locus in the analysis makes our conclusion of a low silent diversity conservative. **Figure 68** suggests that if we have a biased representation of the genetic diversity of the flat oyster genome it would be caused by global bias in the choice of the loci analyzed. To check for such a bias, we verified whether the results were affected by the functional categories of the gene surveyed and by codon usage, which can be used as a proxy for expression levels as well as selective constraints on the protein (Stoletzki *et al.* (2005); Sauvage *et al.* (2007)). Genes were clustered into 8 categories according to their putative biological function predicted by NCBI according to GO (Gene Ontology, **Figure S1**). The distribution of  $\theta_n/\theta_{si}$  across the 8 functional categories is presented in supplementary **Figure S2**. A similarly high  $\theta_n/\theta_{si}$  was estimated for every functional group, including ribosomal proteins, which are known to be highly constrained in other species. Representativeness of the genome diversity was also checked by computing GC3 and ENC on our set of 37 loci and on the full EST database (**Figure S3**). Codon bias proved to be low (high value of ENC) and GC3 moderately low. The distribution of the two measures was not significantly different between the two datasets. We also tested whether codon biases were correlated with diversity indices. Neither  $\theta_s$  nor  $\theta_{nc}$  or  $\theta_n$  were significantly correlated with ENC ( $\theta_s$ :  $r = -0.12$ ,  $P = 0.49$ ,  $\theta_{nc}$ :  $r = -0.04$ ,  $P = 0.79$ ,  $\theta_n$ :  $r = 0.13$ ,  $P = 0.45$ ).

Tajima's D was computed with silent mutations for each polymorphic locus. Negative values were obtained for 24 loci (ranged from -2.01 to -0.15) and positive values for 10 loci (ranged from 0.12 to 2.43). Among these values, none were statistically different from zero after a correction for multiple testing. The average Tajima's D for all the loci was  $D = -0.38$ .

Distribution of  $F_{ST}$  values for non-synonymous and silent SNPs between all populations, and between Mediterranean and Atlantic populations, are presented on **Figure S4**. Although a large variance is observed among loci due to the small size of our samples, this analysis shows that the genetic differentiation was low overall and did not differ between the two categories of mutations.

### Selective constraint and the load of segregating non-neutral mutations

**Figure 69A** shows the  $\theta_n/\theta_{si}$  ratio for various frequency categories of SNPs and **Figure 69B** shows the allele frequency spectrum of non-synonymous and silent mutations, as well as the expectations of the mutation/drift equilibrium under the Wright-Fisher model. This shows that: (i) the frequency spectrum of silent SNPs did not depart from the neutral expectation at mutation/drift equilibrium under the Wright-Fisher model; (ii) there is an excess of non-synonymous mutations

segregating at low frequency, suggesting that a large fraction of the amino acid changing SNPs are slightly selected; (iii) the  $\theta_n/\theta_{si}$  ratio decreases when rare variants or when population-specific SNPs are removed, and it converges at a value of 23%, which can be used as an estimate of  $f_0$  (Fay *et al.* (2001), the fraction of amino acid-changing mutations that behave as neutral (or at least as silent mutations do). We then estimated that 44% of amino acid mutations are strongly deleterious and not found in the sample, and 33% are slightly selected and segregate at low frequency.

We observed 78 non-synonymous SNPs in the sample, while 117 would have been expected from the number of silent SNPs if non-synonymous mutations were all neutral. From the calculation above, a fraction  $f_0 = 0.23$  of non-synonymous mutations are estimated to be neutral, which allowed us to infer that 27 of the 78 observed non-synonymous SNPs were expected to be neutral and the remaining 51 were expected to be non-neutral in our sample of 20 oysters. By assuming non-neutral non-synonymous alleles are present only once in the sample (Fay *et al.* (2001)), we could conservatively estimate (*i.e.*, underestimate) that the number of non-neutral non-synonymous heterozygote mutations carried by an individual in the 37 loci surveyed was  $D = 2.55$ . Assuming there are  $10^7$  non-synonymous sites in the oyster genome, we inferred that one diploid genome can be expected to carry more than  $\approx 3900$  non-neutral mutations (or 1950 non-neutral mutations per haploid genome). Assuming a genetic map of 575 cM (Lallias *et al.* (2007)) we therefore deduced the density of non-neutral mutations in the oyster genome to be  $3,4 \text{ cM}^{-1}$ .

## V.2.5 Discussion

The explanation for the extreme protein heterozygosity of marine bivalves has been hotly debated in the past, at the heart of the neutralist-selectionist controversy, but the question has never been answered definitively. With the switch to molecular techniques to monitor genetic diversity, the time-lag to collect within-species genomic data in non-model organisms has led interest on the issue dissipate. The simplest explanation –that a high diversity is the result of a large population size– has persisted as the valid interpretation. This was indeed the most logical explanation for the extreme diversity observed in *Ciona* sea squirts (Small *et al.* (2007); Tsagkogeorga *et al.* (2012)), another genus of ocean-dwelling broadcast spawners. As a high density of SNPs has been observed in the first marine bivalves studied (Sauvage *et al.* (2007); Li *et al.* (2009); Zhang and Guo (2010); Kim *et al.* (2011)), the same explanation was proposed (Sauvage *et al.* (2007)), but perhaps too hastily.

In the present study, the density of SNPs was comparable to those observed in other bivalves (1 SNP every 50 bp). However, we were able to obtain estimates of nucleotide diversity to use in a rigorous comparison with published results on other species. The silent nucleotide diversity estimated in *Ostrea edulis* ( $\pi_s = 0.007$ ) was not extreme, and appears rather moderate when compared to the champions of DNA polymorphism such as some *Caenorhabditis* nematodes (*C. remanei*:  $\pi_s = 0.045$ , Cutter *et al.* (2006), *Caenorhabditis sp. 5*:  $\pi_s = 0.068$ , Wang *et al.* (2010),

or *Ciona* sea squirts (*C. savignyi*:  $\pi_s = 0.08$ , Small *et al.* (2007), *C. intestinalis* sp. B:  $\pi_s = 0.057$ , Tsagkogeorga *et al.* (2012)). The simplest explanation is that the effective population size of *O. edulis* is not as large as might have been expected, which could be due to an intrinsically low effective size that remained roughly constant for a long period, or the consequence of a departure from demographic equilibrium (*i.e.*, a population bottleneck). At first sight, the absence of departure from mutation/drift equilibrium under the Wright-Fisher model (**Figure 69B**) would suggest the former hypothesis to be more supported and that the moderately low diversity of *O. edulis* cannot be simply attributed to a demographic effect. However, one might suspect that the assumptions of the Wright-Fisher model do not apply to highly fecund marine organisms (Eldon and Wakeley (2006), Eldon and Wakeley (2009); Sargsyan and Wakeley (2008)). Non-Wright-Fisher models that consider multifurcating genealogical processes with or without simultaneous multiple mergers (Eldon and Wakeley (2006), Eldon and Wakeley (2009); Sargsyan and Wakeley (2008)) might be more relevant to the *Ostrea* system, for which the hypothesis of sweepstakes reproductive success has already received support (Hedgecock *et al.* (2007)). Under sweepstakes reproductive processes, Tajima's D is expected to be negative at steady state (Sargsyan and Wakeley (2008)). The fact that we observed it to be close to zero might therefore suggest that the population indeed departs from equilibrium. Another possibility could be that genetic differentiation among the geographically distant sampling locations we used could have contributed to affect the allele frequency spectra (Städler *et al.* (2009); Cutter *et al.* (2012)). However, *O. edulis* is known to be only slightly sub-structured, with an isolation-by-distance pattern (Launey *et al.* (2001)). Not only we did not find evidence for population subdivision in our data but, under the hypothesis that there was indeed subdivision, the average silent diversity would have been inflated, while we found it to be low. Finally, selection on codon usage and functional non-coding DNA could have contributed to reducing silent diversity. We observed a similar level of diversity with synonymous and non-coding mutations, although synonymous diversity is usually lower than non-coding diversity in species in which synonymous selection is active (Zeng and Charlesworth (2010)). Furthermore we did not detect any correlation between diversity indices and codon bias. These results suggest that selection for codon usage is not very effective in *O. edulis* and corroborates the hypothesis of a low  $N_e$  on the long term. To summarize, *O. edulis* is not extremely polymorphic at silent sites and this is probably a consequence of its effective population size being smaller than expected, but alternative hypotheses cannot be definitively ruled out. However, most of the alternative hypotheses are expected to affect silent and non-synonymous mutations equally.

Although silent diversity was not extreme in *O. edulis*, a high level of non-synonymous diversity was nonetheless observed ( $\pi_n = 0.0025$ ). High amino acid diversity is not restricted to a few extremely polymorphic proteins, but appeared to be more a general feature of the whole collection of genes analyzed (**Figure 68B**). It is worth emphasizing that none of the examples of protein diversity previously reported to be extremely high (Moy *et al.* (2008); Wharam *et al.* (2008); Costa *et al.* (2009); Parisi *et al.* (2009)) would appear as outliers if compared to the distribution we obtained in **Figure 68B**. Using the meta-analysis of Gossmann *et al.* (Gossmann *et al.* (2010)) in plants and some published results on nuclear DNA in animals (Fay *et al.* (2001);

Bierne and Eyre-Walker (2004); Cutter (2008); Axelsson and Ellegren (2009); Halligan *et al.* (2010); Carneiro *et al.* (2012); Gagnaire *et al.* (2012); Tsagkogeorga *et al.* (2012)), we computed  $\theta_s$  and  $\theta_n$  for a variety of species, shown in **Figure 70A**.  $\theta_n$  seems higher than what could have been expected from silent diversity in *O. edulis* (**Figure 70A**). On the other hand, this result supports high protein heterozygosity in marine bivalves. From the literature, we obtained the average allozyme heterozygosity ( $H$ ) of all the possible species of **Figure 70A** (Schmidtke and Engel (1980); O'Brien *et al.* (1983); Nevo *et al.* (1984); Singh and Rhomberg (1987); Morden *et al.* (1989); Rajora and Dancik (1992); Saavedra *et al.* (1995); Weller *et al.* (1996); Cronn *et al.* (1997); Awasthi *et al.* (1998); Ansell *et al.* (2010); Gao and Hong (2000)) and plotted  $\theta_n$  against  $H$  in **Figure 70B**. This time the flat oyster estimates fall right where they should be, in the group of species with the highest  $\theta_n$  and  $H$  values. There therefore seems to be a discrepancy between silent and amino-acid diversities in the flat oyster, as already noted by Sauvage *et al.* (2007) in the cupped oyster *Crassostrea gigas*. As a consequence, the synonymous to non-synonymous diversity ratio ( $\theta_n/\theta_s$ ) observed in *O. edulis* was very high ( $\theta_n/\theta_s = 0.56$ ), higher than any value we have seen in the literature to date. The explanation could be that the selective constraint is low (many amino acid mutations are neutral) and/or that there is a high segregating load in this species (many slightly selected mutations segregate in the populations). Partitioning non-synonymous and silent SNPs according to their frequency, we estimated that 23% of amino acid changing mutations behave as neutral in *O. edulis*, which is similar to the estimates obtained in humans and the common fruit fly (20% and 24% respectively, Fay *et al.* (2001); Shapiro *et al.* (2007)). However, as much as 33% of non-synonymous mutations are sufficiently weakly selected to segregate at low frequency in the polymorphism, which is much higher than usually reported. For instance, only 20% and 17% of amino acid changing mutations have been estimated to be mildly deleterious mutations in humans and flies, respectively. The high protein diversity of *O. edulis* is therefore partly due to a high load of segregating, weakly selected mutations. These mutations are often assumed to be slightly deleterious (Fay *et al.* (2001); Eyre-Walker *et al.* (2006)), but any type of selection capable of generating an excess of low frequency amino acid variants can be invoked, such as balancing, weakly positive, or local selection, which may be more widespread than generally thought (Mitton (1997)). Genetic incompatibilities (*i.e.* negative epistatic interactions) are also often forgotten in population genomics (Fay (2011); Bierne *et al.* (2011)), even though they can accumulate in cryptic tension zones and contribute to the species-wide diversity.

Our results suggest that *O. edulis* might have higher protein diversity than expected from its effective size based on silent mutations. This surprising result revitalizes the hypothesis that the biological and ecological characteristics of marine invertebrates make their population genetics somewhat different from most other animal species, while making them more similar to these of highly fecund plants (see Williams' "elm-oyster" model, Williams (1975); Launey and Hedgecock (2001)). Many marine invertebrates share the characteristics of some plants, like trees: they are abundant, relatively long-lived and, maybe most importantly, highly fecund. Interestingly, **Figure 70A** suggests that the slope of the correlation between  $\theta_s$  and  $\theta_n$  tends to be slightly higher in plants and *O. edulis* than in animals. In oysters, adults produce millions of small eggs



that develop into planktonic larvae that suffer high mortalities (Type III survivorship). Marine invertebrates undergo a large variance in reproductive success and generally have only fractions of the genetic diversity expected from their census size (see Hedgecock's hypothesis of sweepstakes reproductive success, [Hedgecock \(1994\)](#); [Hedgecock and Pudovkin \(2011\)](#)). In the same way that a large variance in reproductive success can impact the neutral coalescence process ([Eldon and Wakeley \(2006\)](#), [Eldon and Wakeley \(2009\)](#); [Sargsyan and Wakeley \(2008\)](#)), it might also impact the behavior of selected mutations ([Der et al. \(2012\)](#)). This does not mean that our estimate of the segregating load is flawed, as it was free from specific population genetics, but that the strong decoupling between  $N_e$  and  $N$  in non-Wright-Fisher populations with skewed offspring distribution could affect non-neutral mutations in an unpredicted manner. Theory predicts that the load of segregating deleterious mutations can deviate from the expectation based on a single Wright-Fisher population and become less dependent on the population size in subdivided populations ([Glémin et al. \(2003\)](#)). The probability of fixation of a favorable mutation has recently been shown to be considerably increased when offspring distribution is skewed ([Der et al. \(2012\)](#)) and one can speculate that deleterious mutations should remain polymorphic for longer periods than in Wright-Fisher populations. Investigating the effect of skewed offspring distribution on the evolution and diversity of deleterious mutations might be an interesting line for future research. In any case, one is left with the fact that high fecundity is a prerequisite for tolerating a high load of segregating selected mutations ([Williams \(1975\)](#)). We should also emphasize here that the fecundity of *Ciona* sea squirts is two orders of magnitude lower than the fecundity of the flat oyster ([Petersen and Svane \(1995\)](#)), which might explain the low  $\theta_n/\theta_s$  ratio observed in these species. Quantifying the proportion of neutral and slightly selected amino acid mutations in other extremely fecund organisms will help to test the potential impact of fecundity and skewed offspring distribution on protein polymorphism and its relation with silent diversity.

Finally, it is interesting to compare our estimate of the genetic load from molecular data with estimates obtained from segregation distortions in inbred progenies. The later approach has revealed a large number of strongly deleterious recessive mutations ( $\approx 15$  per genome on average) in the flat oyster *O. edulis* ([Bierne et al. \(1998\)](#)) and cupped oyster *C. gigas* ([Launey and Hedgecock \(2001\)](#); [Plough and Hedgecock \(2011\)](#)). In these experiments, a molecular marker typically maps around 40 cM of the genome. According to our estimate,  $\approx 130$  non-neutral mutations are expected on this map length, although we have no idea of their true effect on viability. It is possible that only one mutation has a strong effect on fitness while the other 129 only have a negligible effect at the scale of the one generation used in these lab experiments. However, it is also possible that, assuming a single viability QTL at a given chromosomal position in mapping experiments is an unrealistic assumption that should deserve further examination in the future. The broad genomic distribution of distorted ratios ([Lallias et al. \(2007\)](#); [Plough and Hedgecock \(2011\)](#)) might suggest a higher density of deleterious alleles than estimated, each with a lesser effect on fitness. One interpretation often neglected in QTL mapping is that of an abundance of mutations with small effects rather than a single mutation with a large effect, though this is highly plausible ([Rockman \(2011\)](#)). Indeed, simulation studies of the infinitesimal model have

shown that chance spatial clustering of infinitesimals caused by nonuniform recombination rates and gene densities can easily be confounded with a small number of large effect QTLs (Noor *et al.* (2001)). Our molecular estimate of a high genomic density of non-neutral amino-acid alleles in the *O. edulis* genome can be added to a long list of observations about the genetics of bivalve mollusks that started with abundant reports of heterozygosity-fitness correlations (Zouros (1987); Szulkin *et al.* (2010)) and segregation distortion in pair crosses (Foltz (1986); Launey and Hedgecock (2001)), which suggest bivalve genomes are heavily loaded by slightly selected polymorphisms. The architecture of this high genetic load will need to be further characterized and understood in order to correctly interpret the population genetics and evolution of these animals.

## V.2.6 Acknowledgements

We would like to thank Toni Gossmann for sharing his dataset, John Theodorou for supplying the sample from Greece, Luca Bargelloni and Pierre Boudry for the Italian samples, the French network Repamo (REseau PATHologie des Mollusques) for the French samples, Helen McCombie-Boudry for corrections of the manuscript and two reviewers for helpful comments. This research was funded by the European transnational Seafare project (Sustainable and Environmentally friendly Aquaculture For the Atlantic Region of Europe) and co-funded by ERDF, the Atlantic Area Transnational Programme (2007 – 2013) and Agence National de la Recherche (Hi-Flo project ANR-08-BLAN-0334-01).

## V.2.7 References

- Ansell S.W., Stenøien H.K., Grundmann M., Schneider H., Hemp A. and *et al.*, 2010. Population structure and historical biogeography of European *Arabidopsis lyrata*. *Heredity*, **105**:543–553.
- Arias A., Freire R., Boudry P., Heurtebise S., Mendez J. and Insua A., 2009. Single nucleotide polymorphism for population studies in the scallops *Aequipecten opercularis* and *Mimachlamys varia*. *Conservation Genetics*, **10**(5):1491–1495.
- Awasthi M., Bhat K.V. and Anand R.K., 1998. Genetic heterogeneity in the Indian *Mus musculus*. *Biochemical Genetics*, **36**:245–258.
- Axelsson E. and Ellegren H., 2009. Quantification of adaptive evolution of genes expressed in avian brain and the population size effect on the efficacy of selection. *Molecular Biology and Evolution*, **26**:1073–1079.
- Bazin E., Glémin S. and Galtier N., 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, **312**(5773):570–572.
- Bierne N. and Eyre-Walker A., 2004. The genomic rate of adaptive amino acid substitution in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, **21**(7):1350–1360.

- Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y. and Bonhomme F.**, 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, **148**(4):1893–1906.
- Bierne N., Welch J., Loire E., Bonhomme F. and David P.**, 2011. The coupling hypothesis: why genome scans may fail to map local adaptation genes. *Molecular Ecology*, **20**(10):2044–2072.
- Carneiro M., Albert F.W., Melo-Ferreira J., Galtier N., Gayral P. and et al.**, 2012. Evidence for widespread positive and purifying selection across the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) genome. *Molecular Biology and Evolution*, **29**:1837–1849.
- Costa M.M., Dios S., Alonso-Gutierrez J., Romero A., Novoa B. and Figueras A.**, 2009. Evidence of high individual diversity on mytacin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Developmental and Comparative Immunology*, **33**(2):162–170.
- Cronn R., Brothers M., Klier K., Bretting P.K. and Wendel J.F.**, 1997. Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **95**:532–545.
- Cutter A.D.**, 2008. Multilocus patterns of polymorphism and selection across the X chromosome of *Caenorhabditis remanei*. *Genetics*, **178**:1661–1672.
- Cutter A.D., Baird S.E. and Charlesworth D.**, 2006. High nucleotide polymorphism and rapid decay of linkage disequilibrium in wild populations of *Caenorhabditis remanei*. *Genetics*, **174**(2):901–913.
- Cutter A.D., Wang G.X., Ai H. and Peng Y.**, 2012. Influence of finite-sites mutation, population subdivision and sampling schemes on patterns of nucleotide polymorphism for species with molecular hyperdiversity. *Molecular Ecology*, **21**:1345–1359.
- Der R., Epstein C. and Plotkin J.B.**, 2012. Dynamics of neutral and selected alleles when the offspring distribution is skewed. *Genetics*, **191**:1331–1344.
- Eldon B. and Wakeley J.**, 2006. Coalescent processes when the distribution of offspring number among individuals is highly skewed. *Genetics*, **172**:2621–2633.
- Eldon B. and Wakeley J.**, 2009. Coalescence times and  $F_{ST}$  under a skewed offspring distribution among individuals in a population. *Genetics*, **181**:615–629.
- Excoffier L., Laval G. and Schneider S.**, 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, **1**:47–50.
- Eyre-Walker A., Woolfit M. and Phelps T.**, 2006. The distribution of fitness effects of new deleterious amino acid mutations in humans. *Genetics*, **173**:891–900.
- Fay J.C.**, 2011. Weighing the evidence for adaptation at the molecular level. *Trends in Genetics*, **27**(9):343–349.

- Fay J.C., Wyckoff G.J. and Wu C.I., 2001. Positive and negative selection on the human genome. *Genetics*, **158**(3):1227–1234.
- Foltz D.W., 1986. Segregation and linkage studies of allozyme loci in pair crosses of the oyster *Crassostrea virginica*. *Biochemical Genetics*, **24**:941–956.
- Gagnaire P.A., Normandeau E. and Bernatchez L., 2012. Comparative genomics reveals adaptive protein evolution and a possible cytonuclear incompatibility between European and American eels. *Molecular Biology and Evolution*, **Head of print**.
- Gao L.z. and Hong S.G.D.y., 2000. Allozyme variation and population genetic structure of common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. in China. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **101**:494–502.
- Glémin S., Ronfort J. and Bataillon T., 2003. Patterns of inbreeding depression and architecture of the load in subdivided populations. *Genetics*, **165**:2193–2212.
- Gossmann T.I., Song B.H., Windsor A.J., Mitchell-Olds T., Dixon C.J., Kapralov M.V., Filatov D.A. and Eyre-Walker A., 2010. Genome wide analyses reveal little evidence for adaptive evolution in many plant species. *Molecular Biology and Evolution*, **27**(8):1822–1832.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**:95–98.
- Halligan D.L., Oliver F., Eyre-Walker A., Harr B. and Keightley P.D., 2010. Evidence for pervasive adaptive protein evolution in wild mice. *PLoS Genetics*, **6**:e1000825.
- Hedgecock D., 1994. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In *Genetics and evolution of aquatic organisms*, edited by A.R. Beaumont, Chapman & Hall, London, UK, pp. 122–134.
- Hedgecock D. and Pudovkin A.I., 2011. Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: A review and commentary. *Bulletin of Marine Science*, **87**(4):971–1002.
- Hedgecock D., Launey S., Pudovkin A.I., Naciri Y., Lapègue S. and Bonhomme F., 2007. Small effective number of parents (N-b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **150**(6):1173–1182.
- Hill W.G. and Robertson A., 1968. The effects of inbreeding at loci with heterozygote advantage. *Genetics*, **60**(3):615–28.
- Karl S.A. and Avise J.C., 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters - implications from nuclear RFLPs. *Science*, **256**(5053):100–102.
- Kelly J.K., 1997. A test of neutrality based on interlocus associations. *Genetics*, **146**(3):1197–1206.

- Kim W.J., Jung H. and Gaffney P.M.**, 2011. Development of type I genetic markers from Expressed Sequence Tags in highly polymorphic species. *Marine Biotechnology*, **13**(2):127–132.
- Kimura M.**, 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, New York.
- Koehn R.K.**, 1990. Heterozygosity and growth in marine bivalves - comments on the paper by Zouros, Romero-Dorey, and Mallet (1988). *Evolution*, **44**:213–216.
- Koehn R.K. and Shumway S.E.**, 1982. A genetic/physiological explanation for differential growth-rate among individuals of the American Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Marine Biology Letters*, **3**:35–42.
- Lallias D., Beaumont A.R., Haley C.S., Boudry P., Heurtebise S. and Lapègue S.**, 2007. A first-generation genetic linkage map of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) based on AFLP and microsatellite markers. *Animal Genetics*, **38**(6):560–568.
- Launey S. and Hedgecock D.**, 2001. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, **159**(1):255–265.
- Launey S., Barre M., Gérard A. and Naciri-Graven Y.**, 2001. Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genetical Research*, **78**(3):259–270.
- Li R.H., Li Q. and Kong L.F.**, 2009. Characterization of expressed sequence tag-derived single-nucleotide polymorphisms in the bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Fisheries Science*, **75**:1389–1400.
- Librado P. and Rozas J.**, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**(11):1451–1452.
- Mitton J.B.**, 1993. Theory and data pertinent to the relationship between heterozygosity and fitness, pp. 17-41. In *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding—Theoretical and Empirical Perspectives*, edited by N. W. Thornhill. University of Chicago Press, Chicago.
- Mitton J.B.**, 1997. *Selection in natural populations*. Oxford University press, New York.
- Morden C.W., Doebley J.F. and Schertz K.F.**, 1989. Allozyme variation in old world races of *Sorghum bicolor* (Poaceae). *American Journal of Botany*, **76**:247–255.
- Morga B., Arzul I., Faury N., Segarra A., Chollet B. and Renault T.**, 2011a. Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an *in vitro* infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**:323–333.
- Morga B., Renault T. and Arzul I.**, 2012. New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish & Shellfish Immunology*, **32**(6):958–968.

- Moy G.W., Springer S.A., Adams S.L., Swanson W.J. and Vacquier V.D.**, 2008. Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(6):1993–1998.
- Nei M.**, 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nevo E., Beiles A. and Ben-Shlomo R.**, 1984. The evolutionary significance of genetic diversity: Ecological, demographic and life history correlates, pp. 13-213. *In Evolutionary dynamics of genetic diversity. Lecture Notes in Biomathematics, Vol. 53*, edited by G. S. Mani. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Noor M.A., Cunningham A.L. and Larkin J.C.**, 2001. Consequences of recombination rate variation on quantitative trait locus mapping studies. Simulations based on the *Drosophila melanogaster* genome. *Genetics*, **159**:581–588.
- O'Brien S.J., Wildt D.E., Goldman D., Merrill C.R. and Bush M.**, 1983. The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science*, **221**:459–462.
- Parisi M.G., Li H., Toubiana M., Parrinello N., Cammarata M. and Roch P.**, 2009. Polymorphism of mytilin B mRNA is not translated into mature peptide. *Molecular Immunology*, **46**(3):384–392.
- Petersen J.K. and Svane I.**, 1995. Larval dispersal in the ascidian *Ciona intestinalis* (l): evidence for a closed population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **186**:89–102.
- Plough L.V. and Hedgecock D.**, 2011. Quantitative trait locus analysis of stage-specific inbreeding depression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, **189**:1473–1486.
- Rajora O.P. and Dancik B.P.**, 1992. Genetic characterization and relationships of *Populus alba*, *P. tremula*, and *P. x canescens*, and their clones. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **84**:291–298.
- Riginos C., Sukhdeo K. and Cunningham C.W.**, 2002. Evidence for selection at multiple allozyme loci across a mussel hybrid zone. *Molecular Biology and Evolution*, **19**:347–351.
- Rockman M.V.**, 2011. The QTN program and the alleles that matter for evolution: all that's gold does not glitter. *Evolution*, **66**:1–17.
- Rombel I.T., Sykes K.F., Rayner S. and Johnston S.A.**, 2002. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. *Gene*, **282**(1-2):33–41.
- Rozen S. and Skaletsky H.**, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, **132**:365–86.
- Rutherford K., Parkhill J., Crook J., Horsnell T., Rice P., Rajandream M.A. and Barrell B.**, 2009. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, **16**(10):944–945.

- Saavedra C., Zapata C. and Alvarez G., 1995. Geographical patterns of variability at allozyme loci in the european oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **122**(1):95–104.
- Sargsyan O. and Wakeley J., 2008. A coalescent process with simultaneous multiple mergers for approximating the gene genealogies of many marine organisms. *Theoretical Population Biology*, **74**(1):104–114.
- Sauvage C., Bierne N., Lapègue S. and Boudry P., 2007. Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*, **406**(1-2):13–22.
- Schmidtke J. and Engel W., 1980. Gene diversity in tunicate populations. *Biochemical Genetics*, **18**:503–508.
- Shapiro J.A., Huang W., Zhang C., Hubisz M.J., Lu J., Turissini D.A., Fang S., Wang H.Y., Hudson R.R., Nielsen R., Chen Z. and Wu C.I., 2007. Adaptive genic evolution in the Drosophila genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(7):2271–2276.
- Singh R.S. and Rhomberg L.R., 1987. A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. II. Estimates of heterozygosity and patterns of geographic differentiation. *Genetics*, **117**:255–271.
- Small K.S., Brudno M., Hill M.M. and Sidow A., 2007. Extreme genomic variation in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**:5698–5703.
- Stephens M., Smith N.J. and Donnelly P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, **68**(4):978–989.
- Stoletzki N., Welch J., Hermisson J. and Eyre-Walker A., 2005. A dissection of volatility in yeast. *Molecular Biology and Evolution*, **22**:2022–2026.
- Städler T., Haubold B., Merino C., Stephan W. and Pfaffelhuber P., 2009. The impact of sampling schemes on the site frequency spectrum in nonequilibrium subdivided populations. *Genetics*, **182**:205–216.
- Szulkin M., Bierne N. and David P., 2010. Heterozygosity-fitness correlations: a time for reappraisal. *Evolution*, **64**:1202–1217.
- Tajima F., 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**(3):585–595.
- Tsagkogeorga G., Cahais V. and Galtier N., 2012. The population genomics of a fast evolver: high levels of diversity, functional constraint and molecular adaptation in the tunicate *Ciona intestinalis*. *Genome Biology and Evolution*, **Head of print**.

- Wang G.X., Ren S., Ren Y., Ai H. and Cutter A.D.**, 2010. Extremely high molecular diversity within the East Asian nematode *Caenorhabditis* sp. 5. *Molecular Ecology*, **19**:5022–5029.
- Ward R.D., English L.J., McGoldrick D.J., Maguire G.B., Nell J.A. and Thompson P.A.**, 2000. Genetic improvement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. *Aquaculture Research*, **31**(1):35–44.
- Watterson G.A.**, 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, **7**(2):256–276.
- Weller S.G., Sakai A.K. and Straub C.**, 1996. Allozyme diversity and genetic identity in *Schiedea* and *Alsinidendron* (Caryophyllaceae: *Alsinoideae*) in the Hawaiian Islands. *Evolution*, **50**:23–34.
- Wharam S.D., Wardill T.J., Goddard V., Donald K.M., Parry H., Pascoe P., Pickerill P., Smerdon G. and Hawkins A.J.S.**, 2008. A leucine aminopeptidase gene of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exhibits an unusually high level of sequence variation, predicted to affect structure, and hence activity, of the enzyme. *Journal of Shellfish Research*, **27**(5):1143–1154.
- Williams G.C.**, ed., 1975. *Sex and evolution*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Wright S.**, 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**:323–354.
- Zeng K. and Charlesworth B.**, 2010. Studying patterns of recent evolution at synonymous sites and intronic sites in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Evolution*, **70**:116–128.
- Zhang L. and Guo X.**, 2010. Development and validation of single nucleotide polymorphism markers in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin by mining ESTs and resequencing. *Aquaculture*, **302**(1-2):124–129.
- Zouros E.**, 1987. On the relation between heterozygosity and heterosis: an evaluation of the evidence from marine mollusks. *Isozymes-Current Topics in Biological and Medical Research*, **15**:255–270.



## V.2.8 Figure legends

**Figure 68** : Distribution of Watterson's theta (**A**) at non-synonymous sites ( $\theta_n$ ) and (**B**) at silent sites ( $\theta_{si}$ ), and (**C**) distribution of the non-synonymous to silent diversity ratio ( $\theta_n/\theta_{si}$ ) across loci.

**Figure 69** : (**A**) Non-synonymous to silent diversity ratio ( $\theta_n/\theta_{si}$ ) in the *O. edulis* nuclear genome. All SNPs: full dataset; without singletons: when singletons are removed from the dataset; >0.1: SNPs with a minor variant frequency above 0.1; >0.2: SNPs with a minor frequency above 0.2.; shared: SNPs shared between at least two populations from the Atlantic or the Mediterranean Sea. (**B**) Allele frequency spectrum of non-synonymous (dark), silent (grey) and expected under the neutral Wright-Fisher model (light). 0 - 0.1: SNPs with a minor variant frequency below 0.1; 0.1 - 0.2: SNPs with a minor variant frequency between 0.1 and 0.2; >0.2: SNPs with a minor variant frequency above 0.2.

**Figure 70** : (**A**) Non-synonymous diversity ( $\theta_n$ ) in plant (green points) and animal species (red and blue points) as a function of synonymous diversity ( $\theta_s$ ). (**B**) Non-synonymous diversity ( $\theta_n$ ) as a function of allozyme heterozygosity ( $H$ ). References used are listed in supplementary **Table S4**.

Figure 68

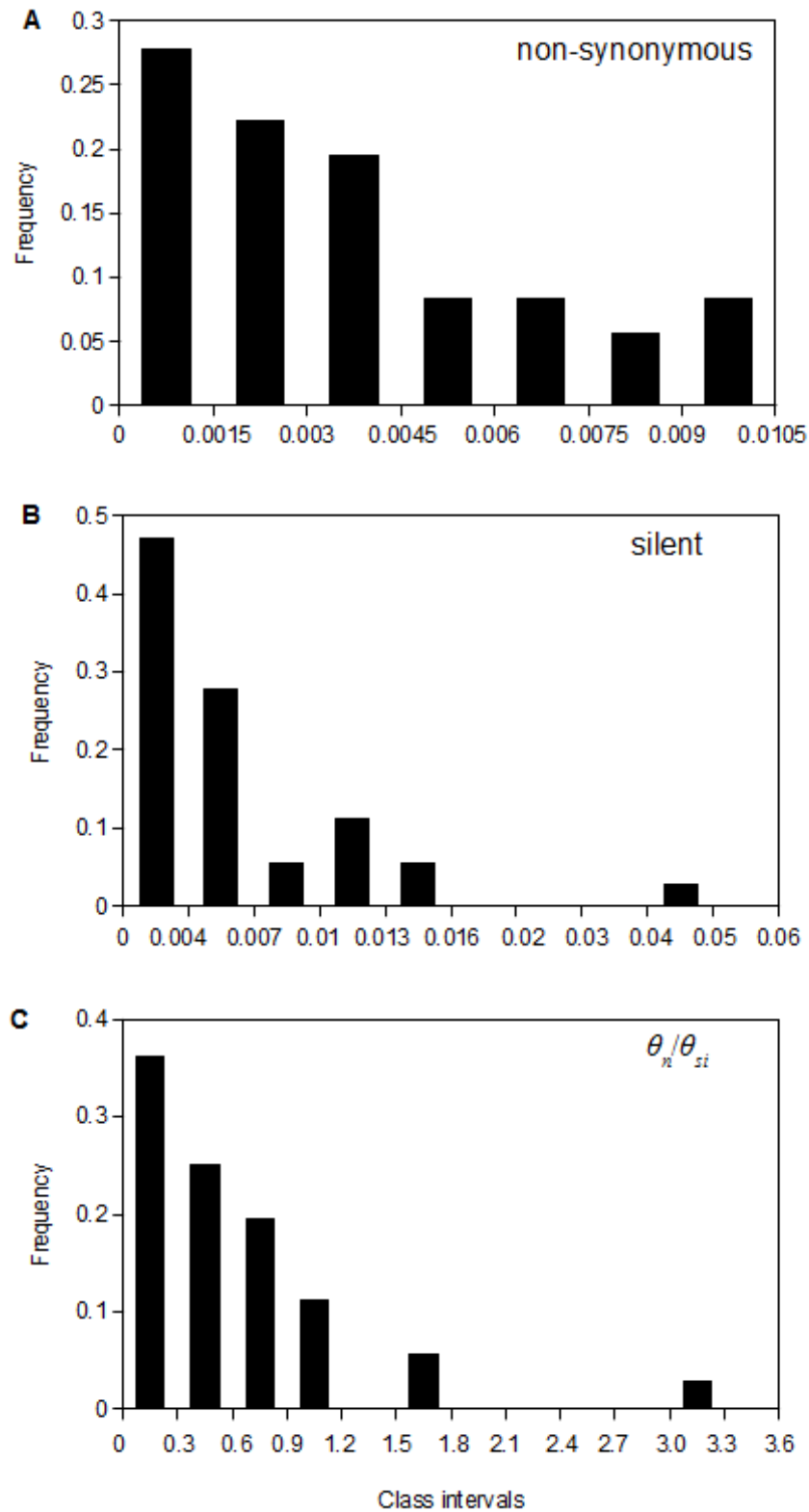


Figure 69

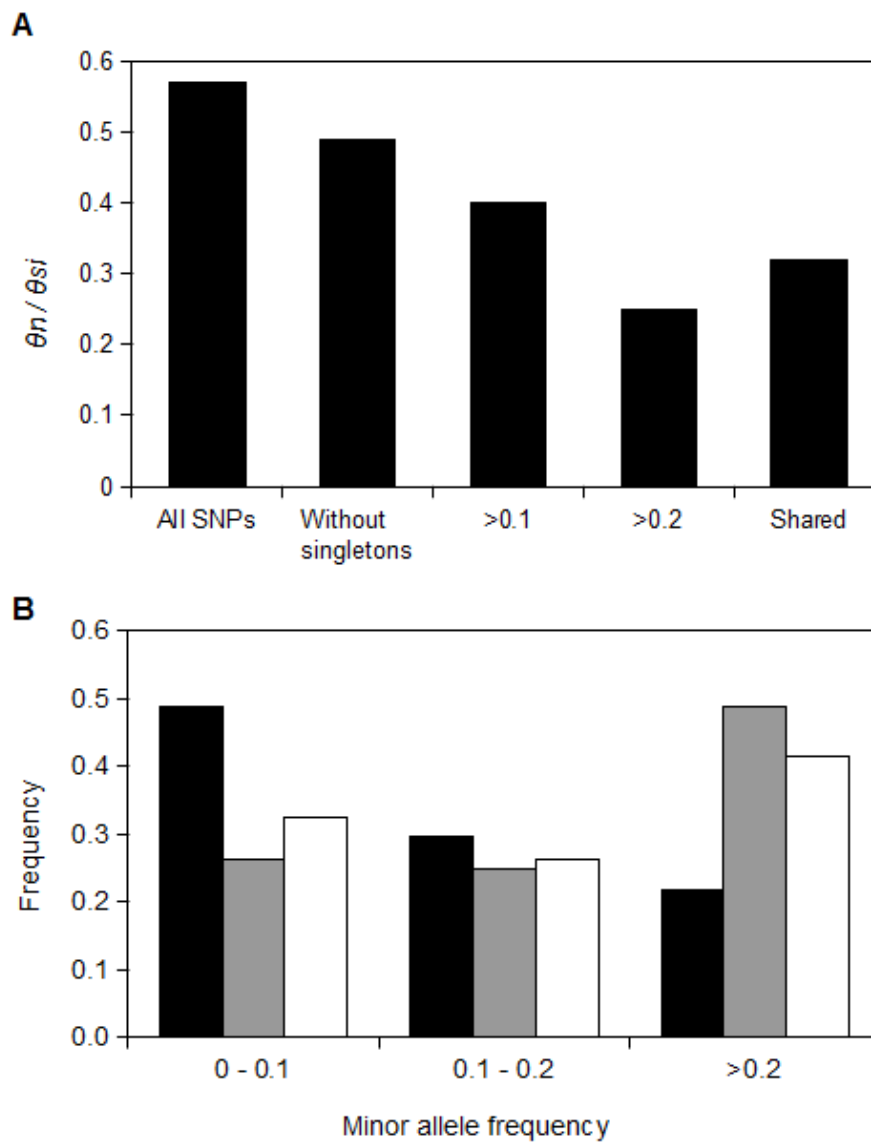
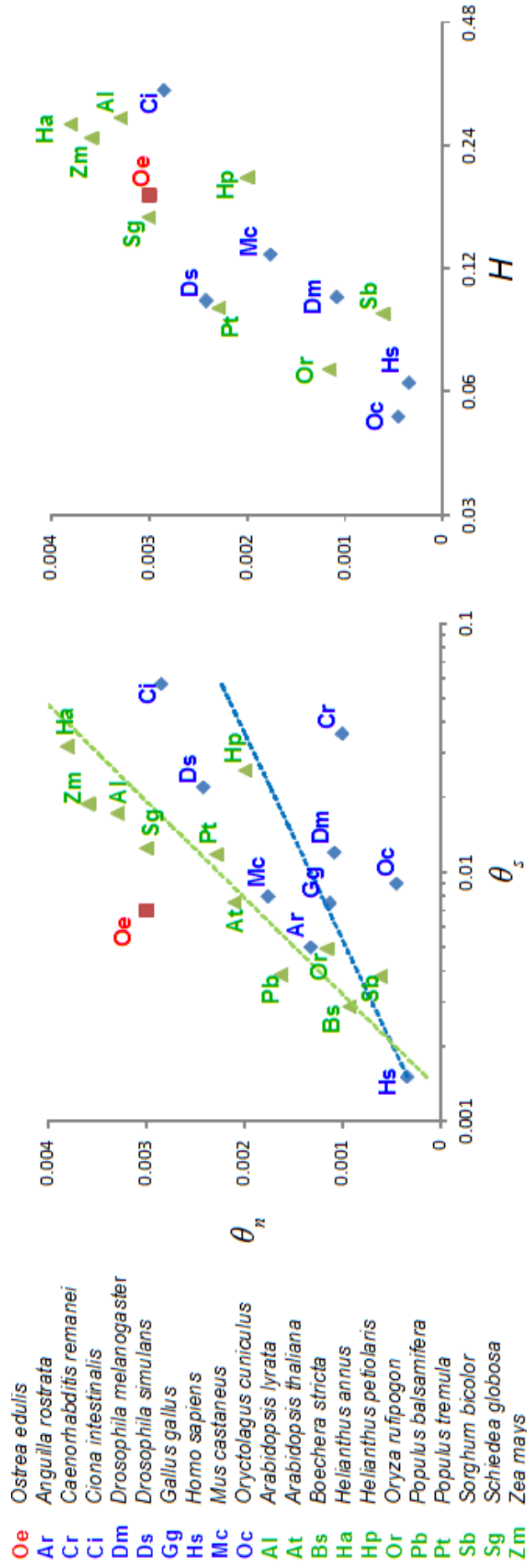


Figure 70



## V.2.9 Supplementary files

Table S1 : Primer sequences and size of the PCR products for the 40 loci of this study.

GenBank Accession No.	Forward primer	Reverse primer	Product size (bp)	Size of the alignment used (bp)
JN680816	GTA TCCCTGCCAACAAGC	TGGCTTTA GTGCATTAGCA	390	390
JN680817	GGGGCCAGCTA TAACATTCA	AACTGGAGGT CAGCAGCAAC	282	282
JN680818	GTCGTCAGGGT CAGTTTGT	GCTGGCAACTACGGGTTTA	1040	486
JN680819	GTCGATGGTGAACAAC	CCTTTCCA TCA CCA GTGTCC	628	628
JN680820	TCAGTGCAGAGG TTCACAGG	CTTTGCACGGTTCATCTCT	641	559
JN680821	ATGTACTCGCCACAGACTGT	AA CCGA CAGAGATGATGG	400	360
JN680822	ACCAGTTGTACGACCGAAG	CC TTGCA GGGT TATGGTT	335	335
JN680823	AACCTGACTGGTGGTATGC	CTGGGGA GG TCTCGTTT	677	591
JN680824	GACGTA GGC TGCATCACTCA	GCCTTCCACTGAA C ATGAAT	925	865
JN680825	TCGAA TTTCTGCCGCTTT	AGCGG GTGGATG TGTCTAC	281	281
JN680826	GCCCAGGCTTTTACAGTG	TTACCACCAGTCC CAGATT	297	297
JN680827	AGACCCAA TGTACAGACC	CTCCTCATCTCCA GCTCCT	607	607
JN680828	ACCAGAGGAGAA GAGAGC	CGTCAGTTTCTGGATGTCA	343	343
JN680829	GGCCGAGGTACTTCTTATC	TGGTGTGTCGGA TACATTGA	747	747
JN680830	CTGGCCTTACTGGAGACAAGA	ACCAAA TCGGGTACCTCT	432	390
JN680831	CTGAACCTTTGCATTTCC	AGTTCGGACATGACTCTGCC	296	296
JN680832	GGGGAAGGATGCAAGT	GGCCGCAAA TACTGGACA	256	256
JN680833	GGACCCACTGA GCGTCTT	AGCTGCAACA GTTCCA CCA	307	307
JN680834	ATGAGCGAAGAGCAAGAAG	GATG TGGTTG TAA TGGCACG	827	789
JN680835	CCTCTTCCA TGA CCCCATGT	CAGGTTGCAGAAA CCGGCTA	362	362
JN680836	TCCATGAGGACTCCA CAAAT	GAACGGGTCAAAAAGAGAGG	200	200
JN680837	CCAGTACAAGA CCGGAAAA	TTCTCTCC TCCAA CTCGAA	860	850
JN680838	ACGCAA TGA GGA TGAAGAGG	GCCTTGGTGTACCGGTGAAC T	259	259
JN680839	GGACTTGAG TCA GTCCGAGGT	CTGGGGA GCAGAAGAGAGAC	292	292
JN680840	CCGAA GCTGCAGACGATT	GTTCCTCTGGACTGTCCA	244	244
JN680841	AGTGATCAGCGGAAAGGCTA	AA GTCTCTGGACACAACGTC	657	657
JN680842	GCCTGGTGA TTTATTTGCTTTC	GCAAAATGGACAGAA GAA GGAG	333	333
JN680843	GTGTGAGCAAA TCGTGGAGA	GAGGACAA TCGGGAAAGTA	394	394
JN680844	GGCAAAACATCA TCCCTCAG	TTCCACAA TCCACCACAC	380	380
JN680845	GTAACG TCAACGCCAAC TT	TGAA CCGAAA GTAGCCATCC	489	489
JN680846	ATTGGCATTGATCTCGGAAC	TTCATGTCTGGACTGCACATT	245	245
JN680847	TTACACACCCGCCAA TTTAAC	GCTGGAAAAGACTGTGAA CCA	393	393
JN680848	CCAAC TATCTGGTGGAAACA	GC TTTTGTGGCTTTGGAC	228	228
JN680849	AACCTGTCTCACGACGGTCT	TACTTACGCGAGGTTTCCG	301	301
JN680850	CCCTATGGAAAAGACCAAGAA	TAATCTTTGGGCACCAAG	857	728
JN680851	CCCTCAGAGCCTGTTCTGT	GTGAAAGGACCA CCGTCTGG	315	315
JN680852	CATTCTATCTGGACCGGGA	CTCATCGCAA GTTCCC TTTCC	713	679
JN680853	GTCGCTCACAGAAGCTGTACC	ATCATCTTGAACCA CCCCCTGG	311	311
JN680854	CACCAACA GAA GCTCA TCC	CTGAGCA CCTATGTGA CTGTCC	592	432
JN680855	GGGACGCCAGATTGTAA	GTCCACA TCTCGCCAAA	593	593

**Table S2** : Nucleotide diversity and Tajima's D statistic of the 40 loci analyzed in this study. n: non-synonymous sites; nc: non-coding sites; s: synonymous sites; si: silent sites. NS: non-significant; \*:  $P < 0.05$ .

GenBank accession no.	Length regions (bp)					Nucleotide diversity					Waterson theta					Tajima D	
	L	L <sub>n</sub>	L <sub>s</sub>	L <sub>nc</sub>	L <sub>si</sub>	$\pi$	$\pi_n$	$\pi_s$	$\pi_{nc}$	$\pi_{si}$	$\theta$	$\theta_n$	$\theta_s$	$\theta_{nc}$	$\theta_{si}$	D	P-value
JN680818	486	0	0	486	486	0.0067			0.0067	0.0067	0.0078			0.0078	0.0078	-0.51	NS
JN680819	628	188	52	388	440	0.0037	0.0066	0	0.0028	0.0025	0.0045	0.0067	0	0.0041	0.0036	-1.09	NS
JN680820	559	143	37	379	416	0.0105	0.0023	0	0.0146	0.0133	0.0118	0.0031	0	0.0162	0.0148	-0.6	NS
JN680821	360	155	40	162	202	0.0038	0.0040	0.0042	0.0037	0.0038	0.0068	0.0079	0.0062	0.0060	0.0061	-0.99	NS
JN680822	335	257	76	0	76	0.0034	0	0.0148		0.0148	0.0028	0	0.0125		0.0125	0.58	NS
JN680823	591	95	28	466	494	0.0019	0	0	0.0024	0.0023	0.0042	0	0	0.0053	0.0050	-1.83	*
JN680824	865	124	41	700	741	0.0160	0.0058	0.0292	0.0171	0.0178	0.0130	0.0054	0.0242	0.0137	0.0143	1.09	NS
JN680825	281	215	64	0	64	0.0007	0.0006	0.0007		0.0007	0.0017	0.0011	0.0036		0.0036	-1.12	NS
JN680827	607	169	50	386	436	0.0019	0	0	0.0030	0.0027	0.0014	0	0	0.0022	0.0019	1.04	NS
JN680828	343	274	68	0	68	0	0	0		0	0	0	0		0		
JN680829	747	168	45	531	576	0.0009	0.0020	0	0.0006	0.0006	0.0012	0.0026	0	0.0008	0.0008	-0.93	NS
JN680830	390	138	42	208	250	0.0034	0.0015	0.0025	0.0049	0.0045	0.0104	0.0069	0.0057	0.0137	0.0124	-2.01	*
JN680831	296	223	71	0	71	0.0011	0.0012	0.0008		0.0008	0.0024	0.0022	0.0034		0.0034	-1.13	NS
JN680832	256	116	28	112	140	0.0017	0.0032	0	0.0004	0.0003	0.0055	0.0101	0	0.0021	0.0017	-1.12	NS
JN680833	307	175	47	83	130	0.0023	0.0009	0.0097	0.0012	0.0043	0.0046	0.0040	0.0051	0.0057	0.0054	-0.48	NS
JN680834	789	147	39	603	642	0.0039	0.0023	0	0.0045	0.0043	0.0042	0.0045	0	0.0044	0.0041	0.12	NS
JN680835	362	178	53	128	181	0.0022	0.0028	0	0.0022	0.0016	0.0035	0.0035	0	0.0049	0.0035	-1.48	NS
JN680836	200	154	44	0	44	0.0006	0.0007	0		0	0.0015	0.0019	0		0		
JN680837	850	107	31	712	743	0.0043	0	0	0.0051	0.0049	0.0054	0	0	0.0065	0.0062	-0.96	NS
JN680838	259	139	44	76	120	0.0047	0.0068	0	0.0038	0.0024	0.0073	0.0091	0	0.0083	0.0052	-1.48	NS
JN680839	292	156	42	92	134	0.0009	0	0	0.0029	0.0020	0.0019	0	0	0.0060	0.0041	-1.17	NS
JN680840	244	192	48	0	48	0.0017	0.0022	0		0	0.0042	0.0054	0		0		
JN680841	657	495	159	0	159	0.0020	0.0016	0.0030		0.0030	0.0032	0.0024	0.0057		0.0057	-1.35	NS
JN680842	333	266	67	0	67	0.0019	0.0018	0.0021		0.0021	0.0046	0.0048	0.0039		0.0039	-0.74	NS
JN680843	394	220	62	111	173	0.0020	0.0009	0.0044	0.0030	0.0035	0.0029	0.0026	0.0046	0.0025	0.0033	0.17	NS
JN680844	380	124	35	219	254	0.0098	0	0.0187	0.0140	0.0147	0.0079	0	0.0173	0.0110	0.0119	0.88	NS
JN680845	489	125	34	328	362	0.0025	0	0	0.0038	0.0034	0.0022	0	0	0.0032	0.0029	0.62	NS
JN680846	245	188	55	0	55	0.0240	0.0079	0.0805		0.0805	0.0154	0.0062	0.0477		0.0477	2.43	*
JN680847	393	161	43	188	231	0.0020	0.0007	0	0.0036	0.0029	0.0031	0.0030	0	0.0038	0.0031	-0.15	NS
JN680848	228	174	54	0	54	0.0003	0	0.0012		0.0012	0.0011	0	0.0047		0.0047	-1.15	NS
JN680849	301	197	58	45	103	0.0016	0.0015	0.0032	0	0.0018	0.0028	0.0029	0.0048	0	0.0027	-0.59	NS
JN680850	728	294	99	335	434	0.0032	0.0035	0.0058	0.0022	0.0031	0.0037	0.0039	0.0039	0.0035	0.0036	-0.63	NS
JN680851	315	237	78	0	78	0.0141	0.0141	0.0142		0.0142	0.0090	0.0090	0.0090		0.0090	1.84	NS
JN680852	679	255	75	348	423	0.0031	0.0023	0.0031	0.0036	0.0036	0.0044	0.0035	0.0040	0.0052	0.0050	-1.02	NS
JN680853	311	123	36	149	185	0.0018	0.0007	0	0.0032	0.0026	0.0026	0.0022	0	0.0036	0.0029	-0.25	NS
JN680854	432	86	25	321	346	0.0064	0.0011	0.0195	0.0068	0.0077	0.0070	0.0032	0.0111	0.0077	0.0079	-0.19	NS
JN680855	593	133	38	422	460	0.0137	0.0128	0	0.0152	0.0140	0.0102	0.0091	0	0.0114	0.0105	1.32	NS
Total	16525	6591	1908	7978	9886												
Mean						0.0044	0.0025	0.006	0.0051	0.0067	0.005	0.0035	0.0049	0.0061	0.0065		

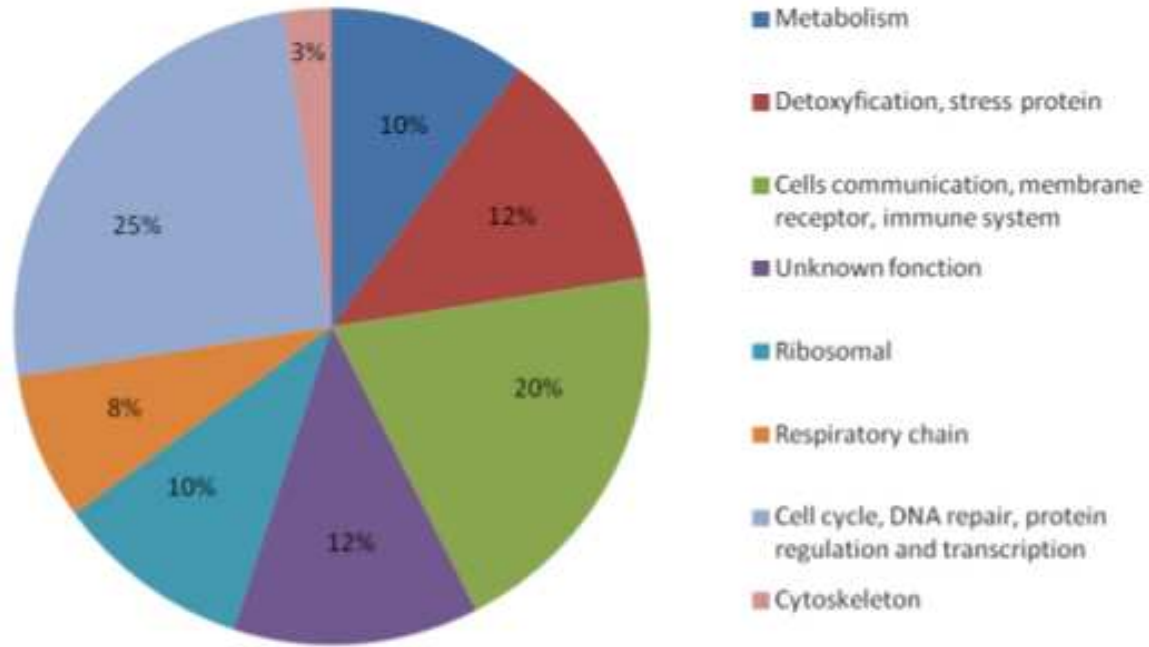
**Table S3** : Number of SNPs for the 37 nuclear loci analyzed in this study. n: non-synonymous SNPs; s: synonymous SNPs; nc: non-coding SNPs.

GenBank Accession no.	P	P <sub>n</sub>	P <sub>s</sub>	P <sub>nc</sub>
JN680818	13			13
JN680819	9	4	0	5
JN680820	15	1	0	14
JN680821	10	5	1	4
JN680822	3	0	3	
JN680823	9	0	0	9
JN680824	34	2	3	29
JN680825	2	1	1	
JN680827	3	0	0	3
JN680828	0	0	0	
JN680829	2	1	0	1
JN680830	17	4	1	12
JN680831	3	2	1	
JN680832	6	5	0	1
JN680833	6	3	1	2
JN680834	10	2	0	8
JN680835	4	2	0	2
JN680836	1	1	0	
JN680837	13	0	0	13
JN680838	6	4	0	2
JN680839	2	0	0	2
JN680840	4	4	0	
JN680841	7	4	3	
JN680842	6	5	1	
JN680843	4	2	1	1
JN680844	10	0	2	8
JN680845	3	0	0	3
JN680846	13	4	9	
JN680847	5	2	0	3
JN680848	1	0	1	
JN680849	3	2	1	0
JN680850	7	3	1	3
JN680851	8	6	2	
JN680852	10	3	1	6
JN680853	3	1	0	2
JN680854	11	1	1	9
JN680855	20	4	0	16
<b>Total</b>	<b>283</b>	<b>78</b>	<b>34</b>	<b>171</b>

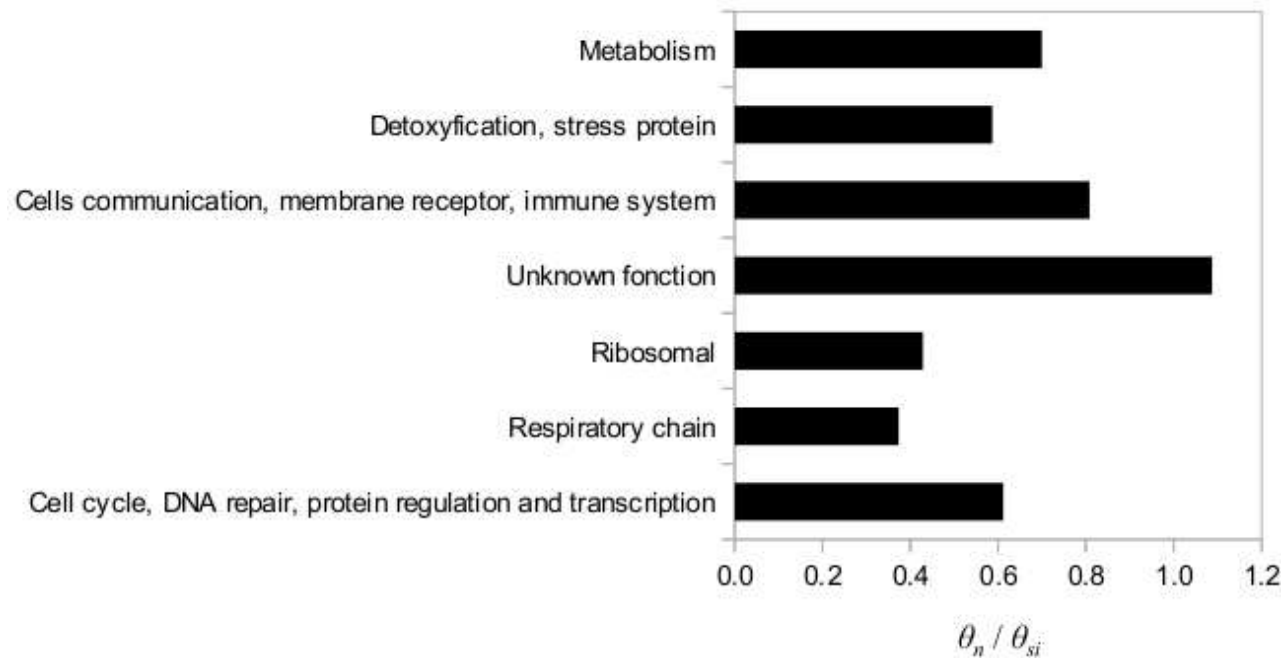
Table S4 : References of published nuclear and allozyme data used in Figure 70.

Species	Nuclear data	Allozyme data
<i>Anguilla rostrata</i>	Gagnaire <i>et al.</i> (2012)	
<i>Caenorhabditis remanei</i>	Cutter (2008)	
<i>Ciona intestinalis</i>	Tsakoggeorga <i>et al.</i> (2012)	Schmidtko and Engel (1980)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Bieme and Eyre-Walker (2004)	Singh and Rhomborg (1987)
<i>Drosophila simulans</i>	Bieme and Eyre-Walker (2004)	Singh and Rhomborg (1987)
<i>Gallus gallus</i>	Axelsson and Ellegren (2009)	
<i>Homo sapiens</i>	Fay <i>et al.</i> (2001)	O'Brien <i>et al.</i> (1983)
<i>Mus castaneus</i>	Halligan <i>et al.</i> (2010)	Awasthi <i>et al.</i> (1998)
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Cameiro <i>et al.</i> (2012)	Nevo <i>et al.</i> (1984)
<i>Arabidopsis lyrata</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	Ansell <i>et al.</i> (2010)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	
<i>Boechera stricta</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	
<i>Helianthus annuus</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	Cronn <i>et al.</i> (1997)
<i>Helianthus petiolaris</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	Cronn <i>et al.</i> (1997)
<i>Oryza rufipogon</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	Gao and Hong (2000)
<i>Populus balsamifera</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	
<i>Populus tremula</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	Rajora and Dancik (1992)
<i>Schiedea globosa</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	Weller <i>et al.</i> (1996)
<i>Sorghum bicolor</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	Morden <i>et al.</i> (1989)
<i>Zea mays</i>	Gossmann <i>et al.</i> (2010)	Cronn <i>et al.</i> (1997)
<i>Ostrea edulis</i>	This study	Saavedra <i>et al.</i> (1995)

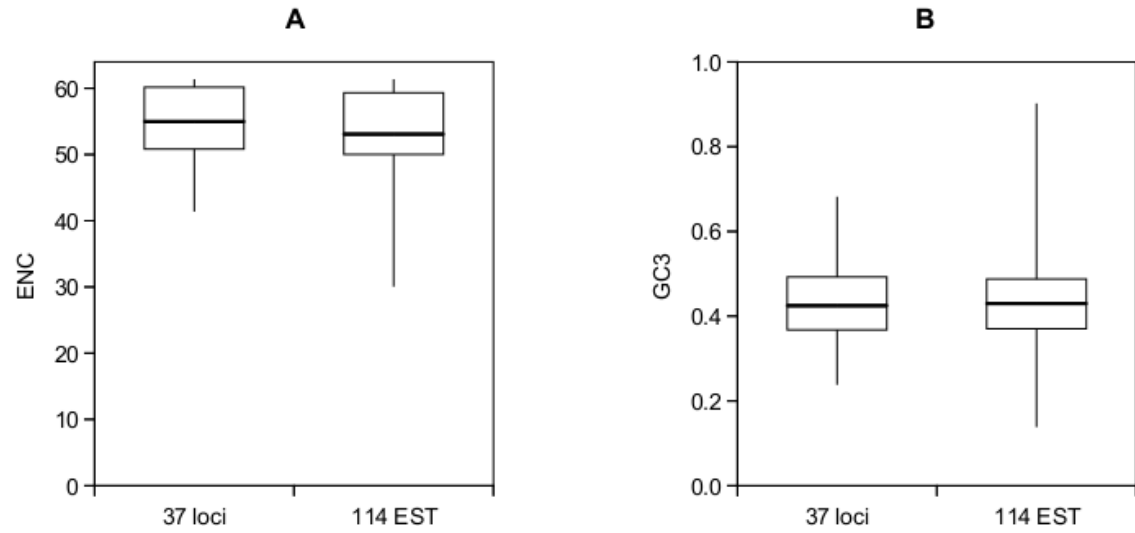




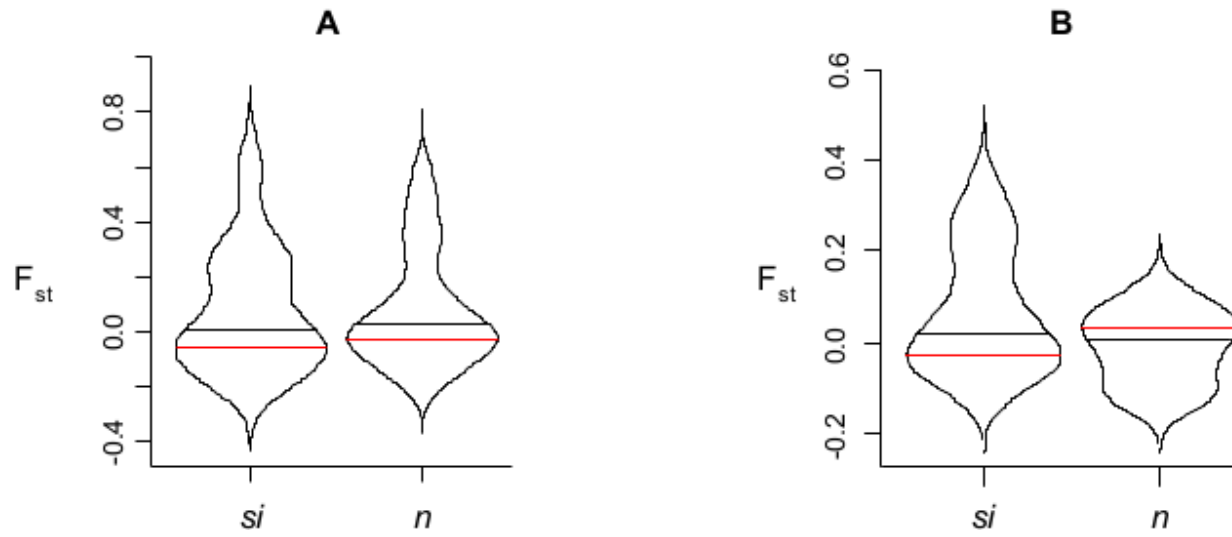
**Figure S1** : Functional classification of the EST sequences used for SNP identification. Genes were clustered into 8 categories according to their putative biological function.



**Figure S2** : Distribution of non-synonymous to silent diversity ratios of the 37 nuclear loci analyzed according to their putative biological function.



**Figure S3** : Distribution of **(A)** the Effective Number of Codon (ENC) and **(B)** GC3 (GC content at third coding position) for the 37 nuclear loci analyzed in this study and for the 114 EST sequences.



**Figure S4** : Distribution of  $F_{ST}$  values for silent (si) and non-synonymous (n) sites, **(A)** between all populations, **(B)** between Atlantic and Mediterranean populations. Black lines are the means and red lines the modes of the distributions.

## V.3 Structure génétique des populations naturelles

### V.3.1 Introduction

L'huître plate européenne possède un habitat fragmenté le long de son aire de distribution. Cette fragmentation est reconnue pour être due à la disparition d'une partie des gisements naturels de cette huître à cause de la sur-exploitation aquacole mais également à cause du développement successif de plusieurs épizooties, dont la bonamiose (Saavedra *et al.*, 1993, 1995). Pourtant, il semblerait que *O. edulis* parvienne à se maintenir de façon localisée, laissant penser à des phénomènes d'adaptation locale de l'huître vis-à-vis de son environnement abiotique (température, salinité, exondation, etc.) et biotique (parasites, phytoplancton, compétiteurs).

Tout comme chez la coque *Cerastoderma glaucum* qui possède elle aussi un habitat très fragmenté (Tarnowska *et al.*, 2010), de précédentes études réalisées sur *O. edulis* ont mis en évidence une structuration génétique faible mais significative entre les populations naturelles de la façade Atlantique et celles de la zone méditerranéenne selon un modèle d'isolement par la distance (Saavedra *et al.*, 1993, 1995; Launey *et al.*, 2002; Diaz-Almela *et al.*, 2004). D'autre part, une forte différenciation génétique entre les populations de Mer Méditerranée et de Mer Noire a également été identifiée chez *O. edulis* (Saavedra *et al.*, 1993). Cependant, la potentielle adaptation locale de ces populations naturelles n'a jusque-là par encore été testée.

La disponibilité d'une grande quantité de marqueurs moléculaires couvrant l'ensemble du génome de l'huître plate européenne [Scan génomique ; cf. **Partie III.2**] nous a donné l'opportunité d'étudier de façon robuste et à grande échelle la distribution spatiale de la diversité. Il s'agissait ainsi de caractériser la différenciation génétique et la structure des populations naturelles de *O. edulis*, à l'échelle de son aire de distribution, et de détecter de potentielles signatures de la sélection naturelle.

Pour détecter de telles signatures de la sélection, l'idée générale est de distinguer les effets locus-spécifiques (sélection, mutation, recombinaison, etc.) des effets du génome entier (dérive, effet fondateur, flux de gènes, etc.). Cette approche constitue ce que l'on appelle la Génomique des Populations (Black *et al.*, 2001; Luikart *et al.*, 2003). L'idée sous-jacente est que, au sein d'une même population, la majorité des loci (effets du génome entier) se comporte de façon similaire face à l'histoire démographique et phylogénétique de la population. Par opposition, une petite proportion de loci (effets locus-spécifiques) se comporte différemment et est importante pour la fitness ou l'adaptation des individus. Ces loci qualifiés de « outliers » sont alors détectables par la grande variance de leurs fréquences alléliques par rapport aux loci non-liés et distants qui sont considérés comme des loci neutres.

Un événement récent de sélection positive se traduit par une diminution de la variabilité au voisinage de la mutation avantageuse fixée (balayage sélectif). Généralement, on fait l'hypothèse que les outliers sont eux-même sous sélection. Cependant, il peut y avoir un effet de liaison (absence de recombinaison) entre la cible de la sélection naturelle et le marqueur outlier détecté. Cet effet

est appelé auto-stop génétique (*hitchhiking effect*, Maynard Smith and Haigh, 1974).

Plusieurs méthodes existent pour détecter de potentielles signatures de la sélection, que ce soit à partir de la diversité génétique chez une seule population (ex. : Tajima, 1989; Fu, 1997; Fay and Wu, 2000; Nielsen *et al.*, 2005) ou à partir du niveau de différenciation ( $F_{ST}$ ) entre plusieurs populations (ex. : Lewontin and Krakauer, 1973; Beaumont and Nichols, 1996; Vitalis *et al.*, 2001; Beaumont and Balding, 2004).

Dans ce dernier cas, la détection se base sur la distribution d'une statistique résumante tel que le  $F_{ST}$ . Un  $F_{ST}$  plus fort que celui attendu sous le modèle de neutralité (*i.e.*, plus fort que ceux de la majorité des loci) suggère une sélection positive divergente (*disruptive selection*), alors qu'un  $F_{ST}$  plus faible suggère une sélection balancée (*balancing selection*) ou purifiante (*purifying selection*).

Pour cette étude, des huîtres plates issues de 15 populations naturelles représentant l'ensemble de l'aire européenne de répartition de l'espèce ont été étudiées au moyen de marqueurs microsatellites et de SNP. L'hypothèse déjà formulée d'un isolement génétique par la distance, ainsi que l'hypothèse d'une structuration des populations naturelles de *O. edulis* ont été testées. Les marqueurs SNP développés dans le cadre de mes travaux de thèse représentent une bonne couverture du génome [cf. **Partie III.3**], ce qui a été idéal pour rechercher des signatures de sélection (marqueurs outliers) entre les différents groupes structurés.

## V.3.2 Matériels et Méthodes

### V.3.2.1 Populations naturelles échantillonnées

Les populations naturelles utilisées pour cette étude ont été choisies de façon à maximiser la couverture de l'aire de distribution de l'huître plate européenne. Pour cela, des populations d'*Ostrea edulis* ont été choisies en Mer du Nord, dans l'Océan Atlantique, la Mer Méditerranée et la Mer Noire [**Table 27**]. Au total, 17 sites ont été échantillonnés. Étant donné la difficulté à obtenir un effectif de 50 individus sur certains sites, deux sites géographiquement proches en Angleterre (River Fal, River Fowey, distants de 44 km) et deux sites en Ukraine (Donouzlav, Sebastopol, distants de 87 km) ont été échantillonnés dans l'objectif d'être regroupés en deux uniques populations. La validité de ces deux regroupements a été testée [cf. **Partie V.3.3**].

D'autre part, deux espèces d'huîtres plates phylogénétiquement proches, l'huître plate australienne *Ostrea angasi* et l'huître plate chilienne *Ostrea chilensis*, ont été utilisées dans cette étude afin de servir de "repères" (outgroups) pour l'étude de diversité et de structure [**Table 27**].

La description complète des sites échantillonnés est présentée dans la **Partie II.2** du présent manuscrit.

**Table 27** – Liste des sites échantillonnés correspondant aux populations naturelles d'*O. edulis*, de *O. angasi* et *O. chilensis* étudiées. Plusieurs populations ont été regroupées pour les huîtres en provenance d'Angleterre, d'Ukraine et *Ostrea angasi*.

Origine géographique	Site	Abréviation	Coordonnées GPS		Effectifs
<i>Ostrea edulis</i>		OE			
Mer du Nord					
Norvège	Oslofjorden	No	59°27'32.42"N	010°32'37.16"E	48
Danemark	Esbjerg	Dk	55°28'51.37"N	008°22'46.98"E	50
Pays-Bas	Lake Gravelingen	PB	51°42'23.17"N	004°2'12.06"E	50
Océan Atlantique					
France	La Rance	LR	48°32'47.40"N	001°58'08.77"O	50
Angleterre	River Fal	GB	50°12'1.14"N	005°2'14.96"O	23
	River Fowey		50°19'59.11"N	004°38'4.69"O	32
France	Larmor Baden	LB	47°34'53.07"N	002°54'0.19"O	50
France	Île d'Aix	Aix	46°01'04.14"N	001°09'17.93"O	50
Portugal	Ria Formosa	Po	36°58'38.81"N	007°52'20.12"O	30
Mer Méditerranée					
Espagne	Murcia	Es	37°43'55.14"N	000°47'55.54"O	45
France	Fos-sur-Mer	FsM	43°25'10.01"N	004°56'25.75"E	50
France, Corse	Étang de Diane	Co	42° 7'56.09"N	009°32'16.38"E	48
Italie	Lagune de Venise	It	45°28'9.83"N	012°19'46.65"E	48
Turquie	-	Tq	36°46'5.02"N	030°41'7.77"E	30
Grèce	Maliakos Bay	Gr	40°36'21.17"N	022°54'19.63"E	48
Mer Noire					
Ukraine	Donouzlav	Uk	45°20'23.99"N	033°0'30.70"E	22
	Sebastopol		44°36'52.73"N	033°21'21.85"E	36
<i>Ostrea angasi</i>					
	Batemans Bay		35°43'35.61"S	150°13'34.60"E	30
	Port Philip Bay	OA	38°4'26.07"S	144°52'50.55"E	20
	Tasmania		41°52'8.23"S	148°18'1.95"E	16
<i>Ostrea chilensis</i>					
	-	OC	-	-	50

### V.3.2.2 Extraction ADN et génotypage

Pour chaque individu à analyser, suivant la disponibilité en tissus, l'extraction a été réalisée à partir d'un échantillon de 20 mg de tissu branchial, de manteau ou de muscle, suivant le protocole QIAamp® DNA mini-kit (Qiagen).

Le génotypage de 384 SNP, issus de séquençage *in vitro* et de séquençage *in silico* [cf. **Partie III.2**], a été effectué à la plateforme génomique BeadXpress de Toulouse (GenoToul) via la chimie GoldenGate, et la technologie Veracode (Illumina).

D'autre part, 7 marqueurs microsatellites (Oed 144, Oed 177a, Oed 181, Oed 199, Oed 212b, Oed 269, Oed 327; Lallias *et al.*, 2009b,c) ont également été génotypés. Les protocoles utilisés sont détaillés **Partie III.2.1.1.3** et **Partie III.3.1.3** et **Partie III.3.1.4**.

### V.3.2.3 Analyse de la diversité et de la structure génétique

#### V.3.2.3.1 Estimation de la diversité génétique intra-population

Afin d'éviter une redondance de l'information apportée par les marqueurs microsatellites d'une part, et les SNP d'autre part, le déséquilibre de liaison entre paires de marqueurs a été testé pour

chaque population.

La diversité génétique intra-population a été estimée à partir du calcul de la richesse allélique (nombre moyen d'allèles par locus,  $A$ ), de l'hétérozygotie observée ( $H_{OBS}$ ) et de son estimation non-biaisée attendue sous l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg ( $H_{NB}$ ).

De plus, au sein de chaque population, l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été estimé par calcul de l'indice  $F_{IS}$  (Wright, 1951). Une valeur négative de cet indice exprime un déficit en hétérozygotes, alors qu'une valeur positive exprime un excès. La significativité a été établie au seuil 5 %, après 1000 permutations.

Ces analyses ont été effectuées avec le logiciel Genetix v4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004).

### V.3.2.3.2 Estimation de la diversité et de la structure inter-populations

La diversité génétique entre paires de populations a été estimée par l'indice de différenciation  $F_{ST}$  de Wright (1951), selon l'estimateur  $\theta$  de Weir and Cockerham (1984). Cet indice mesure la variance des fréquences alléliques entre populations. Plus la valeur de cet indice s'éloigne de zéro, plus la différenciation génétique entre les populations considérées est élevée. La significativité a été établie au seuil 5 %, après 1000 permutations. L'analyse a été effectuée avec le logiciel Genetix v4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004).

Un test d'isolement par la distance a été effectué (Mantel, 1967), avec le logiciel Genetix v4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004). Pour cela, les distances génétiques entre paires de populations, estimées par l'indice de différenciation  $F_{ST}$  (Rousset, 1997) ont été comparées avec les distances géographiques [Table 28]. Selon la méthode de Launey *et al.* (2002), les distances géographiques ont été mesurées le long des lignes de côtes. La significativité du test a été choisie après 1000 permutations.



**Table 28** – Distances maritimes en kilomètres entre les populations naturelles d'*Ostrea edulis* étudiées. Les abréviations des noms des populations sont expliquées dans la **Table 27**.

Distance maritime (en Kms)	No	Dk	PB	LR	GB	LB	Aix	Po	Es	FsM	Co	It	Tq	Gr	Uk
No	-														
Dk	508	-													
PB	990	540	-												
LR	1607	1157	627	-											
GB	1639	1179	659	285	-										
LB	1942	1492	962	463	417	-									
Aix	2162	1712	1182	683	642	230	-								
Po	3219	2759	2239	1743	1675	1531	1554	-							
Es	3953	3493	2973	2477	2414	2275	2298	744	-						
FsM	4744	4284	3764	3268	3210	2766	3099	1540	801	-					
Co	4994	4534	4004	3518	3460	3326	3349	1785	1051	491	-				
It	6662	6202	5672	5186	5123	4981	5004	3450	2729	2291	1892	-			
Tq	6796	6336	5816	5320	5252	5108	5131	3587	2907	2594	2185	2173	-		
Gr	6687	6227	5707	5211	5143	4999	5022	3478	2798	2485	2076	2064	1044	-	
Uk	7436	6976	6456	5960	5892	5748	5771	4227	3547	3234	2825	2813	1735	1175	-

Les distances génétiques entre populations ont été estimées par le calcul de la distance génétique de Nei (1972), à partir des fréquences alléliques, avec la suite de programmes PHYLIP 3.57c (Felsenstein, 1995). Les distances ont été représentées graphiquement sur un arbre construit avec la méthode de Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987). Cent bootstraps ont été choisis pour tester la robustesse des nœuds. L'arbre de distances a été obtenu avec le logiciel TreeView (Page, 1996).

Pour chacun des deux jeux de données (microsatellites, SNP), la structure des populations a été inférée par deux méthodes différentes.

Tout d'abord, une analyse factorielle des correspondances (AFC) sur les fréquences alléliques des populations a été effectuée avec le logiciel GENETIX v4.05.2 (Belkhir *et al.*, 2004). Les objets analysés sont vus comme un nuage de points dans un hyper-espace qui a autant de dimensions qu'il y a de modalités (ici les allèles) sur toutes les variables (ici les allèles aux différents locus). Chaque population est alors représentée par le centre de gravité (ou barycentre) de tous les individus de la population.

La structure génétique a également été inférée par une méthode bayésienne implémentée dans le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Le logiciel fait l'hypothèse que les loci sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg et à l'équilibre de liaison entre les populations. La méthode d'inférence ré-échantillonne de façon probabiliste chaque individu du jeu de données, à partir de son génotype à plusieurs loci, afin de l'assigner à une sous-population ( $k$ ). Le nombre de sous-populations potentielles à tester ( $K$ ) est choisi par l'utilisateur.

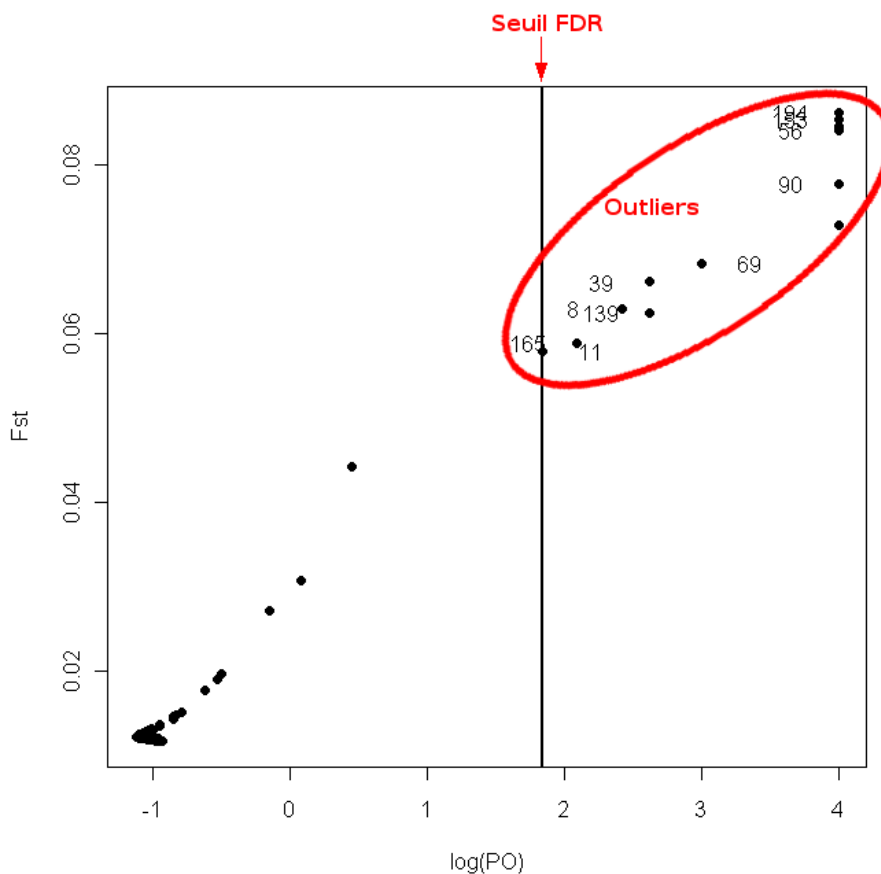
Aucune information sur l'origine géographique des individus n'a été fournie au logiciel. La probabilité *a posteriori* des données a été estimée avec 10 itérations pour chaque valeur de  $K$ , sous un modèle avec introgression (*admixture model*) et avec corrélation des fréquences alléliques entre les populations. Une première phase d'apprentissage (*Burn-in*) a été réalisée pour 10 000 répétitions et la phase d'acquisition a été réalisée pour 15 000 répétitions de la chaîne de Markov. Le nombre le plus probable de groupes génétiques a été estimé à partir du taux de changements de second ordre du logarithme des probabilités *a posteriori* ( $\ln P(D)$ ) entre les valeurs successives de  $K$  (Evanno *et al.*, 2005) :  $|L''(K)| = |L'(K+1) - L'(K)|$  avec  $L'(K) = L(K) - L(K-1)$  où  $L(K) = \ln P(D)$ .

Les résultats sont résumés sous la forme d'un diagramme coloré où chaque individu analysé est représenté par une ligne verticale découpée en  $K$  segments colorés dont la longueur est proportionnelle à chacun des  $K$  groupes génétiques inférés par l'analyse.

#### V.3.2.4 Détection de signatures de sélection

La détection de loci outliers a été effectuée sur les marqueurs SNP uniquement, et sur toutes les populations naturelles échantillonnées, puis sur les groupes structurés identifiés précédemment. L'analyse a été réalisée avec le logiciel BayeScan v2.0 (Foll and Gaggiotti, 2008). Ce logiciel utilise une méthode Bayésienne pour estimer la probabilité que chaque locus soit sous sélection, à

partir des données de génotypes. Pour cela, il décompose le  $F_{ST}$  en une composante population-spécifique ( $\beta$ ) partagée par tous les loci, et en une composante locus-spécifique ( $\alpha$ ) partagée par toutes les populations. Pour un locus, un écart à l'équilibre est supposé lorsque la composante locus-spécifique est nécessaire pour expliquer la distribution de la diversité ( $\alpha$  significativement différent de zéro). Une valeur positive de  $\alpha$  suggère une sélection positive divergente (*disruptive selection*), alors qu'une valeur négative suggère une sélection balancée (*balancing selection*) ou purifiante (*purifying selection*). Pour chaque locus, le logiciel calcule une distribution *a posteriori* (PO) du rapport de probabilités du modèle « sélection » par le modèle « neutralité ». Le logiciel a été utilisé avec les paramètres par défauts, et avec 50 000 itérations. Un risque de détection de faux positifs (FDR) de 5 %, puis de 1 %, ont été successivement appliqués. Une représentation visuelle du  $F_{ST}$  en fonction du  $\log(\text{PO})$  (**Figure 71**) a ensuite été obtenue avec le logiciel R project version 2.1.4.1. (R Development Core Team, 2011 ; <http://www.r-project.org/>), grâce à un script fourni avec le logiciel BayeScan (Foll and Gaggiotti, 2008).



**Figure 71** – Représentation des  $F_{ST}$  en fonction du  $\log(\text{PO})$ , où PO est la distribution *a posteriori* du rapport de probabilités du modèle « sélection » par le modèle « neutralité ». FDR correspond au seuil de détection de faux positifs parmi les marqueurs outliers détectés. Chaque point représente un marqueur moléculaire testé. Les marqueurs à droite de la ligne seuil (marqueurs identifiés par un nombre) sont les marqueurs sous sélection positive divergente.

### V.3.3 Résultats

Au total, sur les 384 SNP, 250 marqueurs (65,1 %) ont été typés avec succès. Parmi eux, seuls 208 marqueurs (54,2 %) se sont révélés polymorphes et ont été utilisés pour les analyses de diversité, de structure et de détection de signatures de la sélection. Les SNP ont été typés sur un total de 617 individus *O. edulis*, 63 individus *O. angasi* et 50 individus *O. chilensis*.

Les 7 marqueurs microsatellites génotypés ont été utilisés pour les analyses de diversité et de structure des populations naturelles. Ces marqueurs ont été typés sur un total de 676 individus *O. edulis* et 63 individus *O. angasi*.

Les mêmes individus appartenant aux mêmes populations naturelles ont été typés avec les marqueurs microsatellites et les marqueurs SNP. Cependant, les individus de Grèce présentaient des génotypes SNP illisibles, malgré deux tentatives de typage, et n'ont donc pu faire partie du jeu de données SNP. D'autre part, les huîtres *Ostrea chilensis* étant phylogénétiquement éloignées d'*Ostrea edulis*, elles n'ont pas été typées avec les microsatellites. Le jeu de données microsatellites contient 15 populations d'huître plate européenne *O. edulis* et 1 population d'huître plate australienne *O. angasi*. Le jeu de données SNP contient 14 populations d'*O. edulis*, 1 population *O. angasi* et 1 population *O. chilensis*. Les populations *O. angasi* et *O. chilensis* jouent le rôle d'outgroups pour les analyses de diversité et de structure.

La validité du regroupement en une unique population ("Angleterre") des individus échantillonnés dans la rivière Fal ( $n = 21$ ) et dans la rivière Fowey ( $n = 31$ ), distantes de 44 km, a été testée par la méthode des F-statistics sur les SNP ( $F_{ST} = 0,0161$ ) et les microsatellites ( $F_{ST} = 0,0153$ ). De la même façon, la validité du regroupement en une unique population ("Ukraine") des individus provenant du site de Donouzlav ( $n = 22$ ) et de Sebastopol ( $n = 13$ ), distants de 87 km, a été testée sur les SNP ( $F_{ST} = 0,0066^{NS}$ ) et les microsatellites ( $F_{ST} = 0,0396$ ). Ces valeurs de différenciation étant plus faibles que celles de la plupart des comparaisons avec d'autres populations, ces sites ont été regroupés.

#### V.3.3.1 Diversité génétique intra-population

L'ensemble des paires de marqueurs moléculaires analysées (microsatellites et SNP) présente un déséquilibre de liaison significatif sur une partie des populations naturelles. Toutes les populations étant alternativement concernées par ce déséquilibre, aucun marqueur moléculaire n'a été retiré des jeux de données.

**Table 29** – Diversité génétique des populations naturelles de *Ostrea edulis*, *Ostrea angasi* et *Ostrea chilensis*, à partir du génotypage : **A)** des 7 marqueurs microsatellites ; **B)** des 208 marqueurs SNP. Indicatif : abréviation du nom de chaque population ; N : nombre d'individus génotypés ; A : richesse allélique ;  $H_{NB}$  : hétérozygotie non-biaisée ;  $H_{OBS}$  : hétérozygotie observée ;  $F_{IS}$  : indice de fixation intra-population. \* : valeur significative à  $p = 0,05$  ; <sup>a</sup> : moyenne des valeurs obtenues sur l'ensemble des populations de *O. edulis*.

**A) Marqueurs microsatellites**

Population	Indicatif	N	A	$H_{NB}$	$H_{OBS}$	$F_{IS}$
<i>Ostrea edulis</i>						
Norvège	No	47	13,43	0,865	0,627	0,278*
Danemark	Dk	50	15,43	0,884	0,850	0,038
PaysBas	PB	49	16,00	0,876	0,778	0,113*
LaRance	$F_{LR}$	50	17,29	0,868	0,821	0,055
Angleterre	GB	53	15,29	0,881	0,835	0,053
LarmorBaden	$F_{LB}$	48	18,00	0,875	0,773	0,119*
Aix	$F_{alk}$	48	18,14	0,879	0,703	0,202*
Portugal	Po	30	16,14	0,899	0,748	0,171*
Espagne	Es	44	18,43	0,912	0,764	0,164*
Fos-sur-Mer	$F_{tsM}$	48	19,29	0,907	0,758	0,167*
Corse	$F_{\infty}$	48	17,29	0,887	0,769	0,134*
Italie	It	48	17,14	0,883	0,793	0,103*
Grèce	Gr	48	18,29	0,903	0,856	0,053
Turquie	Tq	30	16,71	0,875	0,788	0,101*
Ukraine	Uk	35	19,00	0,906	0,720	0,209*
<i>Ostrea edulis</i>	OE	45 <sup>a</sup>	17,06 <sup>a</sup>	0,887 <sup>a</sup>	0,772 <sup>a</sup>	0,131* <sup>a</sup>
<i>Ostrea angasi</i>	OA	63	16,86	0,851	0,780	0,084*

**B) Marqueurs SNP**

Population	Indicatif	N	A	$H_{NB}$	$H_{OBS}$	$F_{IS}$
<i>Ostrea edulis</i>						
Norvège	No	45	1,95	0,324	0,322	0,005
Danemark	Dk	50	1,98	0,352	0,343	0,026
PaysBas	PB	49	1,98	0,358	0,350	0,022
LaRance	$F_{LR}$	50	1,99	0,380	0,370	0,028
Angleterre	GB	52	1,98	0,373	0,369	0,011
LarmorBaden	$F_{LB}$	50	1,99	0,380	0,363	0,046*
Aix	$F_{alk}$	50	1,99	0,368	0,362	0,016
Portugal	Po	30	1,98	0,382	0,377	0,015
Espagne	Es	35	1,97	0,364	0,355	0,025
Fos-sur-Mer	$F_{tsM}$	50	1,99	0,368	0,365	0,009
Corse	$F_{\infty}$	44	1,98	0,358	0,362	-0,013
Italie	It	48	1,98	0,390	0,389	0,004
Turquie	Tq	29	1,89	0,296	0,294	0,006
Ukraine	Uk	35	1,81	0,279	0,286	-0,025
<i>Ostrea edulis</i>	OE	44 <sup>a</sup>	1,96 <sup>a</sup>	0,355 <sup>a</sup>	0,35 <sup>a</sup>	0,013 <sup>a</sup>
<i>Ostrea angasi</i>	OA	63	1,81	0,208	0,198	0,051*
<i>Ostrea chilensis</i>	OC	50	1,06	0,033	0,057	-0,793*

Sur l'ensemble des populations, le nombre moyen d'allèles par locus microsatellite est compris entre 13,4 (Norvège) et 19,3 (Fos-sur-Mer) [Table 29]. Globalement, la richesse allélique augmente le long de la ligne de côte, de la Norvège (Mer du Nord) à Fos-sur-Mer (Mer Méditerranée Ouest). Les populations naturelles d'huîtres plates européennes *Ostrea edulis* présentent une richesse allélique équivalente à celle des populations naturelles de l'huître plate australienne *O. angasi*, à la fois pour les marqueurs microsatellites et pour les SNP ( $p > 0,05$ ). La population d'*O. chilensis* présente au contraire une richesse allélique beaucoup plus faible (SNP :  $A = 1,06$ ), reflétant une forte homozygotie pour les mêmes allèles.

L'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg (HW) apparaît beaucoup plus important avec les marqueurs microsatellites qu'avec les SNP. Pour les microsatellites, l'hétérozygotie observée est systématiquement plus faible que celle attendue sous l'équilibre HW, avec un déficit significatif en hétérozygotes pour les populations de Norvège, Pays-Bas, Larmor Baden, île d'Aix, Portugal, Espagne, Fos-sur-Mer, Corse, Italie, Turquie et Ukraine ( $F_{IS} = 0,101$  à  $0,278$ ). *O. angasi* présente également un déficit significatif en hétérozygotes ( $F_{IS} = 0,084$ ). D'après les marqueurs SNP, l'hétérozygotie observée est équivalente à celle attendue sous l'équilibre HW. Néanmoins, la population Larmor Baden présente un déficit significatif en hétérozygotes ( $F_{IS} = 0,046$ ), tout comme la population *O. angasi* ( $F_{IS} = 0,051$ ), alors que la population d'*O. chilensis* présente un excès par rapport à la proportion attendue ( $F_{IS} = -0,793$ ). Cet « excès » observé est lié au fait que les marqueurs ont été développés sur *O. edulis* et au fait que sur les 208 SNP typés, tous les individus présentent un génotype homozygote, excepté pour 9 loci où ils sont tous hétérozygotes.

### V.3.3.2 Diversité et structure entre populations

La différenciation génétique globale sur l'ensemble des populations d'*Ostrea edulis* est significativement différente de zéro. Cependant, l'estimation basée sur les génotypes SNP ( $F_{ST} = 0,0878$ ) est supérieure à celle basée sur les microsatellites ( $F_{ST} = 0,0188$ ).

Cette différence entre les deux types de marqueurs moléculaires est retrouvée chez les  $F_{ST}$  calculés entre paires de populations [Table 30]. Les valeurs de  $F_{ST}$  sont presque toutes significativement différentes de zéro, quel que soit le type de marqueur, mais sont plus élevées pour le jeu de données SNP.

Pour *O. edulis*, les  $F_{ST}$  fortement significatifs ( $p < 0,001$ ) entre paires de populations varient entre 0,0079 et 0,0590 pour les microsatellites, et entre 0,0085 et 0,2512 pour les SNP. Entre *O. edulis* et *O. angasi*, ils varient de 0,0249 et 0,0687 pour les microsatellites, et entre 0,2051 à 0,4010 pour les SNP ; entre *O. edulis* et *O. chilensis* de 0,5126 à 0,6620 ; et entre *O. angasi* et *O. chilensis* le  $F_{ST}$  est égal à 0,6870.

Le test d'isolement par la distance entre les populations d'*O. edulis* effectué successivement sur les deux types de marqueurs moléculaires reflète une corrélation positive modérée entre les distances génétiques entre paires de populations ( $F_{ST}$ ) et les distances géographiques. La corrélation est respectivement de 0,534 ( $p = 0,002$ ) pour les microsatellites, et de 0,558 ( $p = 0,004$ ) pour les SNP. Ces valeurs de corrélation sont identiques lorsque l'on utilise la formule  $F_{ST}/(1-F_{ST})$

(Rousset, 1997) comme mesure de la distance génétique entre les paires de populations.

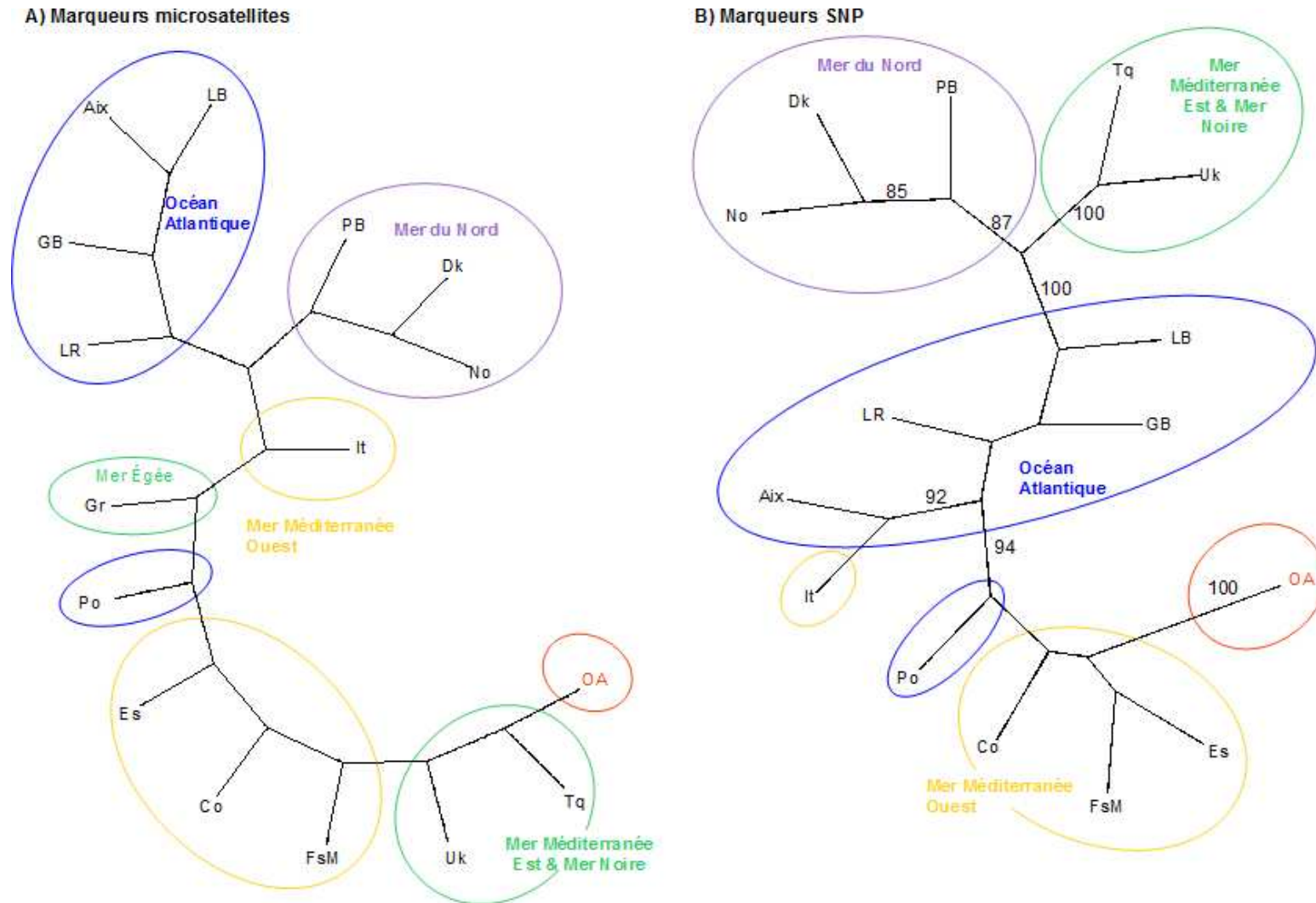
Les distances génétiques de Nei (1972) ont été utilisées pour construire un arbre de Neighbor-joining entre les populations, pour chacun des deux jeux de données [Figure 72]. La population *O. chilensis* n'a pu être positionnée sur l'arbre construit avec les SNP, à cause de la forte proportion de loci ne présentant qu'un seul et unique allèle, pour tous les individus. Pour les marqueurs microsatellites, les valeurs de bootstraps sont comprises entre 22 et 78, pour 100 ré-échantillonnages. Pour les marqueurs SNP, ces valeurs sont comprises entre 39 et 100. Seules les valeurs supérieures à 80 ont été reportées sur les arbres.

Sur chacun des deux arbres, les populations naturelles situées dans la même mer ou le même océan sont phylogénétiquement proches. Sept groupes de populations ont ainsi été individualisés sur l'arbre construit avec les SNP, contre 8 groupes sur celui construit avec les microsatellites. Les populations de Turquie (Mer Méditerranée Est) et d'Ukraine (Mer Noire) sont regroupées. Les populations de Grèce, d'Italie et du Portugal sont les seules à ne pas être regroupées suivant leur localisation géographique. Mises à part ces trois populations, sur l'arbre obtenu avec les microsatellites, les groupes sont ordonnés suivant un continuum allant de la Mer du Nord, à la Mer de Tasmanie (*O. angasi*), en passant par l'Océan Atlantique, la Mer Méditerranée Ouest, ainsi que la Mer Méditerranée Est et la Mer Noire. Ce continuum est également visible sur l'arbre construit avec les SNP, sauf que le groupe Mer Méditerranée Est et Mer Noire apparaît phylogénétiquement plus proche des groupes Mer du Nord d'une part et Océan Atlantique d'autre part, que du groupe Mer Méditerranée Ouest. Cinq groupes identifiés avec les SNP sont relativement robustes, avec des valeurs de bootstrap comprises entre 87 et 100.

**Table 30** – Différenciation mesurée par les valeurs de  $\theta$ , estimateur des  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham, 1984), entre paires de populations d'huîtres plates *O. edulis*, *O. angasi* et *O. chilensis*. La demi-matrice supérieure présente les valeurs obtenues à partir des 7 marqueurs microsatellites. La demi-matrice inférieure présente les valeurs obtenues avec les 208 SNP. NS :  $p > 0,05$ ; \* :  $p < 0,05$ ; Toutes les autres valeurs sont significatives au seuil  $p = 0,001$ .

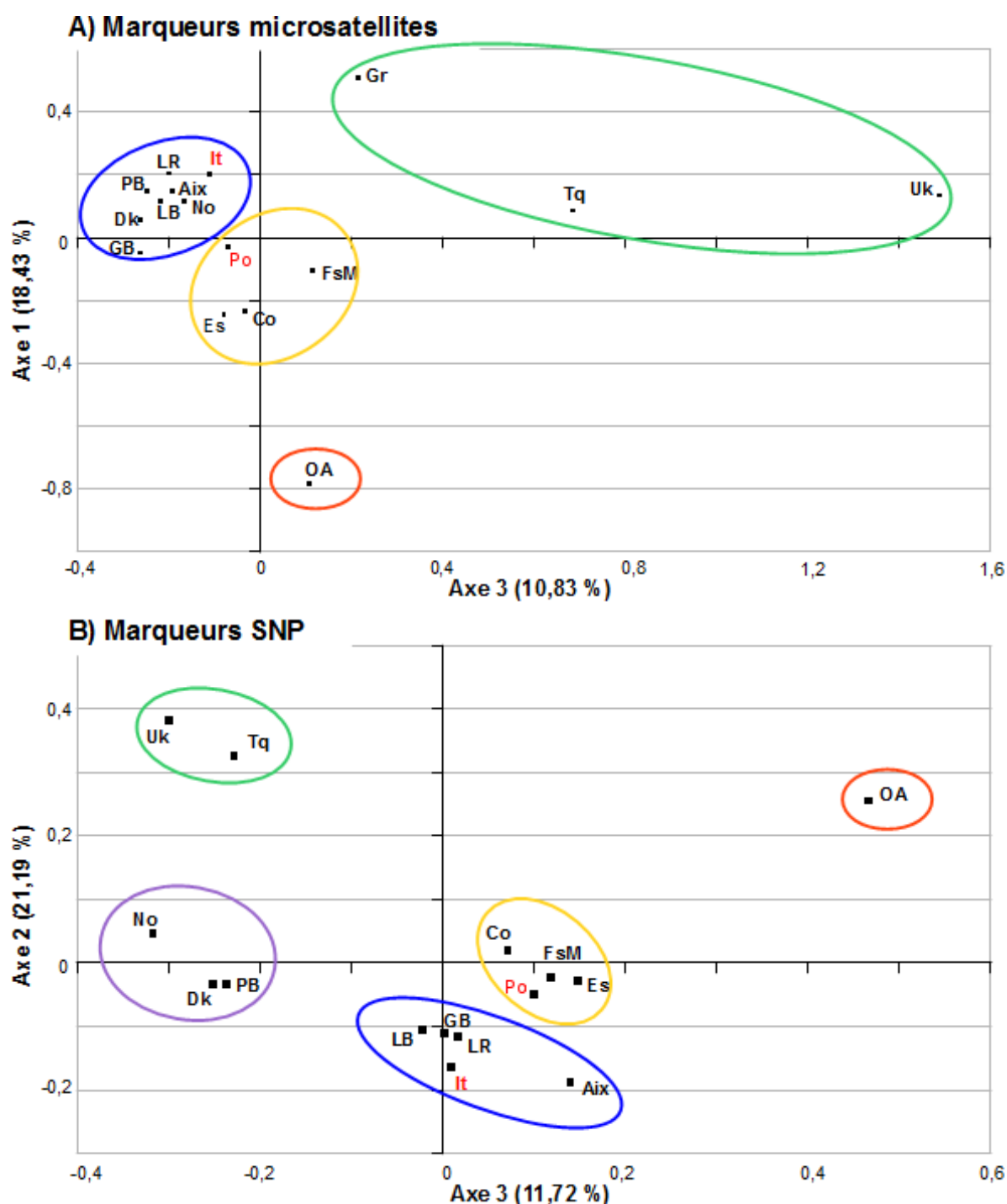
	No	Dk	PB	LR	GB	LB	Aix	Po	Es	FsM	Co	It	Gr	Tq	Uk	OA
No	-	0,0109	0,0122	0,0251	0,0228	0,0283	0,0172	0,0165	0,0281	0,0158	0,0320	0,0190	0,0230	0,0549	0,0342	0,0608
Dk	0,0199	-	0,0032 <sup>NS</sup>	0,0118	0,0134	0,0158	0,0127	0,0110	0,0211	0,0124	0,0288	0,0089	0,0182	0,0590	0,0399	0,0584
PB	0,0285	0,0030*	-	0,0028 <sup>NS</sup>	0,0089	0,0079	0,0021 <sup>NS</sup>	0,0107*	0,0207	0,0131	0,0208	0,0081*	0,0148	0,0548	0,0399	0,0632
LR	0,1087	0,0888	0,0582	-	0,0091	0,0031 <sup>NS</sup>	0,0041*	0,0114	0,0253	0,0158	0,0208	0,0053*	0,0147	0,0516	0,0413	0,0684
GB	0,1058	0,0853	0,0561	0,0085	-	0,0102	0,0039 <sup>NS</sup>	0,0077*	0,0198	0,0134	0,0188	0,0157	0,0209	0,0518	0,0374	0,0552
LB	0,0902	0,0577	0,0510	0,0007 <sup>NS</sup>	0,0152	-	0,0016 <sup>NS</sup>	0,0077*	0,0224	0,0180	0,0162	0,0098	0,0180	0,0543	0,0449	0,0687
Aix	0,1779	0,1354	0,1311	0,0265	0,0487	0,0333	-	0,0034 <sup>NS</sup>	0,0194	0,0119	0,0140	0,0044*	0,0125	0,0500	0,0388	0,0668
Po	0,1415	0,1039	0,0994	0,0213	0,0312	0,0244	0,0316	-	0,0072*	0,0028 <sup>NS</sup>	0,0149	0,0071*	0,0111	0,0387	0,0211	0,0515
Es	0,1871	0,1471	0,1460	0,0542	0,0599	0,0646	0,0569	0,0113	-	0,0085*	0,0176	0,0228	0,0167	0,0445	0,0309	0,0492
FsM	0,1688	0,1233	0,1183	0,0406	0,0424	0,0476	0,0597	0,0068 <sup>NS</sup>	0,0105	-	0,0147	0,0092	0,0094	0,0215	0,0113	0,0321
Co	0,1538	0,1129	0,1061	0,0450	0,0461	0,0508	0,0819	0,0308	0,0357	0,0247	-	0,0201	0,0199	0,0395	0,0287	0,0520
It	0,1154	0,0790	0,0738	0,0191	0,0328	0,0195	0,0223	0,0298	0,0672	0,0633	0,0759	-	0,0122	0,0397	0,0304	0,0576
Gr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0319	0,0240	0,0570
Tq	0,1418	0,1453	0,1429	0,1554	0,1621	0,1413	0,2113	0,1455	0,1669	0,1544	0,1489	0,1678	-	-	0,0103*	0,0249
Uk	0,1438	0,1533	0,1491	0,1857	0,1897	0,1695	0,2512	0,1885	0,2148	0,1936	0,1830	0,1990	-	0,0220	-	0,0280
OA	0,3711	0,3261	0,3180	0,2247	0,2322	0,2405	0,2269	0,2079	0,2188	0,2051	0,2225	0,2435	-	0,3763	0,4010	-
OC	0,5875	0,5368	0,5426	0,5158	0,5126	0,5184	0,5358	0,5632	0,5762	0,5152	0,5537	0,5227	-	0,6620	0,6553	0,6870





**Figure 72** – Arbres de Neighbor-joining non enracinés et inférés à partir des distances génétiques de Nei (1972) sur les populations d'*Ostrea edulis* et la population d'*O. angasi*, à partir du génotypage : **A)** des 7 marqueurs microsatellites ; **B)** des 208 marqueurs SNP. La robustesse des nœuds a été testée par 100 bootstrap ; seules les valeurs supérieures à 80 sont reportées sur l'arbre. Les cercles de couleur regroupent les populations situées dans la même mer (ou océan). **OA** est situé dans la Mer de Tasmanie.

La structure des populations a également été étudiée par une analyse factorielle des correspondances (AFC) [Figure 73].



**Figure 73** – AFC sur les fréquences alléliques des populations naturelles de *O. edulis* et de la population *O. angasi* pour : **A)** les 7 marqueurs microsatellites; **B)** les 208 SNP. Les cercles de couleur regroupent les populations situées dans la même mer (ou océan) : **Mer du Nord**, **Océan Atlantique**, **Mer Méditerranée Ouest**, **Mer Méditerranée Est et Mer Noire**, **Mer de Tasmanie**. Les populations Italie (It) et Portugal (Po) sont indiquées de couleur rouge car elles ne sont pas attendues dans ces groupes.

Pour l'analyse à partir des microsatellites, les axes 1 et 3 ont été choisis pour la représentation car les axes 1 et 2 expliquaient la différenciation entre *O. edulis* et *O. angasi*. De même, pour

les SNP, les axes 2 et 3 ont été choisis pour la représentation car les axes 1 et 2 expliquaient la différenciation entre *O. edulis*/*O. angasi* et *O. chilensis*; et les axes 1 et 3 expliquaient la différenciation entre *O. edulis* et *O. angasi*.

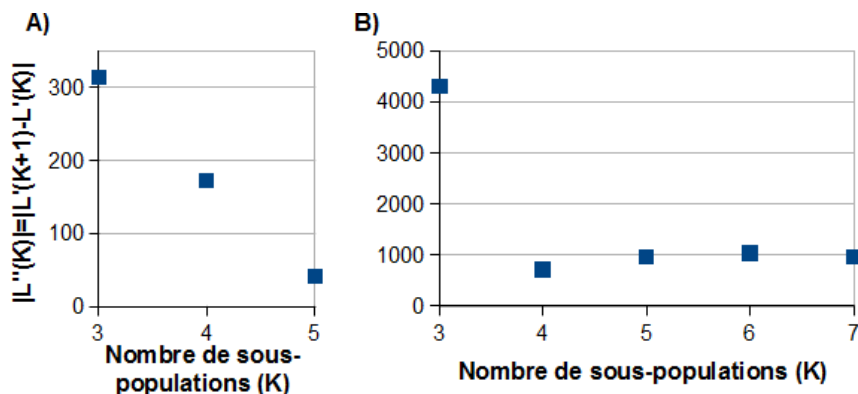
Les deux axes de l'AFC expliquent respectivement un total de 29,26 % pour les microsatellites, et de 32,91 % pour les SNP, de la variance de fréquences alléliques entre les différentes populations *O. edulis* et la population *O. angasi*. Lorsque l'on retire les individus *O. angasi* du jeu de données, les résultats de l'AFC sont sensiblement les mêmes et les axes expliquent la variance respectivement à hauteur de 31,12 % pour les microsatellites, et de 61,97 % pour les SNP.

Quatre groupes de populations sont observés avec les microsatellites et cinq groupes avec les SNP. Dans les deux jeux de données, les mêmes populations sont regroupées entre elles, sauf pour les populations de Mer du Nord (Norvège, Danemark, Pays-Bas) qui sont individualisées avec les SNP, alors qu'avec les microsatellites, elles sont regroupées avec les populations de l'Océan Atlantique. Avec les microsatellites, les populations de Grèce, Turquie et Ukraine semblent fortement différenciées entre elles, et avec les autres populations. Avec les données SNP, ces populations (Turquie et Ukraine) forment un groupe moins différencié. Avec le même jeu de données, la population de l'île d'Aix est excentrée des autres populations de l'Océan Atlantique. D'autre part, la population d'Italie est systématiquement regroupée avec les populations de l'Océan Atlantique, et la population du Portugal est regroupée avec celles de Méditerranée Ouest.

Pour finir, la structure des populations a également été inférée par une méthode bayésienne implémentée dans le logiciel STRUCTURE, à partir des données de génotypes. Dans le cas où les populations naturelles d'*O. edulis* ne sont pas structurées, on s'attend à un minimum de 2 groupes bien distincts. Étant donné que 4 groupes réunissant plusieurs populations d'*O. edulis* ont été identifiés avec l'AFC et l'arbre de Neighbor-Joining, pour les microsatellites, nous avons choisi de tester un modèle allant de 2 à 5 sous-populations.

Étant donné que l'AFC basée sur les marqueurs SNP a mis en évidence une possible différenciation de la population de l'île d'Aix, vis-à-vis des autres populations de l'Atlantique, et du fait qu'une population *O. chilensis* fait partie du jeu de données, nous avons choisi de tester l'existence de 2 sous-populations supplémentaires. Pour cela, un modèle allant de 2 à 7 sous-populations a été testé pour les marqueurs SNP.

Le nombre le plus probable de groupes génétiques a été estimé à partir du taux de changements de second ordre du logarithme des probabilités *a posteriori* entre les valeurs successives de K (Evanno *et al.*, 2005). Cette valeur est maximale pour K = 3 sous-populations, quel que soit le type de marqueurs utilisés [Figure 74].



**Figure 74** – Changements de second ordre du logarithme de probabilité ( $|L''(K)| = |L'(K+1) - L'(K)|$ ) pour les  $K$  sous-populations inférées avec le logiciel STRUCTURE, pour : **A)** Les données microsatellites ; **B)** Les données SNP ; après 10 répétitions de l'estimation.

Les diagrammes obtenus avec les deux jeux de données (microsatellites et SNP), pour  $K = 3$  sous-populations, sont présentés en **Figure 75**.

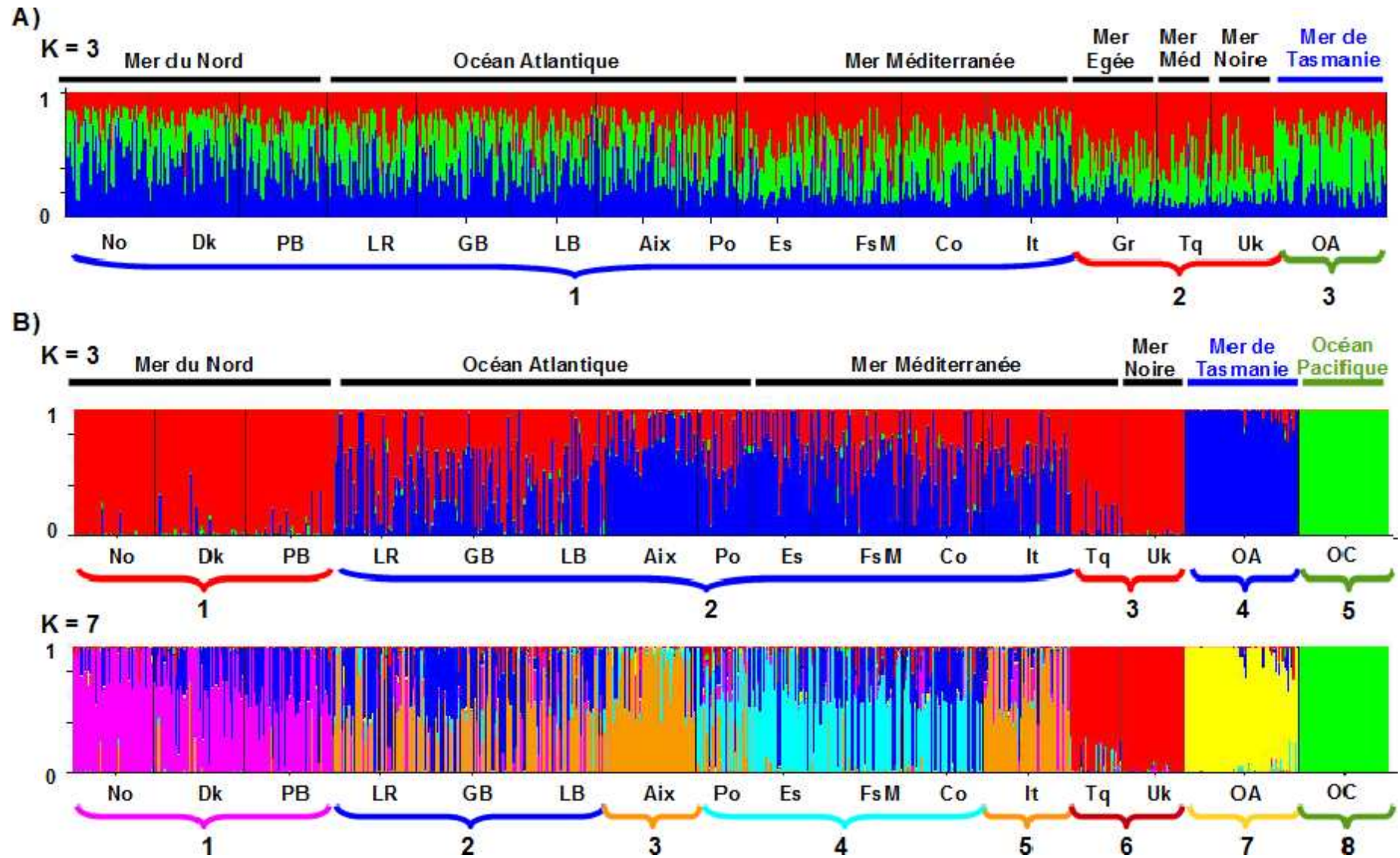
Avec les microsatellites, l'inférence avec 3 sous-populations permet de distinguer dans un premier groupe les populations de Mer du Nord, de l'Océan Atlantique et de Mer Méditerranée Ouest ; dans un second groupe les populations de Mer Égée, de Mer Méditerranée Est et de Mer Noire ; dans un troisième groupe l'huître plate australienne *Ostrea angasi*.

Avec les marqueurs SNP, bien que le nombre de 3 sous-populations soit celui qu'il faille choisir selon la méthode de [Evanno et al. \(2005\)](#), cette inférence permet de distinguer non pas trois mais plutôt cinq groupes de populations. Dans un premier groupe on distingue les trois populations de Mer du Nord, puis dans un deuxième groupe on distingue à la fois les populations de l'Océan Atlantique et de Mer Méditerranée Ouest et centre. Dans un troisième groupe, on distingue les populations de Mer Méditerranée Est et de Mer Noire. Dans le quatrième et le cinquième groupes, on distingue respectivement *O. angasi* puis *O. chilensis*. Cette analyse met en évidence une forte similitude entre les groupes 1 et 3.

Malgré le fait que l'on distingue davantage de groupes, les inférences pour  $K = 4$  et  $K = 5$  n'apportent pas davantage d'informations. Dans le cas où la valeur du logarithme des probabilités *a posteriori* continue d'augmenter avec la valeur de  $K$ , par exemple dans le cas d'un isolement par la distance, il s'avère nécessaire de choisir  $K$  en fonction de la valeur qui capture le plus de structure, tout en restant biologiquement probable ([Pritchard et al., 2000](#)). Cette situation est rencontrée pour l'inférence  $K = 7$  sous-populations.

Pour  $K = 7$ , nous avons bien un total de sept groupes qui s'individualisent. Dans le premier groupe, on distingue toujours les trois populations de Mer du Nord. Dans le second groupe, on distingue dorénavant les populations de La Rance, d'Angleterre et de Larmor Baden, situées toutes les trois dans l'Océan Atlantique. Dans le troisième groupe, on distingue à la fois la population de l'île d'Aix (Océan Atlantique) et celle d'Italie (Mer Méditerranée centre). Dans le quatrième groupe, on regroupe les populations du Portugal (Océan Atlantique), d'Espagne et Fos-sur-Mer

et de Corse (Mer Méditerranée Ouest). Dans le cinquième groupe, on regroupe les populations de Turquie (Mer Méditerranée Est) et d'Ukraine (Mer Noire). Dans le sixième et le septième groupes, on distingue respectivement *O. angasi* puis *O. chilensis*.



**Figure 75** – Résultats du logiciel STRUCTURE pour : **A)** les marqueurs microsatellites ; **B)** les marqueurs SNP.  $K$  : nombre de sous-populations inférées. Les accolades et les nombres sous les diagrammes distinguent les différents groupes visuellement discernables.

De façon générale, une certaine congruence peut être observée entre les résultats des différentes analyses. Les trois méthodes ont ainsi révélé une structure génétique des populations de *O. edulis*, par regroupement des populations situées dans la même mer ou le même océan, exceptées pour les populations d'Italie et de l'île d'Aix qui présentent un génotype atypique. Ces deux populations sont situées dans des bassins ostréicoles importants où il est délicat d'identifier des gisements naturels. Étant donné que nous ne pouvons écarter l'hypothèse d'une conséquence des transferts d'huîtres entre les deux bassins (cf. Discussion ci-après), ces deux populations « atypiques » n'ont pas été utilisées pour la détection de signatures de la sélection. La population du Portugal, étant souvent très proche des populations de Méditerranée Ouest, elle a été classée dans ce groupe.

Pour la recherche de signatures de la sélection, on distinguera les quatre groupes suivants :

- Mer du Nord : Norvège, Danemark, Pays-Bas ;
- Océan Atlantique : La Rance, Angleterre, Larmor Baden ;
- Mer Méditerranée Ouest : Portugal, Espagne, Fos-sur-Mer, Corse ;
- Mer Méditerranée Est et Mer Noire : Turquie, Ukraine.

### V.3.3.3 Signatures de la sélection

Après avoir retiré les populations Italie, île d'Aix, *O. angasi* et *O. chilensis* du jeu de données, 3 marqueurs SNP se sont révélés monomorphes pour les douze populations à analyser et ont donc été retirés. Au final, la détection de signatures de la sélection a été effectuée sur un total de 205 marqueurs SNP.

La recherche de marqueurs sous sélection a été effectuée à l'échelle de l'ensemble des 12 populations *O. edulis*, ainsi qu'à l'échelle de chacun des quatre groupes structurés identifiés précédemment (Mer de Nord ; Océan Atlantique ; Mer Méditerranée Ouest ; Mer Méditerranée Est et Mer Noire). D'autre part, cette recherche a également été effectuée entre les groupes structurés adjacents, en regroupant ou non les populations d'un même groupe. Au total, quatre types de comparaisons ont ainsi été effectués :

- entre les 12 populations (sans tenir compte des groupes) ;
- au sein de chaque groupe : par exemple, pour le groupe de la Mer du Nord, les 3 populations de Norvège, Danemark et Pays-Bas ont été comparées entre-elles ;
- entre deux groupes structurés géographiquement adjacents, sans regrouper les populations : par exemple, entre Mer du Nord (3 populations) et Atlantique (3 populations), on compare simultanément les 6 populations sans tenir compte de leur appartenance à un des deux groupes ;
- entre deux groupes structurés géographiquement adjacents, en regroupant les populations : par exemple, entre Mer du Nord (3 populations) et Atlantique (3 populations), on regroupe les populations de chacun des deux groupes, sans les distinguer, puis on compare les deux regroupements.

Les résultats de la recherche de marqueurs sous sélection sont présentés dans la **Table 31**. Au

total, parmi les 205 marqueurs testés avec le logiciel BayeScan, 67 SNP (32,7 %) ont été identifiés outliers, dont 45 (21,9 %) sous sélection positive divergente et 22 (10,7 %) sous sélection balancée ou purifiante. Tous les outliers identifiés par comparaisons entre les groupes structurés, ou entre les populations au sein d'un même groupe, sont des marqueurs sous sélection positive divergente. Parmi ces marqueurs, 34 SNP ont été identifiés sur plus d'une comparaison.

**Table 31** – Résultats de la détection de marqueurs SNP sous sélection chez l'huître plate européenne, avec le logiciel BayeScan. Les 12 populations analysées sont séparées en 4 groupes structurés. Sur la diagonale (fond gris), la détection a été faite entre les populations de chacun des groupes structurés. La matrice supérieure présente les résultats des comparaisons des populations entre les groupes structurés géographiquement adjacents. La matrice inférieure présente les résultats des comparaisons entre groupes géographiquement adjacents (1 groupe = 1 population). Les résultats sont donnés sous la forme : a/b (c) avec : a : nombre d'outliers au seuil de détection de faux positifs (FDR) de 0,01 ; b : nombre d'outlier au seuil FDR = 0,05 ; \* : FDR = 0,10 ; c : indice  $F_{ST}$ . Les outliers détectés entre populations et/ou groupes sont sous sélection positive divergente.

	Mer du Nord	Atlantique	Méditerranée Ouest	Méditerranée Est / Mer Noire
<b>Nb individus – Nb loci</b>	144 - 202	152 – 204	159 – 204	64 – 189
<b>Mer du Nord</b>	0/1 (0,0162)	22/25 (0,0487)	-	-
<b>Atlantique</b>	0/0 (0,0643)	0/1* (0,0083)	9/10 (0,0324)	-
<b>Méditerranée Ouest</b>	-	0/2 (0,0348)	0/1* (0,0204)	19/22 (0,1011)
<b>Méditerranée Est / Mer Noire</b>	-	-	0/0 (0,1602)	0/0 (0,0222)
<b>Total 12 populations</b>		519 – 208 (0,0969)		
sélection diversifiante			32/35	
sélection balancée			9/22	

L'étude simultanée des 12 populations a permis d'identifier 57 outliers au seuil FDR = 0,05 et 41 outliers au seuil FDR = 0,01. Sur l'ensemble des populations, le niveau de différenciation est égal à 0,10.

Chacun des groupes structurés présente entre zéro et un marqueur sous sélection au seuil de faux positifs FDR = 0,05 (Mer du Nord) ou FDR  $\approx$  0,10 (Atlantique, Méditerranée Ouest) ; aucun outlier ne subsiste au seuil FDR = 0,01. Les valeurs de différenciation au sein de ces groupes sont comprises entre  $F_{ST}$  = 0,0083 et 0,0222.

Entre les groupes adjacents avec regroupements des populations, seuls deux outliers ont été identifiés au seuil FDR = 0,05 pour la comparaison Atlantique vs. Méditerranée Ouest. Pour les deux autres comparaisons, aucun outlier n'a été détecté.

En comparant simultanément toutes les populations des groupes adjacents, de 10 à 25 outliers ont été identifiés au seuil FDR = 0,05 et de 9 à 22 outliers au seuil FDR = 0,01.

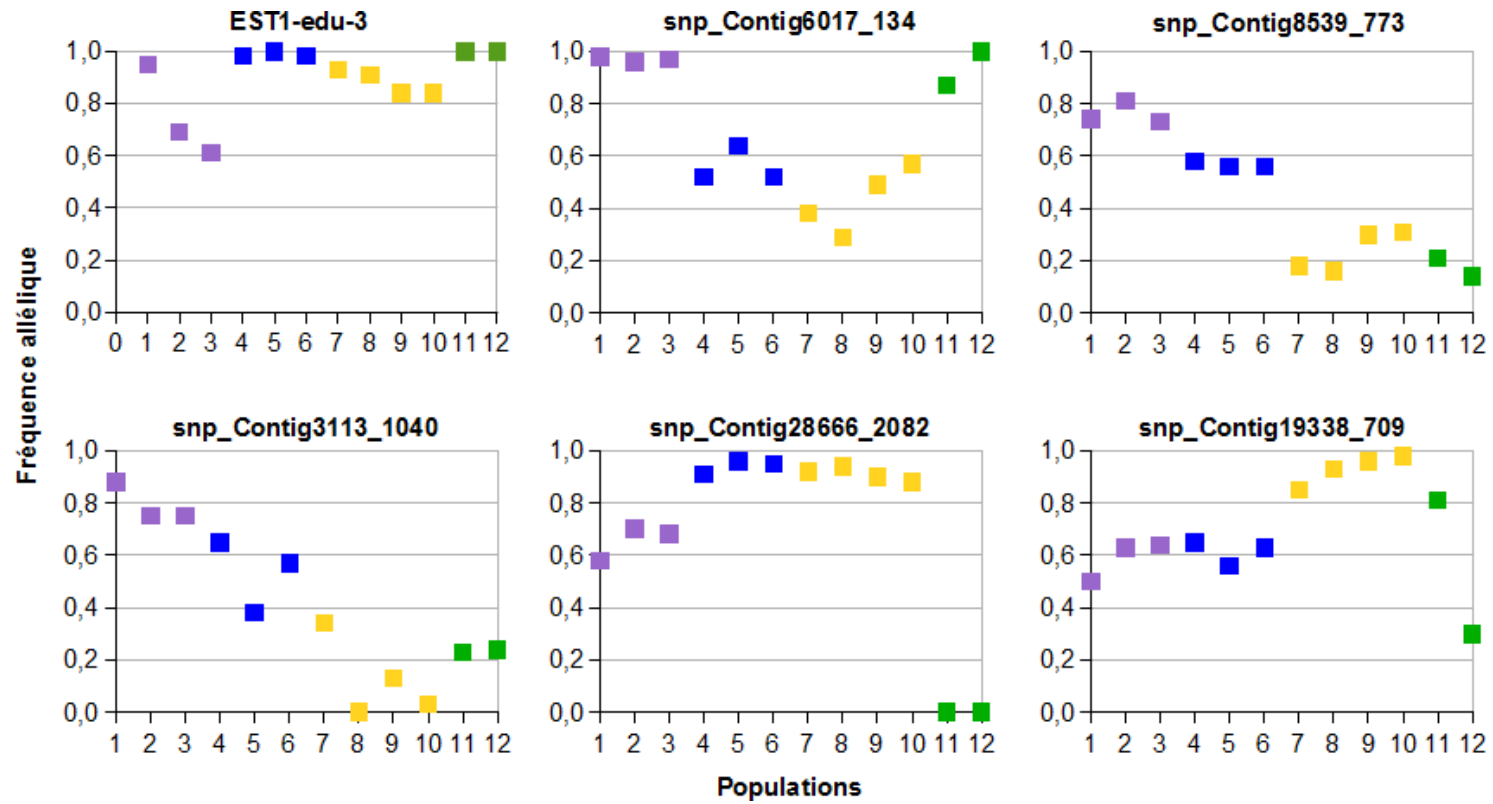
Pour les deux types de comparaisons, le niveau de différenciation entre les groupes Atlantique et Méditerranée Ouest est plus faible ( $F_{ST}$  = 0,03) qu'entre la Mer du Nord et l'Atlantique ( $F_{ST}$  = 0,05 à 0,06), ou qu'entre la Méditerranée Ouest et la Méditerranée Est et la Mer Noire ( $F_{ST}$  = 0,10 à 0,16).



Le  $F_{ST}$  global est divisé par deux lorsque les 45 marqueurs sous sélection positive divergente sont retirés ( $F_{ST} = 0,045$ ;  $IC_{95} \% = [0,038 - 0,052]$ ). Il augmente légèrement lorsque l'on retire également les 22 marqueurs sous sélection balancée ou purifiante ( $F_{ST} = 0,052$ ;  $IC_{95} \% = [0,045 - 0,060]$ ).

L'analyse de la distribution des fréquences alléliques des 34 marqueurs sous sélection positive divergente, identifiés dans plus d'une comparaison, a permis d'identifier six profils alléliques différents [**Figure 76**] :

- 16 outliers dont EST1-edu-3 présentent un isolement du groupe Mer du Nord. Cette barrière au flux de gène est située au niveau du Pas de Calais.
- 14 outliers dont snp\_Contig6017\_134 présentent un isolement des populations situées aux extrémités de l'aire de distribution : Mer du Nord et Mer Noire.
- 3 outliers dont snp\_Contig8539\_773 présentent une barrière aux flux de gènes entre le groupe Atlantique et le groupe Méditerranée Ouest.
- 14 outliers dont snp\_Contig3113\_1040 présentent un profil d'isolement par la distance de la Mer du Nord à l'Est de la Mer Méditerranée.
- 14 outliers dont snp\_Contig28666\_2082 présentent une barrière aux flux de gènes entre la Corse (Méditerranée Ouest) et la Turquie (Méditerranée Est).
- 3 outliers dont snp\_Contig19338\_709 présentent une barrière aux flux de gènes entre la Turquie et l'Ukraine, au niveau du détroit des Dardanelles ou du Bosphore.



**Figure 76** – Fréquence de l'allèle majoritaire de 6 marqueurs SNP chez 12 populations naturelles de l'huître plate européenne. Les couleurs indiquent les populations des quatre groupes structurés : Mer du Nord, Océan Atlantique, Mer Méditerranée Ouest, Mer Méditerranée Est et Mer Noire.

### V.3.4 Discussion

La présente étude consistait en une analyse spatiale de la diversité génétique de l'huître plate européenne *Ostrea edulis*, sur 15 populations naturelles réparties sur l'ensemble de son aire de distribution européenne. Il s'agissait d'une part d'identifier une éventuelle structuration de ces populations, et d'autre part de détecter de potentielles signatures de sélection et d'adaptation locale. Pour cela, deux types de marqueurs moléculaires ont été utilisés, des marqueurs microsatellites et des marqueurs SNP couvrant l'ensemble du génome nucléaire de l'huître plate européenne.

#### V.3.4.1 Diversité et différenciation

Trois espèces d'huîtres plates ont été analysées dans la présente étude. Bien que les marqueurs SNP aient été développés à partir du transcriptome d'huîtres plates européennes, du polymorphisme a été détecté chez l'huître plate australienne *Ostrea angasi*, espèce phylogénétiquement proche de *Ostrea edulis* (Danic-Tchaleu *et al.*, 2011). Par contre, aucun polymorphisme n'a été détecté chez l'huître plate chilienne *Ostrea chilensis* qui est phylogénétiquement plus éloignée de *O. edulis* (Danic-Tchaleu *et al.*, 2011). Chez *Ostrea angasi*, sur les 208 SNP amplifiés, seuls 168 marqueurs se sont révélés polymorphes dont 6 SNP *in vitro*. Chez *Ostrea chilensis*, 159 SNP ont été amplifiés avec succès mais ils ont tous été identifiés monomorphes, exceptés deux marqueurs potentiellement polymorphes (1 seul individu concerné), dont 1 SNP *in vitro*. Ainsi, les SNP développés dans le cadre de ce travail de thèse s'avèrent utilisables à la fois pour caractériser les populations de l'huître plate européenne et celles de l'huître plate australienne. Ce résultat confirme la proximité génétique de ces deux espèces d'huîtres plates, et confirme un isolement génétique important avec l'huître plate chilienne.

Globalement, la diversité génétique des populations de *O. edulis* augmente le long de la ligne de côte, de la Norvège (Mer du Nord) à Fos-sur-Mer (Mer Méditerranée Ouest). Plusieurs hypothèses ont été évoquées par le passé pour expliquer la moindre diversité observée notamment en Mer du Nord. Une première hypothèse résidait dans une diminution de la diversité suite à des épisodes d'épizooties, de sur-exploitation des bancs naturels ou d'homogénéisation génétique suite à des transferts d'animaux entre sites (Magennis *et al.*, 1983; Johannesson *et al.*, 1989; Saavedra *et al.*, 1995). Une deuxième hypothèse résidait dans la conséquence de la faible température de l'eau en période estivale qui empêcherait alors la reproduction des huîtres, la plupart des années (comm. pers. citée dans Johannesson *et al.*, 1989). Cependant, ces hypothèses sont peu probables en raison notamment de l'absence de détection des parasites responsables des principales phases de déclin de *O. edulis* (*Bonamia* sp., *Martelia refringens*) au Danemark et également dans la population Norvégienne étudiée (<http://web.oie.int/wahis/>). Ces hypothèses sont également peu probables en raison du fait que les populations d'Atlantique ont elles aussi été touchées par les épizooties, ainsi que certaines régions Méditerranéennes [cf. **Partie I.2.2**]. La deuxième hypothèse est plus difficile à réfuter, même si l'on peut supposer que les huîtres installées en Scandinavie se soient progressivement adaptées au milieu environnemental, et notamment aux faibles températures, pour leur maintien et leur reproduction.

Dans la présente étude, la diversité et le niveau de différenciation estimés avec les marqueurs microsatellites sont systématiquement plus faibles que ceux estimés avec les marqueurs SNP. Sur l'ensemble des populations *O. edulis* étudiées, le niveau de différenciation global ( $F_{ST}$ ) est de 0,088 pour l'estimation basée sur les SNP et de 0,019 pour celle basée sur les microsatellites. Ces valeurs sont respectivement équivalentes à celles rencontrées lors de l'étude de 16 allozymes et de 5 microsatellites chez *O. edulis* (Saavedra *et al.*, 1993; Launey *et al.*, 2002).

Les différences observées entre les deux types de marqueurs sembleraient s'expliquer par l'usage d'un estimateur inadapté de la différenciation (Jost, 2008). Ainsi, même si le taux de mutations des marqueurs microsatellites est supérieur à celui des allozymes, et donc que l'on s'attend logiquement à identifier un niveau de différenciation plus élevé avec les microsatellites, le phénomène opposé est souvent observé (*i.e.*, une différenciation plus faible avec les microsatellites).

Par ailleurs, les marqueurs SNP suggèrent que toutes les populations d'*O. edulis* étudiées sont proches de la panmixie, exceptée la population de Larmor Baden, alors que les microsatellites suggèrent que 11 des 15 populations présentent un déficit significatif en hétérozygotes. Un déficit en hétérozygotes est souvent observé chez les populations de bivalves marins, et a systématiquement été identifié lors des études de diversité chez *O. edulis* basées sur des marqueurs microsatellites (Launey *et al.*, 2002; Sobolewska and Beaumont, 2005). Ce déficit s'explique généralement soit par la démographie (effet Wahlund, mode de reproduction, consanguinité), soit par la sélection, ou encore par des artefacts techniques (allèles nuls). Dans le cas présent, le déficit est presque exclusivement observé lors de l'analyse avec les marqueurs microsatellites; marqueurs connus pour être souvent sujets aux allèles nuls.

Cependant, quel que soit le type de marqueurs utilisés, une analyse d'isolement par la distance a permis de confirmer la corrélation entre distances génétiques (indice  $F_{ST}$ ) et distances géographiques (en kilomètres). Cette corrélation avait déjà été mise en évidence dans le cadre de plusieurs études de diversité menées sur *O. edulis* à partir de marqueurs de types allozymes (Saavedra *et al.*, 1993, 1995), microsatellites (Launey *et al.*, 2002) et mitochondrial (Diaz-Almela *et al.*, 2004).

#### V.3.4.2 Structure des populations

Pour les marqueurs SNP, l'analyse des fréquences alléliques et des génotypes a permis d'identifier une structuration des populations en quatre grands groupes. Chacun de ces quatre groupes réunit les populations naturelles de *O. edulis* situées simultanément dans la même mer ou le même océan : 1- Mer du Nord ; 2- Océan Atlantique ; 3- Mer Méditerranée Ouest ; 4- Mer Méditerranée Est et Mer Noire. Cette structure apparente semble particulièrement robuste puisqu'elle a été mise en évidence dans chacune des trois analyses effectuées, que ce soit avec l'arbre de Neighbor-joining basé sur les distances génétiques de Nei (1972), l'analyse factorielle des correspondances basée sur les fréquences alléliques, ou encore la méthode d'inférence Bayésienne implémentée dans le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) et basée sur les génotypes à plusieurs loci. Le niveau de différenciation ( $F_{ST}$ ) entre ces groupes, considérés deux à deux, varie de 0,03 à 0,16.

L'analyse basée sur les marqueurs microsatellites n'a, quant à elle, pas permis de différencier les populations de la Mer du Nord de celles de l'Atlantique.

Dans chacune des analyses, les populations d'Italie et de l'île d'Aix présentaient une classification particulière et inattendue. En effet, la population d'Italie semblait génétiquement proche des populations d'Atlantique notamment de l'île d'Aix, qui elle-même semblait relativement différenciée des autres populations d'Atlantique. Une hypothèse pour expliquer ces particularités réside dans le fait qu'il peut s'agir d'une conséquence des activités humaines, notamment par le transfert d'huîtres entre bassins aquacoles (Johannesson *et al.*, 1989; Saavedra *et al.*, 1993). En effet, même si les données officielles concernant les transferts de coquillages sont peu fiables, Paquotte (1986) rapporte des transferts d'huîtres creuses entre la France et l'Italie, et notamment la lagune de Venise. Il est ainsi possible que des huîtres plates aient également été transférées, en même temps que les huîtres creuses. Aucune donnée n'indique le(s) site(s) français concerné(s), mais il est fort probable qu'il s'agisse du bassin de Marennes-Oléron, à proximité de l'île d'Aix, étant donné l'importance de ce bassin dans la production ostréicole française. Afin de ne pas fausser l'identification de la structure génétique chez *O. edulis*, ces deux populations ont été exclues de l'analyse de détection des marqueurs outliers.

Par le passé, plusieurs études ont été réalisées afin d'identifier une structure au sein des populations de *O. edulis*, notamment afin d'estimer l'intérêt d'un programme de conservation et d'estimer l'impact de l'aquaculture (Sobolewska and Beaumont, 2005; Beaumont *et al.*, 2006). Ces études avaient mis en évidence une différenciation plus prononcée entre les huîtres plates de Norvège vis à vis de celles des Pays-Bas et de Bretagne d'une part ( $F_{ST} = 0,052-0,056$ ), et d'Écosse d'autre part ( $F_{ST} = 0,137$ ). Dans la présente étude, les populations de Hollande et de Norvège sont rassemblées dans un même groupe dont le niveau de différenciation intra-groupe (en incluant la population du Danemark) est de 0,016 soit d'un ordre de grandeur cinq à dix fois plus faible.

### V.3.4.3 Signatures de la sélection

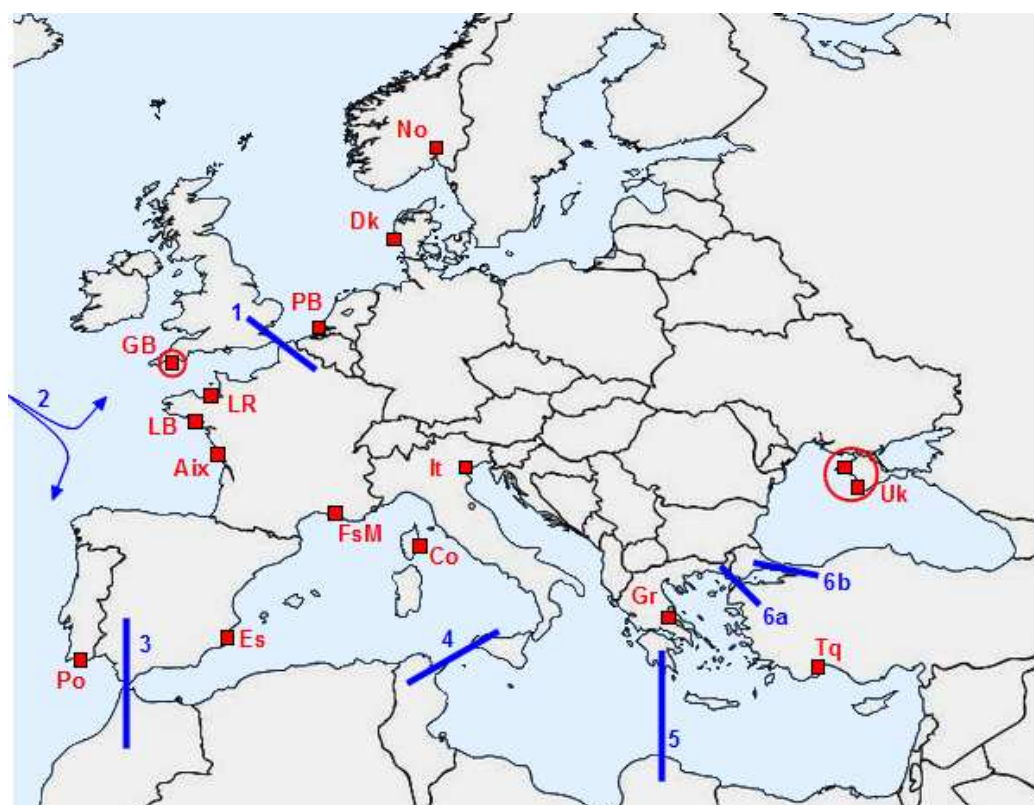
Afin d'identifier de potentielles signatures de la sélection naturelle, l'analyse avec le logiciel BayeScan a été effectuée sur le jeu de données des SNP, à partir de la structure populationnelle identifiée précédemment. C'est-à-dire que seules les populations peu différenciées au sein d'un même groupe ont été conservées pour la détection des marqueurs outliers. Quatre groupes ont été considérés : 1- Mer du Nord, regroupant les populations de Norvège, du Danemark et des Pays-Bas ; 2- Océan Atlantique, regroupant les populations de La Rance, d'Angleterre et de Larmor Baden ; 3- Mer Méditerranée Ouest, regroupant les populations du Portugal, d'Espagne, de Fos-sur-Mer et de Corse ; 4- Mer Méditerranée Est et Mer Noire, regroupant les populations de Turquie et d'Ukraine.

Au total, 32,7 % (67/205) des marqueurs SNP analysés présentaient, sur au moins une comparaison, une valeur de  $F_{ST}$  plus forte ou plus faible que celles attendues sous le modèle de neutralité. Cette proportion est plus élevée que celles rencontrées dans la plupart des études de l'ordre de

0,4 à 24,5 % de marqueurs outliers, avec une moyenne à 8,5 % (Nosil *et al.*, 2009). Parmi les marqueurs outliers identifiés ici, 67,2 % ( $n = 45$ ) apparaissent sous sélection positive divergente, et 32,8 % ( $n = 22$ ) sous sélection balancée ou purifiante. Le niveau de différenciation global sur les 12 populations naturelles étudiées est de 0,097. Lorsque les marqueurs sous sélection divergente sont retirés du jeu de données, ce niveau est divisé par deux ( $F_{ST} = 0,045$ ). Lorsque l'on retire également les marqueurs sous sélection balancée ou purifiante, le niveau de différenciation entre les 12 populations augmente ( $F_{ST} = 0,052$ ). Ainsi, il est probable que les marqueurs détectés sous sélection positive divergente soient impliqués dans la structuration spatiale de la diversité génétique des populations naturelles de l'huître plate européenne. Cette hypothèse est renforcée par la découverte d'un cline (variation continue) et de plusieurs discontinuités au sein de la distribution des fréquences de l'allèle majoritaire entre les populations, pour ces marqueurs outliers.

Le cline observé dans la distribution des fréquences alléliques à certains loci, de la Mer du Nord à l'Est de la Mer Méditerranée, illustre l'isolement par la distance précédemment détecté par le test de Mantel sur les distances géographiques mesurées le long des lignes de côtes.

Les discontinuités identifiées dans cette étude sont localisées entre deux groupes génétiques, au niveau de barrières biogéographiques connues chez d'autres espèces de mollusques ou de poissons [Figure 77].



**Figure 77** – Structuration géographique des populations naturelles de l'huître plate européenne. Les sites d'échantillonnage sont indiqués par des carrés rouges. Les cercles rouges indiquent les populations qui ont été regroupées pour les analyses. Les abréviations sont expliquées dans la **Table 27**. Les barrières biogéographiques potentielles sont représentées par des traits bleus munis d'un numéro. 1 : Pas de Calais ; 2 : Division du courant marin Nord Atlantique ; 3 : Détroit de Gibraltar ; 4 : Front Siculo-Tunisien ; 5 : Front Péloponnèse ; 6a : Détroit des Dardanelles ; 6b : Détroit du Bosphore.

Une première discontinuité a été identifiée entre les populations de la Mer du Nord (Norvège, Danemark, Pays-Bas) et les populations de l'Océan Atlantique (France, Angleterre). Elle correspond à une barrière semi-perméable aux flux de gènes et a déjà été identifiée, notamment chez le poisson goby (*Pomatoschistus microps*, Gysels *et al.*, 2004), au niveau de l'anse Southern Bight située entre la Manche et le sud de la Mer du Nord. Ce front correspond au Pas de Calais. En outre, la moindre diversité (richesse allélique, hétérozygotie) observée chez les populations de la Mer du Nord et particulièrement chez la population de Norvège pourrait être une signature de re-colonisation pendant une phase d'expansion suivant la dernière période glaciaire (Provan and Bennett, 2008).

D'autre part, les populations de Mer du Nord et celles de Mer Méditerranée Est et Mer Noire présentent un niveau de différenciation relativement similaire, par rapport aux autres populations (Atlantique et Mer Méditerranée Ouest). Ce phénomène est identifiable par deux discontinuités similaires dans la distribution des fréquences alléliques de plusieurs marqueurs moléculaires. Ce rapprochement entre les populations de ces deux zones a également été mis en évidence lors de l'identification de la structure des populations naturelles de *O. edulis* avec les marqueurs SNP, selon la méthode de l'AFC, mais également selon l'arbre de Neighbor-Joining et selon l'inférence à trois sous-populations avec le logiciel STRUCTURE.

Un phénomène identique entre une population de Norvège et une population d'Ukraine avait déjà été identifié avec un marqueur mitochondrial (Diaz-Almela *et al.*, 2004). Plusieurs hypothèses avaient alors été formulées : 1- la possibilité d'un génotype ancestral qui serait devenu dominant de façon indépendante dans les deux populations, après la dernière période glaciaire ; 2- une adaptation convergente à des conditions écologiques similaires, telle qu'une faible salinité ; 3- une conséquence de transferts anthropogéniques d'animaux entre les deux zones géographiques.

Une seconde discontinuité dans les fréquences alléliques suggère l'existence d'une barrière géographique entre les populations du groupe Atlantique (La Rance, Angleterre, Larmor Baden) d'une part et les populations du groupe Méditerranée Ouest (y compris le Portugal) et Méditerranée Est ainsi que Mer Noire d'autre part. Cette discontinuité, peu évoquée dans les études de diversité, pourrait être due à la division du courant marin Nord Atlantique au large de la péninsule ibérique. Un effet similaire a déjà été évoqué chez *O. edulis* pour expliquer la répartition unidirectionnelle de certains haplotypes à partir du Nord Ouest de l'Espagne vers la Mer Méditerranée, et ceci à travers le détroit de Gibraltar (Saavedra *et al.*, 1993).

Une troisième discontinuité biogéographique a déjà été suggérée chez *O. edulis* au niveau du Déroit de Gibraltar (Saavedra *et al.*, 1993, 1995). Dans la présente étude, seul un marqueur semble potentiellement étayer cette hypothèse. Il est ainsi possible que cette potentielle barrière aux flux de gènes soit semi-perméable et n'ait pas un rôle prépondérant dans la structuration génétique des populations de *O. edulis*. Cette barrière biogéographique a également été testée et identifiée chez une ophiure (*Ophioderma longicauda*, Boissin *et al.*, 2011). Cependant, dans la plupart des études de diversité effectuées dans la région atlantico-méditerranéenne, il semble que le

front Almería-Oran soit la cause la plus probable de la structure observée (revue dans [Patarnello et al., 2007](#)). Dans la présente étude, la proximité génétique entre la population du Portugal et celles de l'Espagne, de Fos-sur-Mer et de Corse suggère que ce front ne soit pas impliqué dans la structure des populations de *O. edulis*.

Une quatrième discontinuité majeure a été identifiée entre les populations de l'Ouest de la Méditerranée et celles de l'Est de la Méditerranée (Turquie) ainsi que la Mer Noire (Ukraine). Dans la littérature, deux barrières biogéographiques sont potentiellement évoquées. La plus à l'ouest est située au niveau du front Siculo-Tunisien et est notamment impliquée dans la structuration des populations du bar (*Dicentrarchus labrax*, [Bahri-Sfar et al., 2000](#)), de la coque (*Cerastoderma glaucum*, [Tarnowska et al., 2010](#)) et de la palourde (*Ruditapes decussatus*, [Gharbi et al., 2011](#)). La seconde, située au niveau du front de la Mer Égée et de la Mer Cyrénaïque (*break Peloponnese*), dans la région Ponto-Caspienne, a également été évoquée chez la coque ([Nikula and Väinölä, 2003](#); [Tarnowska et al., 2010](#)), chez l'ophiure (*Ophioderma longicauda*, [Boissin et al., 2011](#)) et chez la demoiselle bleue (*Chromis chromis*, [Domingues et al., 2005](#)).

Dans le cadre de cette étude, il n'est pas possible d'affirmer que la structure observée soit due au front Siculo-Tunisien plutôt qu'à celui du Péloponnèse, ou vice et versa. En effet, la population de Grèce n'a pu faire partie de l'analyse des marqueurs sous sélection, à cause de la faible qualité des échantillons de tissus qui n'a pas permis d'obtenir un signal correct pour le génotypage des SNP, et ceci malgré plusieurs extractions ADN et deux tentatives de génotypage. Cependant, les analyses sur la structure des populations de *O. edulis* (AFC, arbre de Neighbor-joining, méthode Bayésienne) ont permis de rapprocher génétiquement la population grecque des populations de Turquie et d'Ukraine. Ces analyses ont également permis de rapprocher la population d'Italie des populations de l'Atlantique plutôt que de la Grèce et de la Turquie. Aussi, la discontinuité observée dans la distribution des fréquences alléliques entre le groupe Méditerranée Ouest d'une part et Méditerranée Est et Mer Noire d'autre part est probablement à positionner au niveau du front Péloponnèse.

Mais il est également possible que la proximité génétique entre la population d'Italie et celles de la côte Atlantique, notamment de l'île d'Aix, soit due à un contact secondaire lié aux activités humaines. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, des transferts d'huîtres ont eu lieu, par le passé, entre les deux régions ([Paquotte, 1986](#)). Les résultats de l'inférence à 7 sous-populations avec le logiciel STRUCTURE ([Pritchard et al., 2000](#)) suggèrent une origine commune des génotypes entre ces deux régions, et une propagation de ces génotypes vers les populations Atlantique échantillonnées plus au Nord. Une hypothèse pour expliquer cette structure réside dans l'isolement de la population de l'île d'Aix, ainsi qu'une origine charentaise des génotypes présents chez la population italienne. Malheureusement, un défaut d'échantillonnage dans le Golfe de Gascogne ne permet pas de tester l'hypothèse d'un isolement génétique des Pertuis charentais, ni même de tester une éventuelle propagation des génotypes vers des populations situées plus au Sud (Golfe de Gascogne, Nord et Ouest du Portugal), afin de faire la jonction avec la population échantillonnée au Sud du Portugal (Formosa), sous le modèle d'isolement par la distance. Une autre hypothèse réside dans l'isolement génétique de la population italienne entre le front Siculo-Tunisien et le



front Péloponnèse. Dans ce cas, la proximité génétique avec la population de l'île d'Aix s'expliquerait par des transferts d'huîtres en provenance d'Italie, vers les pertuis charentais, avec une dispersion des génotypes italiens vers les populations de l'Atlantique Nord, sous l'effet du courant marin Nord Atlantique.

Une cinquième discontinuité majeure dans la distribution des fréquences alléliques a été identifiée entre l'Est de la Méditerranée (Turquie) et la Mer Noire (Ukraine). Cette discontinuité a déjà été identifiée chez *O. edulis* (Saavedra *et al.*, 1993), chez du zooplancton (*Sagitta setosa*, Peijnenburg *et al.*, 2004) et chez la coque (Tarnowska *et al.*, 2010), et a été attribuée à l'ouverture du détroit entre la Mer Égée et la Mer Noire à la fin du Pliocène. La moindre diversité observée avec les marqueurs SNP chez la population *O. edulis* d'Ukraine pourrait alors s'expliquer par une colonisation post-glaciaire de la Mer Noire, puis par une réduction des flux de gènes au niveau de la Mer de Marmara par le Déroit des Dardanelles et/ou le Déroit du Bosphore.

Néanmoins, il est important de noter que le niveau de différenciation inter-populations reste relativement moyen ( $F_{ST} = 0,045$ ) lorsque l'on retire les marqueurs sous sélection positive divergente du jeu de données. Ainsi, il est possible que la sélection divergente ne suffise pas à expliquer la structure observée entre les populations de *O. edulis*. Finalement, il est possible que cette sélection divergente soit faible entre les sous-groupes de populations, et que d'autres formes de sélection non détectées puissent intervenir (ex. : sélection stabilisante).

D'autre part, au sein de chacun des groupes structurés, le niveau de différenciation est très faible mais significativement différent de zéro ( $F_{ST} = [0,008 ; 0,022]$ ). De plus, chacune des populations échantillonnées semble proche de l'équilibre de Hardy-Weinberg (en moyenne :  $F_{IS} = 0,013$ ). Ainsi, on peut considérer que chaque site échantillonné est le produit d'un événement de reproduction principalement panmictique (Bahri-Sfar *et al.*, 2000). Il est ainsi probable que chaque site puisse être considéré comme une population proche de l'équilibre, avec un flux génique minimal au sein des groupes identifiés, ne permettant pas à la différenciation génétique de s'accumuler. La sélection divergente serait alors très faible à l'échelle locale, c'est-à-dire au sein des groupes structurés. La structure observée dans la présente étude serait une conséquence des épisodes d'expansion et de contraction liés aux phénomènes glaciaires et géologiques anciens, suivi d'un isolement plus récent dû à l'émergence de barrières biogéographiques limitant les flux de gènes, et à des phénomènes d'adaptation aux facteurs environnementaux locaux (température, salinité, exondation, etc.).

### V.3.5 Conclusion et perspectives

La présente étude a permis d'identifier des discontinuités génétiques chez *Ostrea edulis*, malgré une distribution plus ou moins continue de cette espèce sur son aire de distribution et malgré ses grandes capacités de dispersion au stade larvaire.

Certaines de ces discontinuités avaient déjà été identifiées chez *O. edulis* (Saavedra *et al.*, 1993, 1995). De même, des discontinuités avaient déjà été identifiées chez d'autres bivalves marins tels que l'huître creuse américaine (*Crassostrea virginica*, Reeb and Avise, 1990) et la moule (*Mytilus*

*galloprovincialis*, Quesada *et al.*, 1995). Chez la moule, ces discontinuités ont été assimilées à une mosaïque de zones hybrides entre les espèces *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* (Bierne *et al.*, 2003a).

La détection de marqueurs sous sélection divergente chez *O. edulis* a permis d'identifier une possible structuration des populations naturelles en sous-groupes délimités par des barrières biogéographiques connues. Ces barrières biogéographiques ne sont pas uniquement des barrières aux flux de gènes, mais elles séparent également des habitats suffisamment divergents pour observer un phénomène de sélection positive divergente de part et d'autre de ces barrières (Quesada *et al.*, 1995).

Afin de confirmer ces hypothèses ainsi que l'effet, plus récent, de potentielles barrières aux flux de gènes, dans la structuration et la différenciation des populations naturelles de *Ostrea edulis*, il s'avère nécessaire d'étudier plus précisément l'histoire biogéographique de cette huître. Il s'avère notamment important de tester l'hypothèse d'une histoire commune des populations ou encore une adaptation convergente aux facteurs écologiques abiotiques (température, salinité, exondation, etc.) mais aussi biotiques (ex. : parasites, phytoplancton, compétiteur).

Chez les espèces aquacoles, la difficulté de ce type d'étude réside principalement dans l'identification de populations naturelles qui ne sont pas influencées génétiquement par les activités humaines. Il s'avère ainsi nécessaire de prendre en compte l'historique des transferts d'animaux entre bassins ostréicoles et gisements naturels. Malheureusement, la plupart des échanges à but aquacole ne sont pas officiels, ni même répertoriés ou documentés. Pour pouvoir tester différents scénarios, il s'avère alors nécessaire de disposer d'une bonne couverture de l'aire de distribution de l'espèce, notamment pour tester les scénarios sous le modèle d'isolement par la distance.

D'autre part, la présente étude a permis d'identifier un total de 34 marqueurs moléculaires comme de potentielles signatures de la sélection naturelle. Parmi eux, 4 SNP ont été développés directement sur la séquence de gènes connus [cf. **Partie III.2**] :

- EST1-edu-3 : Cytochrome oxydase 3, impliqué dans la respiration cellulaire. Une discontinuité dans la distribution des fréquences de l'allèle majoritaire est observée entre les populations du Sud de la Mer du Nord et celles d'Atlantique.
- EST10-edu-19 : Cytochrome b, impliqué dans la respiration cellulaire. Une discontinuité dans la distribution des fréquences de l'allèle majoritaire est observée entre les populations de l'Ouest de la Méditerranée d'une part et de l'Est de la Méditerranée et la Mer Noire d'autre part.
- EST43-edu-6 : Facteur d'élongation 1 Alpha, impliqué dans le métabolisme. Une discontinuité est observée entre les populations de Mer du Nord et d'Atlantique d'une part et celles de l'Ouest de la Mer Méditerranée d'autre part. Une réduction progressive (cline) de fréquence de l'allèle majoritaire ( $p$ ) est observée au sein des populations de la Méditerranée, allant de  $p = 1$  en Atlantique à  $p = 0$  à l'Est de la Méditerranée et en Mer Noire. De façon

intéressante, un cline de fréquences a été observé entre les populations de Mer du Nord et d'Atlantique, pour ce même gène, chez la moule (Bierne *et al.*, 2003b).

- EST116-edu-1 : Fas ligand-like protein, impliqué dans la communication cellulaire, les récepteurs membranaires et le système immunitaire (activation de l'apoptose). Ce gène est potentiellement impliqué dans les mécanismes de réponses à la bonamiose [cf. **Partie IV.3** et **Partie IV.4**] et a notamment été positionné sur une carte génétique de liaison [cf. **Partie III.3.2.3.2**]. Une discontinuité dans la distribution des fréquences de l'allèle majoritaire est observée entre les populations de Mer du Nord et celles d'Atlantique, et un cline est observé au sein des populations d'Atlantique, de Mer Méditerranée et de Mer Noire.

Dans ce contexte, il s'avère particulièrement intéressant d'étudier plus précisément ces marqueurs et les gènes qui leur sont associés (étude transcriptomique) afin de confirmer leur rôle dans le processus d'adaptation locale. Car en effet, un marqueur avec un fort niveau de différenciation n'est pas forcément une signature de l'adaptation locale. Il peut également être sous l'effet d'un auto-stop global (liaison à un gène sous sélection), ou refléter la présence d'une barrière génétique semi-perméable et multifactorielle (isolement pré- ou post-zygotique, barrière endogène ou exogène) (Bierne *et al.*, 2011).

## Sixième partie

# Conclusion générale

## VI.1 Rappel des Objectifs

Le présent travail de thèse consistait à améliorer la compréhension de la résistance de l'huître plate européenne à la bonamiose, mais également à mieux caractériser la ressource génétique et la structuration de ses populations naturelles.

Pour mener à bien ce travail, de nouveaux marqueurs moléculaires ont été développés. Ces marqueurs ont, d'une part, été utilisés pour générer plusieurs cartes génétiques de liaison de *Ostrea edulis* et pour compléter la carte génétique déjà publiée.

Ces cartes génétiques ont par la suite été utilisées dans deux expériences successives de cartographie. La première expérience a consisté à cartographier des régions du génome (QTL) potentiellement impliquées dans les phénotypes mort/survie, et mort infecté/survivant non-infecté dans le cadre d'une expérience d'infection avec le parasite *Bonamia ostreae*. La deuxième expérience a, quant à elle, consisté à cartographier des régions génomiques liées à la régulation de réponses cellulaires (activités hématocytaires ; QTL) et moléculaires (expression de gènes ; eQTL), préalablement identifiées comme potentiellement impliquées dans la réponse à une infection avec *B. ostreae*. Ces deux premières études ont permis de caractériser les phénotypes de réponse de l'hôte à deux échelles d'étude : 1- à l'échelle inter-familiale (comparaison des QTL détectés, entre plusieurs familles) ; 2- à l'échelle intra-familiale (analyse entre les individus d'une même famille). Dans une troisième expérience, les réponses moléculaires et cellulaires ont été étudiées à l'échelle inter-populationnelle. C'est-à-dire, que les réponses de trois populations naturelles d'huîtres plates européennes ont été étudiées de façon simultanée, dans le cadre d'une expérience d'injection. Cette expérience préliminaire n'a pas été totalement fructueuse puisqu'une partie seulement des analyses a pu être effectuée, en raison d'un arrêt prématuré de cette étude.

D'autre part, les marqueurs moléculaires préalablement développés ont été utilisés pour estimer la diversité génétique de *O. edulis* à l'échelle de son aire de répartition, mais également pour estimer le degré de fragmentation de ses populations naturelles, et détecter de potentielles signatures d'adaptation locale.

## VI.2 Bilan du développement des nouveaux marqueurs moléculaires

Les nouveaux outils moléculaires développés et utilisés dans le cadre de ce travail de thèse ont été obtenus de deux façon différentes :

La première partie des marqueurs a été développée au laboratoire par séquençage direct de portions de gènes candidats potentiellement impliqués dans la réponse à l'infection à *Bonamia ostreae*. L'effort de séquençage fourni pour le développement de ces SNP *in vitro* a permis d'identifier un total de 420 sites polymorphes dont 386 substitutions (SNP) sur 40 portions de séquences étudiées. Parmi ces marqueurs potentiels, 52 SNP, distribués sur 35 séquences différentes, ont été choisis pour une validation par génotypage.

La deuxième partie des marqueurs a été obtenue, dans le cadre d'une collaboration avec un des partenaires du projet PopPhyl (Population Phylogenomics), à partir de deux nouvelles technologies de séquençage : la Technologie Roche 454, et la Technologie Solexa/Illumina. Après définition de critères stringents de qualité pour le choix des SNP à tester, 332 SNP ont été choisis parmi les 15 700 sites polymorphes potentiellement utilisables. Le génotypage des 384 SNP sélectionnés a été effectué à la plateforme génomique BeadXpress de Toulouse (GenoToul) via la chimie GoldenGate, et la technologie Veracode (Illumina).

Au total, sur les 384 SNP génotypés, 198 marqueurs dont 11 SNP *in vitro* ont été identifiés informatifs chez au moins une des familles ségrégeantes étudiées.

**Grâce au développement et à la validation de ces nouveaux outils moléculaires, 317 marqueurs sont désormais disponibles (tous types confondus : AFLP, microsatellites, SNP) pour la cartographie génétique de liaison.** Néanmoins, il est important de noter que tous ces marqueurs moléculaires ne ségrégent pas simultanément chez toutes les familles étudiées.

Dans le cadre de la caractérisation génétique des populations naturelles d'*Ostrea edulis*, un total de 208 marqueurs ont été identifiés polymorphes, dont 14 SNP *in vitro* parmi les 250 SNP typés avec succès. **Il est à noter que les SNP développés dans le cadre de ce travail de thèse sont intéressants à la fois pour caractériser les populations de l'huître plate européenne et celles de l'huître plate australienne.**

### VI.3 Caractérisation génétique des ressources naturelles de *O. edulis*

La bonamiose affecte l'huître plate européenne sur plusieurs zones de son aire de répartition. Néanmoins, certaines zones géographiques ont pu demeurer indemnes. Dans ce contexte, il s'avérait important d'estimer la diversité génétique de *O. edulis* à l'échelle de son aire de répartition et d'identifier d'éventuelles signatures d'adaptation locale. Il s'avérait également important de caractériser un éventuel différentiel de réponse à la parasitose de la part de populations naturelles issues de plusieurs zones géographiques.

La diversité et la structuration des populations naturelles de *Ostrea edulis* ont été étudiées à l'échelle de son aire de distribution. **Cette étude a permis de confirmer la forte diversité nucléotidique de l'huître plate européenne, en évaluant pour la première fois la diversité génétique globale des populations naturelles d'un mollusque bivalve marin.**

La diversité génétique a également été étudiée entre 15 populations naturelles échantillonnées sur l'ensemble de l'aire de distribution européenne de l'espèce. Que ce soit à partir des données microsatellites ou SNP, **cette étude a permis de confirmer la différenciation génétique des populations selon un modèle d'isolement par la distance.** Ce phénomène avait déjà été observé avec des marqueurs allozymiques, mitochondriaux et microsatellites.

La recherche, par trois méthodes différentes, d'une **structuration génétique des populations naturelles d'*O. edulis*** a permis d'identifier **quatre groupes réunissant les populations situées simultanément dans la même mer ou le même océan : 1- Mer du Nord ; 2- Océan Atlantique ; 3- Mer Méditerranée Ouest ; 4- Mer Méditerranée Est et Mer Noire.** D'autre part, une moindre diversité a été détectée chez les populations de Mer du Nord et de Mer Noire, par rapport aux populations de l'Océan Atlantique et de la Mer Méditerranée. Ces observations confirment **l'importance probable des épisodes successifs de glaciations dans la structuration génétique des populations naturelles d'*Ostrea edulis*.**

D'autre part, la recherche de signatures de la sélection effectuée entre les groupes structurés a permis d'identifier une **coïncidence entre les discontinuités dans la distribution des fréquences alléliques des marqueurs moléculaires sous sélection positive divergente et les barrières biogéographiques.** Il semble ainsi que la différenciation génétique des populations de *O. edulis* soit due à des événements démographiques anciens de contraction-expansion liés aux phénomènes glaciaires et géologiques, mais également à l'émergence de barrières aux flux de gènes plus récentes. Il est également possible que la sélection directionnelle soit faible à l'échelle locale. Ainsi, afin de comprendre l'histoire complexe de cette différenciation, il serait intéressant de tester d'autres hypothèses, notamment celle d'une histoire commune des populations ou encore une adaptation convergente aux facteurs écologiques biotiques et abiotiques.

Une expérience d'infection par injection d'une suspension parasitaire a permis d'identifier un différentiel dans les profils de mortalités de trois populations naturelles étudiées. Ces trois populations ont été choisies de façon à disposer d'huîtres au contact récurrent avec *Bonamia ostreae*,

au contact avec *B. ostreae* et *B. exitiosa*, et naïves à *Bonamia* sp. Les huîtres testées, provenant d'une zone géographique exposée à *Bonamia ostreae* depuis l'émergence de la parasitose, sont les seules à avoir survécu au-delà d'une semaine d'expérience. Un différentiel de réponses moléculaires a été identifié entre ces huîtres et celles originaires de Corse. Ces observations suggèrent un phénomène d'adaptation et d'optimisation des réponses à la parasitose de la part de la population de Quiberon. **Il est ainsi possible que ces huîtres aient développé une résistance naturelle à la bonamiose.** Cependant, cette population a également souffert de mortalités au cours de la première semaine d'expérience. **Ceci suggère que la sélection naturelle qui s'est opérée pour l'adaptation de cette population vis-à-vis de la parasitose n'est pas complète, et que les allèles de résistance ne sont pas totalement fixés.**

## VI.4 Détection de régions génomiques liées à la réponse à la bonamiose

L'expérience d'infection avec le parasite *Bonamia ostreae*, par cohabitation des huîtres testées avec des huîtres infectées, a permis d'identifier des QTL sur six groupes de liaison (GL) différents. Deux de ces groupements ont été identifiés simultanément chez les deux familles ségrégeantes étudiées et chez la famille dont les données sont publiées avec, pour l'un des GL, un recouvrement des intervalles de confiance entre les familles. Deux autres groupements sont communs à deux des familles ; les deux autres GL n'ont été identifiés que chez une seule des familles. Ce différentiel de détection suggère notamment que chacun des marqueurs associés aux QTL ne ségrège pas chez toutes les familles (ex. : homozygotie au QTL chez les parents  $F_1$ , ...), ne permettant pas de détecter tous les QTL impliqués dans les mécanismes de réponse à la bonamiose. Il est donc nécessaire d'étudier différentes familles afin de détecter les différentes régions du génome impliquées dans ces mécanismes.

**Les régions QTL identifiées sont toutes potentiellement impliquées dans la survie ou la sensibilité à la bonamiose. Qu'elles soient détectées chez une seule famille ou simultanément chez plusieurs d'entre-elles, la localisation de toutes ces régions est à affiner pour identifier les gènes impliqués dans ces mécanismes.**

D'autre part, **pour la première fois dans l'étude des interactions entre l'huître plate européenne et son parasite *Bonamia ostreae*, l'approche génétique et l'approche immunologique ont été combinées dans une même étude.** Cette étude a été réalisée par injection directe d'une suspension parasitaire de *B. ostreae* chez des huîtres à tester.

Cette combinaison d'approches a permis d'identifier des régions génomiques impliquées dans la régulation de chacune des réponses cellulaires (QTL) et/ou moléculaires (eQTL) testées, préalablement identifiées comme potentiellement impliquées dans la réponse à *B. ostreae*. Ces régions génomiques ont été identifiées sur un total de sept GL différents.

Cette étude a notamment permis d'identifier **neuf candidats positionnels**, en co-localisant sur les mêmes GL, et parfois les mêmes intervalles de confiance, des régions génomiques potentiellement impliquées dans la résistance ou la sensibilité à la bonamiose, et des régions impliquées dans la régulation des réponses cellulaires et/ou moléculaires.

**La concordance positionnelle entre certaines régions régulatrices et certains QTL de réponse à la parasitose reflète l'importance potentielle de ces régions génomiques, et l'intérêt d'affiner leur localisation.**

Néanmoins, il s'avère nécessaire de reproduire cette approche de « génétique génomique » chez plusieurs autres familles d'huîtres plates afin d'identifier d'éventuelles régions régulatrices qui n'auraient pas ségrégé chez les familles étudiées. Il s'avère également important de développer de nouvelles études fonctionnelles sur ces gènes candidats afin de mieux comprendre les voies de régulation de ces gènes, et leur rôle dans la réponse à une infection à la bonamiose.



## VI.5 Faisabilité d'un programme MAS ou GAS contre la bonamiose

Le présent travail de recherche avait pour objectif de développer et de tester des outils utilisables pour la mise en place, *in fine*, d'un programme de sélection assistée par marqueurs (MAS), ou de sélection assistée par gènes (GAS).

Au cours de ce travail de thèse, plusieurs régions génomiques d'intérêt ont été identifiées et parfois confirmées chez plusieurs familles d'huîtres plates soumises à une infection avec *Bonamia ostreae*. Les approches utilisées ont notamment permis d'identifier une concordance positionnelle entre certaines régions QTL liées à la résistance ou la sensibilité à la bonamiose et certaines régions intervenant dans la cascade de régulation de gènes ou d'activité hémocytaires potentiellement impliquées dans la réponse à cette parasitose. **Ces résultats sont particulièrement encourageants pour optimiser l'efficacité d'un futur programme de sélection contre la bonamiose, afin de reconstituer les gisements naturels et de relancer la culture de *Ostrea edulis* en Europe.**

Néanmoins, il s'avère nécessaire de tester l'intérêt économique de la mise en œuvre d'un tel programme de sélection, notamment à l'échelle professionnel. Ce qui n'a, à l'heure actuelle, encore jamais été effectué.

Les présents travaux ont bénéficié des avancées récentes des nouvelles technologies de séquençage et de génotypage, ce qui a notamment permis d'optimiser la couverture du génome de l'huître plate et de détecter un grand nombre de régions QTL et eQTL liées à la réponse à la bonamiose. Néanmoins, la localisation des régions d'intérêt détectées dans le cadre de ce travail de thèse doit encore être affinée par une approche de cartographie fine. Il s'avère ainsi particulièrement important de développer davantage de marqueurs moléculaires utilisables pour la cartographie. Pour augmenter encore davantage la densité en marqueurs des cartes génétiques de liaison, les nouvelles techniques de génotypage à Haut Débit, telle que la technologie RAD-Tag, pourraient être utilisées.

D'autre part, l'évolution du coût de mise en œuvre de ces technologies et les progrès techniques effectués sur les machines apportent de nouvelles opportunités, notamment en terme de séquençage de génome entier. En effet, ces nouvelles technologies ont récemment été utilisées pour obtenir un premier séquençage du génome de l'huître perlière *Pinctada fucata* (Takeuchi *et al.*, 2012). De même, elles sont actuellement utilisées pour séquencer le génome entier de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (Hedgecock *et al.*, 2005). **La disponibilité d'une carte génétique de référence chez une espèce phylogénétiquement proche de *Ostrea edulis* devrait permettre de connaître le positionnement des gènes dans le génome. Cette information devrait notamment nous permettre d'affiner la localisation des régions génomiques liées à la réponse à la bonamiose, en procédant par comparaison entre les cartes génétiques de liaison des deux espèces.**

L'étude de l'expression des gènes alors identifiés permettra de détecter un éventuel effet d'épistasie

ou d'interférence entre les mécanismes de réponse à la bonamiose et d'autres fonctions biologiques. Ceci permettra d'améliorer notre connaissance de l'architecture génétique et des cascades physiologiques mises en œuvre.

# Bibliographie

- Abollo E., Ramilo A., Casas S.M., Comesaña P., Cao A., Carballal M.J. and Villalba A.**, 2008. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture*, **274**:201–207.
- Allam B. and Ford S.E.**, 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, **20**(3):374–383.
- Anderson R.S.**, 2001. Reactive oxygen species and antimicrobial defenses of invertebrates: A bivalve model. In *Phylogenetic perspectives on the vertebrate immune system*, vol. 484, edited by G. Beck, M. Sugumaran and E.L. Cooper, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, USA, pp. 131–140.
- Andrews J.D.**, 1980. A review of introductions of exotic oysters and biological planning for new importations. *Marine Fisheries Review*.
- Arzul I. and Bouchoucha M.**, 2008. Etude de la résistance de la population d’huîtres plates *Ostrea edulis* dans l’étang de Diana au parasite *Bonamia ostreae*. *Tech. rep.*, Ifremer.
- Arzul I. and Renault T.**, 2002. Herpèsvirus et bivalves marins. *Virologie*, **6**(3):169–174.
- Arzul I., Miossec L., Blanchet E., Garcia C., Joly J.P., Francois C. and Berthe F.**, 2005. A long term study of bonamiosis in Quiberon bay, France. In *8th International Conference on Shellfish Restoration, Brest, France*, Ifremer.
- Arzul I., Gagnaire B., Bond C., Chollet B., Morga B., Ferrand S., Robert M. and Renault T.**, 2009. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **85**(1):67–75.
- Arzul I., Garcia C. and Joly J.P.**, 2010. Report of the 2010 Annual meeting of the National Reference Laboratories for mollusc diseases. *Tech. rep.*, Ifremer.
- Arzul I., Langlade A., Chollet B., Robert M., Ferrand S., Omnes E., Lerond S., Couraleau Y., Joly J.P., Francois C. and Garcia C.**, 2011. Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Veterinary Parasitology*, **179**(1-3):69–76.
- Audemard C., Carnegie R.B., Bishop M.J., Peterson C.H. and Bureson E.M.**, 2008. Interacting effects of temperature and salinity on *Bonamia* sp. parasitism in the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **98**(3):344–350.
- Auffret M.**, 1985. Morphologie comparative des types hémostocytaires chez quelques mollusques bivalves d’intérêt commercial. Thèse de 3ème cycle, Université de Bretagne Occidentale.

- Bachère E. and Grizel H.**, 1985. Réceptivité de trois populations naturelles d'huîtres plates *Ostrea edulis* L. au protozoaire *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980). *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **47**(3 et 4):237–240.
- Bachère E., Durand J.L. and Tige G.**, 1982. *Bonamia ostreae* (Pichot et coll., 1979) parasite de l'huître plate : comparaison de deux méthodes de diagnostic. *Tech. rep.*, Conseil International pour l'Exploitation de la Mer, Comité de Mariculture.
- Bachère E., Mialhe E., Noël D., Boulo V., Morvan A. and Rodriguez J.**, 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*, **132**:17–32.
- Bahri-Sfar L., Lemaire C., Hassine O.K.B. and Bonhomme F.**, 2000. Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **267**(1446):929–935.
- Baird N.A., Etter P.D., Atwood T.S., Currey M.C., Shiver A.L., Lewis Z.A., Selker E.U., Cresko W.A. and Johnson E.A.**, 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, **3**(10):e3376.
- Balouet G., Poder M. and Cahour A.**, 1983. Haemocytic parasitosis: Morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, **34**(1-2):1–14.
- Balseiro P., Conchas R.F., Montes J., Gómez-León J., Novoa B. and Figueras A.**, 2006. Comparison of diagnosis techniques for the protozoan parasite *Bonamia ostreae* in flat oyster *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **261**:1135–1143.
- Baud J.P., Gérard A. and Naciri-Graven Y.**, 1997. Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. *Marine Biology*, **130**(1):71–79.
- Beattie J.H., Davis J.P., Downing S.L. and Chew K.K.**, 1988. Summer mortality in oysters. In *American Fishery Society, Special publication*, vol. 18, Fisher, W.S., pp. 265–268.
- Beaumont A., Garcia M.T., Honig S. and Low P.**, 2006. Genetics of Scottish populations of the native oyster, *Ostrea edulis*: gene flow, human intervention and conservation. *Aquatic Living Resources*, **19**(4):389–402.
- Beaumont M.A. and Balding D.J.**, 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology*, **13**(4):969–980.
- Beaumont M.A. and Nichols R.A.**, 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **263**(1377):1619–1626.

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. and Bonhomme F.**, 2004. GENETIX v4.05, logiciel sous Windows pour la génétique des populations.
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Clark K., Lipman D.J., Ostell J. and Sayers E.W.**, 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research*, **40**(D1):D48–D53.
- Berthe F.C.J. and Hine P.M.**, 2003. *Bonamia exitiosa* Hine et al., 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Diseases of Aquatic Organisms*, **57**(1-2):181–181.
- Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y. and Bonhomme F.**, 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, **148**(4):1893–1906.
- Bierne N., Borsa P., Daguin C., Jollivet D., Viard F., Bonhomme F. and David P.**, 2003a. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology*, **12**(2):447–461.
- Bierne N., Daguin C., Bonhomme F., David P. and Borsa P.**, 2003b. Direct selection on allozymes is not required to explain heterogeneity among marker loci across a *Mytilus* hybrid zone. *Molecular Ecology*, **12**(9):2505–2510.
- Bierne N., Welch J., Loire E., Bonhomme F. and David P.**, 2011. The coupling hypothesis: why genome scans may fail to map local adaptation genes. *Molecular Ecology*, **20**(10):2044–2072.
- Black W.C., Baer C.F., Antolin M.F. and DuTeau N.M.**, 2001. POPULATION GENOMICS: Genome-wide sampling of insect populations. *Annual Review of Entomology*, **46**(1):441–469.
- Blanchet E.**, 2005. La bonamiose de l’huître plate *Ostrea edulis* : Bilan des connaissances actuelles, analyse des données collectées en France de 1989 à 2004, mesures de lutte et perspectives. Doctorat vétérinaire, Université de Paul Sabatier, Toulouse.
- Boissin E., Stöhr S. and Chenuil A.**, 2011. Did vicariance and adaptation drive cryptic speciation and evolution of brooding in *Ophioderma longicauda* (Echinodermata: *Ophiuroidea*), a common Atlanto-Mediterranean ophiuroid? *Molecular Ecology*, **20**(22):4737–4755.
- Bordin S. and Tan X.**, 2001. C1q arrests the cell cycle progression of fibroblasts in G(1) phase: role of the cAMP/PKA-I pathway. *Cellular Signalling*, **13**(2):119–123.
- Bougrier S., Tige G., Bachère E. and Grizel H.**, 1986. *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. *Aquaculture*, **58**(1-2):151–154.
- Boutet I., Tanguy A. and Moraga D.**, 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene*, **329**(0):147–157.
- Brookes A.J.**, 1999. The essence of SNPS. *Gene*, **234**:177–186.

- Bucke D.**, 1988. Pathology of bonamiasis. *Parasitology Today*, **4**(6):174–176.
- Burreson E.M., Stokes N.A., Carnegie R.B. and Bishop M.J.**, 2004. *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in non native oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *Journal of Aquatic Animal Health*, **16**(1):1–9.
- Bushek D. and Allen S. K. J.**, 1996. Host-parasite interactions among broadly distributed populations of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and the protozoan *Perkinsus marinus*. *Marine ecology progress series*, **139**:127–141.
- Bédier E., Baud J.P., Cochenec N., Cornette F., Gérard A., Goyard E., Joly J.P., Kopp J., Langlade A., Le Coguc Y., Mazurié J. and Nourry M.**, 2001. L'amélioration des performances de l'huître plate européenne *Ostrea edulis* par la sélection génétique. In *Journées Conchylicoles du Département Ressources Aquacoles*, Ifremer, La Tremblade.
- Bédier E., Langlade A., Angeri S., Brizard R., Nerlovic V., Glize P. and Haffray P.**, 2005. Validation in commercial conditions of the response to selection of the European flat oyster *Ostrea edulis* for resistance to *Bonamia ostreae*. In *International Conference on Shellfish Restoration*, Brest, France, Ifremer.
- Cameron A.R., De Blas I., Miossec L., Dopazo C., Vallejo A. and Dalsgaard I.**, 2006. Transfer of pathogens between farmed and wild aquatic animals – epidemiological basis for demonstrating causality. In *Symposia proceedings, ISVEE conference XI*, Cairns, 6-11 August 2006, p. 3 p.
- Canesi L., Gallo G., Gavioli M. and Pruzzo C.**, 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, **57**(6):469–476.
- Carnegie R.B., Barber B.J., Culloty S.C., Figueras A.J. and Distel D.L.**, 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Diseases of Aquatic Organisms*, **42**(3):199–206.
- Carnegie R.B., Barber B.J. and Distel D.L.**, 2003. Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, **55**:247–252.
- Carnegie R.B., Burreson E.M., Hine P.M., Stokes N.A., Audemard C., Bishop M.J. and Peterson C.H.**, 2006. *Bonamia perspora* n. sp (Haplosporidia), a parasite of the oyster *Ostreola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**(4):232–245.
- Carnegie R.B., Stokes N.A., Audemard C., Bishop M.J., Wilbur A.E., Alphon T.D., Posey M.H., Petersen C.H. and Burreson E.M.**, 2008. Strong seasonality of *Bonamia* sp. infection and induced *Crassostrea ariakensis* mortality in Bogue and Masonboro Sounds, North Carolina, USA. *Journal of Invertebrate Pathology*, **98**:335–343.
- Cavalier-Smith T. and Chao E.E.Y.**, 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*, **154**:341–358.

- Chagot D.**, 1989. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Étude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Asctospora). Dipl. ec. pr. hautes études, Montpellier.
- Chagot D., Boulo V., Hervio D., Mialhe E., Bachère E., Mourton C. and Grizel H.**, 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *Journal of Invertebrate Pathology*, **59**(3):241–249.
- Chakravarti A., Lasher L.K. and Reefer J.E.**, 1991. A maximum-likelihood method for estimating genome length using genetic-linkage data. *Genetics*, **128**(1):175–182.
- Chen X., Hackett C.A., Niks R.E., Hedley P.E., Booth C., Druka A., Marcel T.C., Vels A., Bayer M., Milne I., Morris J., Ramsay L., Marshall D., Cardle L. and Waugh R.**, 2010. An eQTL analysis of partial resistance to *Puccinia hordei* in Barley. *PLoS ONE*, **5**(1):e8598.
- Cheng T.C.**, 1981. Bivalves. In *Invertebrate blood cells*, edited by N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley, Academic Press, London, pp. 233–300.
- Churchill G.A. and Doerge R.W.**, 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, **138**(3):963–71.
- Cochennec N., Le Roux F., Berthe F. and Gérard A.**, 2000. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**(1):26–32.
- Cochennec-Laureau N., Reece K.S., Berthe F.C.J. and Hine P.M.**, 2003a. *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation leads to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Diseases of Aquatic Organisms*, **54**(3):209–217.
- Cochennec-Laureau N., Auffret M., Renault T. and Langlade A.**, 2003b. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **83**(1):23–30.
- Comps M.**, 1970. Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) dans le Bassin de Marennes. *Tech. rep.*, Comité des Crustacés, coquillages et benthos, Conseil International pour l'Exploration de la Mer.
- Comps M.**, 1976. Haplosporidie parasite des branchies de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Tech. rep.*, Comité des Crustacés, coquillages et benthos, Conseil International pour l'Exploration de la Mer.
- Comps M.**, 1983. Culture *in vitro* of *Bonamia ostreae* hemocytic parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*, **296**(19):931–933.

- Comps M., Tige G. and Grizel H.**, 1980. Ultrastructural-study of a protistan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences série D*, **290**(4):383–384.
- Cookson W., Liang L., Abecasis G., Moffatt M. and Lathrop M.**, 2009. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nature Reviews Genetics*, **10**(3):184–194.
- Corbeil S., Arzul I., Robert M., Berthe F.C.J., Besnard-Cochennec N. and Crane M.S.**, 2006. Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **71**(1):81–85.
- Cowley M.J., Cotsapas C.J., Williams R.B.H., Chan E.K.F., Pulvers J.N., Liu M.Y., Luo O.J., Nott D.J. and Little P.F.R.**, 2009. Intra- and inter-individual genetic differences in gene expression. *Mammalian Genome*, **20**(5):281–295.
- Cranfield H.J., Dunn A., Doonan I.J. and Michael K.P.**, 2005. *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES Journal of Marine Science*, **62**:3–13.
- Cui S., He X., Fu S., Meng Q., Gai J. and Yu D.**, 2008. Genetic dissection of the relationship of apparent biological yield and apparent harvest index with seed yield and yield related traits in soybean. *Australian Journal of Agricultural Research*, **59**(1):86–93.
- Culloty S.C. and Mulcahy M.F.**, 1996. Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oyster (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, **144**:53–63.
- Culloty S.C. and Mulcahy M.F.**, 2001. Living with bonamiasis: Irish research since 1987. *Hydrobiologia*, **465**(1-3):181–186.
- Culloty S.C. and Mulcahy M.F.**, 2007. *Bonamia ostreae* in the native oyster *Ostrea edulis*. *Marine Environment and Health Series*, **29**:p1–36.
- Culloty S.C., Novoa B., Pernas M., Longshaw M., Mulcahy M.F., Feist S.W. and Figueras A.**, 1999. Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms*, **37**(1):73–80.
- Culloty S.C., Cronin M.A. and Mulcahy M.F.**, 2001. An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980). *Aquaculture*, **199**(3-4):229–244.
- Culloty S.C., Cronin M.A. and Mulcahy M.F.**, 2004. Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture*, **237**(1-4):41–58.



- Curole J.P. and Hedgecock D.**, 2005. High frequency of SNPs in the Pacific oyster genome. *In Plant and Animal Genomes XIII Conference, San Diego, CA.*
- da Silva P. and Villalba A.**, 2004. Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**:97–104.
- da Silva P., Fuentes J. and Villalba A.**, 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology*, **147**(4):965–977.
- da Silva P.M., Comesaña P., Fuentes J. and Villalba A.**, 2008. Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish & Shellfish Immunology*, **24**(5):551–563.
- Dacheng T., Qiang W., Pengfei Z., Araki H., Sihai Y., Kreitman M., Nagylaki T., Hudson R., Bergelson J. and Chen J.Q.**, 2008. Single-nucleotide mutation rate increases close to insertions/deletions in eukaryotes. *Nature*, **455**(4):105–108.
- Danic-Tchaleu G., Heurtebise S., Morga B. and Lapègue S.**, 2011. Complete mitochondrial DNA sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* confirms *Ostreidae* classification. *BMC research notes*, **4**(1):400.
- Danzmann R.G., Jackson T.R. and Ferguson M.M.**, 1999. Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout. *Aquaculture*, **173**(1-4):45–58.
- Darvasi A., Weinreb A., Minke V., Weller J.I. and Soller M.**, 1993. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic-map. *Genetics*, **134**(3):943–951.
- Davis C.V. and Barber B.J.**, 1999. Growth and survival of selected lines of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) affected by juvenile oyster disease. *Aquaculture*, **178**(3-4):253–271.
- de Koning D.J., Carlborg O. and Haley C.S.**, 2005. The genetic dissection of immune response using gene-expression studies and genome mapping. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **105**(3-4):343–352.
- Dekkers J.C.M.**, 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in live-stock: Strategies and lessons. *Journal of Animal Science*, **82**(13 suppl):E313–E328.
- Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S. and Reed J.C.**, 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, **388**(6639):300–304.

- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. and Siebert P.D.**, 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**:6025–6030.
- Diaz-Almela E., Boudry P., Launey S., Bonhomme F. and Lapègue S.**, 2004. Reduced female gene flow in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Heredity*, **95**(6):510–516.
- Diggles B.K., Cochenec-Laureau N. and Hine P.M.**, 2003. Comparison of diagnostic techniques for *Bonamia exitiosus* from flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Aquaculture*, **220**(1-4):145–156.
- Dimas A.S. and Dermitzakis E.T.**, 2009. Genetic variation of regulatory systems. *Current Opinion in Genetics & Development*, **19**(6):586–590.
- Dixon A.L., Liang L., Moffatt M.F., Chen W., Heath S., Wong K.C.C., Taylor J., Burnett E., Gut I., Farrall M., Lathrop G.M., Abecasis G.R. and Cookson W.O.C.**, 2007. A genome-wide association study of global gene expression. *Nature Genetics*, **39**:1202–1207.
- Domingues V.S., Bucciarelli G., Almada V.C. and Bernardi G.**, 2005. Historical colonization and demography of the Mediterranean damselfish, *Chromis chromis*. *Molecular Ecology*, **14**(13):4051–4063.
- Duran C., Appleby N., Clark T., Wood D., Imelfort M., Batley J. and Edwards D.**, 2009. AutoSNPdb: an annotated single nucleotide polymorphism database for crop plants. *Nucleic Acids Research*, **37**:D951–D953.
- Elston R.A., Farley C.A. and Kent M.L.**, 1986. Occurrence and significance of bonamiosis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms*, **2**:49–54.
- Elston R.A., Kent M.L. and Wilkinson M.T.**, 1987. Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture*, **64**(3):237–242.
- Emerson J.J. and Li W.H.**, 2010. The genetic basis of evolutionary change in gene expression levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **365**(1552):2581–2590.
- Engelen J.J.M., Albrechts J.C.M., Hamers G.J.H. and Geraedts J.P.M.**, 1998. A simple and efficient method for microdissection and microFISH. *Journal of Medical Genetics*, **35**(4):265–268.
- Erickson D.**, 2005. Quantitative trait loci: Mapping the future of QTL's. *Heredity*, **95**(6):417–418.
- Erickson D.L., Fenster C.B., Stenoien H.K. and Price D.**, 2004. Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Molecular Ecology*, **13**(9):2505–2522.

- Evanno G., Regnaut S. and Goudet J.**, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**:2611–2620.
- Farley C.A., Wolf P.H. and Elston R.A.**, 1988. A long-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g. n.), and two new species, *Mikrocytos mackini* and *Mikrocytos roughleyi* (sp. n.). *Fishery Bulletin*, **86**(3):581–593.
- Fay J.C. and Wu C.I.**, 2000. Hitchhiking under positive Darwinian selection. *Genetics*, **155**(3):1405–1413.
- Felsenstein J.**, 1995. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c.
- Fisher R.A.**, 1934. The effect of methods of ascertainment upon the estimation of frequencies. *Annals of Human Genetics*, **6**(1):13–25.
- Flood A.K.**, 2007. Detection of *Bonamia ostreae* in fixed *Ostrea edulis* tissues by use of specific PCR assays. Bsc biomedical science, School of Biological Sciences, Dublin Institute of Technology.
- Foll M. and Gaggiotti O.**, 2008. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A bayesian perspective. *Genetics*, **180**(2):977–993.
- Ford S.E.**, 1988. Host-parasite interactions in Eastern oysters selected for resistance to *Haplosporidium nelsoni* (MSX) disease: survival mechanisms against a natural pathogen. *Am. Fish Soc. Spec. Publ.*, **18**:206–224.
- Ford S.E. and Haskin H.H.**, 1987. Infection and mortality patterns in strains of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Journal of parasitology*, **73**(2):368–376.
- Fouche D.**, 1997. Etat des connaissances sur la pathologie chez les mollusques bivalves. *Tech. rep.*, Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral, Ifremer La Tremblade.
- Friedman C.S. and Perkins F.O.**, 1994. Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, U.S.A. *Journal of Invertebrate Pathology*, **64**(3):179–181.
- Fu Y.X.**, 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**:915–925.
- Gaffney P.M. and Bushek D.**, 1996. Genetic aspects of disease resistance in oysters. *Journal of Shellfish Research*, **15**(1):135–140.
- Gagnaire B.**, 2005. Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle.

- Gagnaire B., Thomas-Guyon H., Burgeot T. and Renault T.**, 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, **22**(1):1–14.
- Garnier M., Labreuche Y., Garcia C., Robert M. and Nicolas J.L.**, 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*, **53**(2):187–196.
- Garvin M.R., Saitoh K. and Gharrett A.J.**, 2010. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Molecular Ecology Resources*, **10**(6):915–934.
- Gayral P., Weinert L., Chiari Y., Tsagkogeorga G., Ballenghien M. and Galtier N.**, 2011. Next-generation sequencing of transcriptomes: a guide to RNA isolation in nonmodel animals. *Molecular Ecology Resources*, **11**(4):650–661.
- Georges M.**, 2007. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of Quantitative Trait Loci in domestic animals. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **8**(1):131–162.
- Gestal C., Pallavicini A., Venier P., Novoa B. and Figueras A.**, 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. *Developmental and Comparative Immunology*, **34**(9):926–934.
- Gharbi A., Zitari-Chatti R., Van Wormhoudt A., Dhraief M., Denis F., Said K. and Chatti N.**, 2011. Allozyme variation and population genetic structure in the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* across the Siculo-Tunisian strait. *Biochemical Genetics*, **49**(11):788–805.
- Gilad Y., Rifkin S.A. and Pritchard J.K.**, 2008. Revealing the architecture of gene regulation: the promise of eQTL studies. *Trends in Genetics*, **24**(8):408–415.
- Gonzalez P., Dominique Y., Massabuau J.C., Boudou A. and Bourdineaud J.P.**, 2005. Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, **39**(11):3972–3980.
- Gouletquer P. and Héral M.**, 1997. Marine molluscan production trends in France: from Fisheries to Aquaculture. *US .Dep.Commer., NOAA Technical Report NMFS*, **129**:137–164.
- Grenier E.**, ed., 2003. *Criblage différentiel par SSH : Hybridation Soustractive et Suppressive (Suppression Subtractive Hybridization)*. Tagu D. and Moussard C. Eds., Principes des techniques de biologie moléculaire, INRA, Paris, France.
- Grizel H.**, 1985. Etude des récentes épizooties de l’huître plate *Ostrea edulis* Linné et de leur impact sur l’ostréiculture bretonne. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Grizel H. and Héral M.**, 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil International pour l’Exploration de la Mer*, **47**:399–403.

- Grizel H., Comps M., Cousserans F., Bonami J.R. and Vago C.**, 1974. Study on parasite of digestive gland observed during current epizootic of *Ostrea edulis* L. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences série D*, **279**(9):783–784.
- Grizel H., Comps M., Raguènes D., Leborgne Y., Tige G. and Martin A.G.**, 1982. Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les côtes de Bretagne. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **46**(3):209–225.
- Grizel H., Mialhe E., Chagot D., Boulo V. and Bachère E.**, 1988. Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. *American Fisheries Society Special Publication*, **18**:1–4.
- Gueguen Y., Cadoret J.P., Flament D., Barreau-Roumiguère C., Girardot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère E. and Escoubas J.M.**, 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, **303**:139–145.
- Guichard B., François C., Joly J.P., Garcia C., Saulnier D., Pépin J.F., Arzul I., Omnes E., Tourbiez D., Faury N., Haffner P., Chollet B., Robert M. and Renault T.**, 2010. Bilan 2010 du réseau Repamo, Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins. *Tech. rep.*, Ifremer.
- Gysels E.S., Hellemans B., Pampoulie C. and Volckaert F.A.M.**, 2004. Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Molecular Ecology*, **13**(2):403–417.
- Gérard A.**, 1998. Avancées récentes sur la reproduction des huîtres. *La pisciculture française*, **134**:71–76.
- Hall T.A.**, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**:95–98.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M. and Bernhardt R.**, 2007. Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1770**(3):330–344.
- Hedgecock D.**, 1994. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In *Genetics and evolution of aquatic organisms*, edited by A.R. Beaumont, Chapman & Hall, London, UK, pp. 122–134.
- Hedgecock D. and Pudovkin A.I.**, 2011. Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: A review and commentary. *Bulletin of Marine Science*, **87**(4):971–1002.
- Hedgecock D., Gaffney P.M., Gouletquer P., Guo X., Reece K. and Warr G.W.**, 2005. The case for sequencing the Pacific oyster genome. *Journal of Shellfish Research*, **24**(2):429–441.

- Hedgecock D., Launey S., Pudovkin A.I., Naciri Y., Lapègue S. and Bonhomme F.**, 2007. Small effective number of parents (N-b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **150**(6):1173–1182.
- Herrbach B.**, 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **35**(1):79–87.
- Hervio D., Bachère E., Mialhe E. and Grizel H.**, 1989. Chemiluminescent responses of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* hemocytes to *Bonamia ostreae* (Asctospora). *Developmental and Comparative Immunology*, **13**(4):449.
- Hervio D., Bachère E., Boulo V., Cochenec N., Vuillemin V., Le Coguc Y., Cailletaux G., Mazurie J. and Mialhe E.**, 1995. Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: Application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture*, **132**(3-4):183–194.
- Hill K.M., Carnegie R.B., Aloui-Bejaoui N., Gharsalli R.E., White D.M., Stokes N.A. and Burreson E.M.**, 2010. Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**(3):179–185.
- Hine P.M.**, 1991. The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture*, **93**(3):241–251.
- Hine P.M., Cochenec-Laureau N. and Berthe F.C.J.**, 2001. *Bonamia exitiosus* n. sp (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Diseases of Aquatic Organisms*, **47**(1):63–72.
- Hine P.M., Carnegie R.B., Burreson E.M. and Engelsma M.Y.**, 2009. Inter-relationships of haplosporidians deduced from ultrastructural studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, **83**:247–256.
- Huang X. and Madan A.**, 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, **9**(9):868–877.
- Hudson M.**, 2008. Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources*, **8**:3–17.
- Huvet A., Herpin A., Dégremont L., Labreuche Y., Samain J.F. and Cunningham C.**, 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, **343**(1):211–220.
- Héral M.**, 1989. Traditional oyster culture in France. In *Barnabe Aquaculture*, Ellis Horwood, pp. 342–387 p.

- Héral M. and Deslous-Paoli J.M.**, 1991. Oyster culture in European countries. *In Estuarine and Marine Bivalve mollusk culture*, edited by Menzel, CRC Press, pp. 154–190 p.
- Ibañez-Escriche N. and Gonzalez-Recio O.**, 2011. Review. Promises, pitfalls and challenges of genomic selection in breeding programs. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **9**(2):404–413.
- Jansen R.C.**, 1993. Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. *Biometrics*, **49**(1):227–231.
- Jansen R.C.**, 1994. Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics*, **138**(3):871–81.
- Jansen R.C. and Nap J.P.**, 2001. Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics*, **17**(7):388–391.
- Jansen R.C. and Stam P.**, 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, **136**(4):1447–55.
- Jaziri H.**, 1990. Variations génétiques et structuration biogéographique chez un bivalve marin : l'huître plate *Ostrea edulis* L. Thèse de doctorat, Montpellier.
- Jenny M.J., Chapman R.W., Mancía A., Chen Y.A., McKillen D.J., Trent H., Lang P., Escoubas J.M., Bachère E., Boulo V., Liu Z.J., Gross P.S., Cunningham C., Cupit P.M., Tanguy A., Guo X., Moraga D., Boutet I., Huvet A., De Guise S., Almeida J.S. and Warr G.W.**, 2007. A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Marine Biotechnology*, **9**(5):577–591.
- Jiang Z.H., Michal J.J., Chen J., Daniels T.F., Kunej T., Garcia M.D., Gaskins C.T., Busboom J.R., Alexander L.J., Wright R.W. and MacNeil M.D.**, 2009. Discovery of novel genetic networks associated with 19 economically important traits in beef cattle. *International Journal of Biological Sciences*, **5**(6):528–542.
- Johannesson K., Rodstrom E.M. and Aase H.**, 1989. Low genetic variability in scandinavian populations of *Ostrea edulis* L. - Possible causes and implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **128**(2):177–190.
- Jost L.O.U.**, 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, **17**(18):4015–4026.
- Kaiser P., Howell J., Fife M., Sadeyen J.R., Salmon N., Rothwell L., Young J., van Diemen P., Stevens M., Poh T.Y., Jones M., Barrow P., Wigley P., He H., Swaggerty C., Kogut M., Smith J. and Burt D.**, 2008. Integrated immunogenomics in the chicken: Deciphering the immune response to identify disease resistance genes. *In Animal Genomics for Animal Health*, vol. 132 of *Developments in Biologicals*, edited by M.H. Pinard, C. Gay, P.P. Pastoret and B. Dodet, Karger, Basel, pp. 57–66.

- Katkansky S.C., Dahlstrom W.A. and Warner R.W.**, 1969. Observations on survival and growth of the European flat oyster *Ostrea edulis* in California. *Calif. Fish Game*, **55**:69–74.
- Kim W.J., Jung H. and Gaffney P.M.**, 2011. Development of type I genetic markers from Expressed Sequence Tags in highly polymorphic species. *Marine Biotechnology*, **13**(2):127–132.
- Kishore U. and Reid K.B.M.**, 2000. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, **49**(1-2):159–170.
- Kishore U., Kojouharova M.S. and Reid K.B.M.**, 2002. Recent progress in the understanding of the structure-function relationships of the globular head regions of C1q. *Immunobiology*, **205**(4-5):355–364.
- Kishore U., Gaboriaud C., Waters P., Shrive A.K., Greenhough T.J., Reid K.B.M., Sim R.B. and Arlaud G.J.**, 2004. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends in Immunology*, **25**(10):551–561.
- Knott S.A.**, 2005. Regression-based quantitative trait loci mapping: robust, efficient and effective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **360**(1459):1435–1442.
- Kosambi D.D.**, 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, **12**(1):172–175.
- Kroeck M.A. and Montes J.**, 2005. Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Diseases of Aquatic Organisms*, **63**(2-3):231–235.
- Kruglyak L.**, 1997. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature Genetics*, **17**(1):21–24.
- Lallias D.**, 2007. Genetic linkage mapping in the blue mussel *Mytilus edulis* and the European flat oyster *Ostrea edulis*, and the search for Quantitative Trait Loci of resistance to a disease in *O. edulis*. Phd dissertation, University of Wales, Bangor (UK).
- Lallias D., Arzul I., Heurtebise S., Ferrand S., Chollet B., Robert M., Beaumont A.R., Boudry P., Morga B. and Lapègue S.**, 2008. *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources*, **21**(4):423–439.
- Lallias D., Gomez-Raya L., Haley C.S., Arzul I., Heurtebise S., Beaumont A.R., Boudry P. and Lapègue S.**, 2009a. Combining two-stage testing and interval mapping strategies to detect QTL for resistance to bonamiosis in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biotechnology*, **11**(5):570–584.



- Lallias D., Stockdale R., Boudry P., Beaumont A.R. and Lapègue S.**, 2009b. Characterization of 27 microsatellite loci in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Molecular Ecology Resources*, **9**(3):960–963.
- Lallias D., Stockdale R., Boudry P., Beaumont A.R. and Lapègue S.**, 2009c. Characterization of 27 microsatellite loci in the European flat oyster *Ostrea edulis* - Corrigendum. *Molecular Ecology Resources*, **9**:1276.
- Lallias D., Taris N., Boudry P., Bonhomme F. and Lapègue S.**, 2010. Variance in the reproductive success of flat oyster *Ostrea edulis* L. assessed by parentage analyses in natural and experimental conditions. *Genetics Research*, **92**(3):175–187.
- Lander E.S. and Botstein D.**, 1989. Mapping mendelian factors underlying Quantitative Traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, **121**:185–199.
- Lapègue S., Taris N., Lallias D., Bonhomme F. and Boudry P.**, 2004. Impact of the reproduction dynamics on genetic variation in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Shellfish Research*, **23**(1):299–300.
- Launey S.**, 1998. Marqueurs microsatellites chez l’huître plate *Ostrea edulis* L. : Caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l’étude de populations naturelles. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris Grignon.
- Launey S. and Hedgecock D.**, 2001. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, **159**(1):255–265.
- Launey S., Barre M., Gérard A. and Naciri-Graven Y.**, 2001. Population bottleneck and effective size in *Bonamia ostreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genetical Research*, **78**(3):259–270.
- Launey S., Ledu C., Boudry P., Bonhomme F. and Naciri-Graven Y.**, 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *Journal of Heredity*, **93**(5):331–338.
- Le Bras Y., Dechamp N., Krieg F., Filangi O., Guyomard R., Boussaha M., Bovenhuis H., Pottinger T.G., Prunet P., Le Roy P. and Quillet E.**, 2011. Detection of QTL with effects on osmoregulation capacities in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bmc Genetics*, **12**.
- Leal S.M.**, 2003. Genetic maps of microsatellite and single-nucleotide polymorphism markers: Are the distances accurate? *Genetic Epidemiology*, **24**(4):243–252.
- Lefèvre T., Williams A.J. and de Roode J.C.**, 2011. Genetic variation in resistance, but not tolerance, to a protozoan parasite in the monarch butterfly. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **278**:751–759.

- Lepoittevin C., Frigerio J.M., Garnier-Géré P., Salin F., Cervera M.T., Vornam B., Harvengt L. and Plomion C., 2010. *In vitro* vs *in silico* detected SNPs for the development of a genotyping array: What can we learn from a non-model species? *PLoS ONE*, **5**(6):e11034.
- Lewontin R.C. and Krakauer J., 1973. Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*, **74**(1):175–195.
- Li L. and Guo X., 2004. AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Marine Biotechnology*, **6**(1):26–36.
- Li Z., Bai X., Ruparel H., Kim S., Turro N.J. and Ju J., 2003. A photocleavable fluorescent nucleotide for DNA sequencing and analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(2):414–419.
- Liaubet L., Lobjois V., Faraut T., Tircazes A., Benne F., Iannuccelli N., Pires J., Glenisson J., Robic A., Le Roy P., SanCristobal M. and Cherel P., 2011. Genetic variability of transcript abundance in pig peri-mortem skeletal muscle: eQTL localized genes involved in stress response, cell death, muscle disorders and metabolism. *Bmc Genomics*, **12**:17.
- Liu B.H., ed., 1998. *Genomics, linkage mapping and QTL analysis*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Liu H.C., Cheng H.H., Tirunagaru V., Sofer L. and Burnside J., 2001. A strategy to identify positional candidate genes conferring Marek's disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping. *Animal Genetics*, **32**(6):351–359.
- Liu Z.J. and Cordes J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, **238**:1–37.
- Lohrmann K.B., Hine P.M. and Campalans M., 2009. Ultrastructure of *Bonamia* sp. in *Ostrea chilensis* in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, **85**(3):199–208.
- Longwell A.C. and Stiles S.S., 1973. Oyster genetics and the probable future role of genetics in aquaculture. *Malacological Review*, **6**:151–177.
- Luikart G., England P.R., Tallmon D., Jordan S. and Taberlet P., 2003. *The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing*, vol. 4. Nature Publishing Group, London, ROYAUME-UNI.
- Lynch S.A., Wylde S., Armitage D.V., Mulcahy M.F. and Culloty S.C., 2005. The susceptibility of young, prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *Journal of Shellfish Research*, **24**(2):664.
- Lynch S.A., Armitage D.V., Coughlan J., Mulcahy M.F. and Culloty S.C., 2007. Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Experimental Parasitology*, **115**(4):359–368.

- Lynch S.A., Abollo E., Ramilo A., Cao A., Culloty S.C. and Villalba A., 2010. Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, **137**(10):1515–26.
- López-Flores I., Suárez-Santiago V.N., Longet D., Saulnier D., Chollet B. and Arzul I., 2007. Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. *Parasitology*, **134**(14):1941–1948.
- Ma X.F., Jensen E., Alexandrov N., Troukhan M., Zhang L., Thomas-Jones S., Farrar K., Clifton-Brown J., Donnison I., Swaller T. and Flavell R., 2012. High resolution genetic mapping by genome sequencing reveals genome duplication and tetraploid genetic structure of the diploid *Miscanthus sinensis*. *PLoS ONE*, **7**(3):e33821.
- Magennis B.A., Gosling E. and Wilkins N.P., 1983. Irish oyster populations: a historical and genetic study. *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science*, **83B**:291–299.
- Manly K.F. and Olson J.M., 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QT. *Mammalian Genome*, **10**(4):327–334.
- Mantel N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**(2 Part 1):209–220.
- Marteil L., 1976. La conchyliculture française 2<sup>ème</sup> Partie : Biologie de l’huître et de la moule. *Revue des Travaux de l’Institut des Pêches Maritimes*, **40**(2):149–346.
- Marth G.T., Korf I., Yandell M.D., Yeh R.T., Gu Z.J., Zakeri H., Stitzel N.O., Hillier L., Kwok P.Y. and Gish W.R., 1999. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nature Genetics*, **23**(4):452–456.
- Martin A.G., Gérard A., Cochenec N. and Langlade A., 1992. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae*: assessment of the resistance of a first selected generation. In *Production, environment and quality, Bordeaux Aquaculture 1992*.
- Martín-Gómez L., Villalba A. and Abollo E., 2012. Identification and expression of immune genes in the flat oyster *Ostrea edulis* in response to bonamiosis. *Gene*, **492**:81–93.
- Maynard Smith J. and Haigh J., 1974. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetical Research*, **23**(1):23–35.
- McGoldrick D.J. and Hedgecock D., 1997. Fixation, segregation and linkage of allozyme loci in inbred families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): Implications for the causes of inbreeding depression. *Genetics*, **146**(1):321–334.

- Mehrabian M., Allayee H., Stockton J., Lum P.Y., Drake T.A., Castellani L.W., Suh M., Armour C., Edwards S., Lamb J., Lulis A.J. and Schadt E.E., 2005. Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits. *Nature Genetics*, **37**(11):1224–1233.
- Mialhe E., Bachère E., Chagot D. and Grizel H., 1988a. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1979), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture*, **71**:293–299.
- Mialhe E., Boulo V., Elston R.A., Hill B., Hine M., Montes J., Mont J., Van Banning P. and Grizel H., 1988b. Serological and analysis of *Bonamia* in *Ostrea edulis* and *Tiostrea lutaria* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Aquatic Living Resources*, **1**:67–69.
- Michaelson J.J., Loguercio S. and Beyer A., 2009. Detection and interpretation of expression quantitative trait loci (eQTL). *Methods*, **48**(3):265–276.
- Miller M.R., Dunham J.P., Amores A., Cresko W.A. and Johnson E.A., 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*, **17**(2):240–248.
- Montes J., Anadón R. and Azevedo C., 1994. A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, **63**(1):1–6.
- Montes J., Ferro-Soto B., Conchas R.F. and Guerra A., 2003. Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. *Aquaculture*, **220**(1-4):175–182.
- Morga B., 2010. Etude des interactions hôte/parasite chez l’huître plate *Ostrea edulis* et son parasite *Bonamia ostreae*. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle.
- Morga B., Arzul I., Chollet B. and Renault T., 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish & Shellfish Immunology*, **26**(6):836–842.
- Morga B., Arzul I., Faury N., Segarra A., Chollet B. and Renault T., 2011a. Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an *in vitro* infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**:323–333.
- Morga B., Renault T., Faury N., Chollet B. and Arzul I., 2011b. Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during *in vitro* infection by the parasite *Bonamia ostreae*. *International Journal for Parasitology*, **41**:755–764.
- Morga B., Renault T. and Arzul I., 2012. New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish & Shellfish Immunology*, **32**(6):958–968.
- Morgan T.S. and Rogers A.D., 2001. Specificity and sensitivity of microsatellite markers for the identification of larvae. *Marine Biology*, **139**(5):967–973.

- Morgan T.S., Rogers A.D. and Iyengar A.**, 2000. Novel microsatellite markers for the European oyster *Ostrea edulis*. *Molecular Ecology*, **9**(4):495–497.
- Morin P.A., Luikart G. and Wayne R.K.**, 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**(4):208–216.
- Moriyama E.N. and Powell J.R.**, 1996. Intraspecific nuclear DNA variation in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, **13**(1):261–277.
- Morlais I. and Severson D.**, 2003. Intraspecific DNA variation in nuclear genes of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, **12**(6):631–639.
- Morton N.E.**, 1955. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, **7**(3):277–318.
- Mourton C., Boulo V., Chagot D., Hervio D., Bachère E., Mialhe E. and Grizel H.**, 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): *In vitro* system establishment. *Journal of Invertebrate Pathology*, **59**(3):235–240.
- Nachtomy O., Shavit A. and Yakhini Z.**, 2007. Gene expression and the concept of the phenotype. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*, **38**(1):238–54.
- Naciri Y., Vigouroux Y., Dallas J., Desmarais E., Delsert C. and Bonhomme F.**, 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)<sub>n</sub> and (AC/GT)<sub>n</sub> repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Mol Mar Biol Biotechnol*, **4**(1):83–9.
- Naciri-Graven Y., Martin A.G., Baud J.P., Renault T. and Gérard A.**, 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **224**(1):91–107.
- Naciri-Graven Y., Launey S., Lebayon N., Gérard A. and Baud J.P.**, 2000. Influence of parentage upon growth in *Ostrea edulis*: evidence for inbreeding depression. *Genetical Research*, **76**(2):159–168.
- Narcisi V., Arzul I., Cargini D., Mosca F., Calzetta A., Traversa D., Robert M., Joly J.P., Chollet B., Renault T. and Tiscar P.G.**, 2010. Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Diseases of Aquatic Organisms*, **89**(1):79–85.
- Nei M.**, 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, **106**(949):283–292.
- Nei M.**, 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Newkirk G.F. and Haley L.E.**, 1982. Progress in selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine ecology progress series*, **10**(1):77–79.

- Nielsen R., 2004. Population genetic analysis of ascertained SNP data. *Human genomics*, **1**(3):218–24.
- Nielsen R., Williamson S., Kim Y., Hubisz M.J., Clark A.G. and Bustamante C., 2005. Genomic scans for selective sweeps using SNP data. *Genome Research*, **15**(11):1566–1575.
- Nikula R. and Väinölä R., 2003. Phylogeography of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae) across Europe: a major break in the Eastern Mediterranean. *Marine Biology*, **143**(2):339–350.
- Nosil P., Funk D.J. and Ortiz-Barrientos D., 2009. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, **18**(3):375–402.
- Ødegård J., Baranski M., Gjerde B. and Gjedrem T., 2011. Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. *Aquaculture Research*, **42**:103–114.
- O.I.E., 2011. Manual of diagnostic tests for aquatic animals.
- Oleksiak M.F., Churchill G.A. and Crawford D.L., 2002. Variation in gene expression within and among natural populations. *Nature Genetics*, **32**(2):261–266.
- Opferman J.T., 2008. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ*, **15**(2):234–242.
- OSPAR, 2008. Case Reports for the OSPAR List of threatened and/or declining species and habitats. *OSPAR Biodiversity Series 2008/358*:261 pp.
- Page R.D.M., 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers.
- Paquotte P., 1986. La conchyliculture en Italie. Mission du 1er au 15 juin 1986. Étude Aquaculture Méditerranée. *Tech. rep.*, Ifremer.
- Pascual M., Martin A.G., Zampatti E., Coatanea D., Defosse J. and Robert R., 1991. Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. *Tech. rep.*, International council for the exploration of the sea, Mariculture committee.
- Patarnello T., Volckaert F.A.M.J. and Castilho R., 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, **16**(21):4426–4444.
- Peijnenburg K.T.C.A., Breeuwer J.A.J., Pierrot-Bults A.C. and Menken S.B.J., 2004. Phylogeography of the planktonic chaetognath *Sagitta setosa* reveals isolation in European seas. *Evolution*, **58**(7):1472–1487.

- Perrigault M., Tanguy A. and Allam B.**, 2009. Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX). *Bmc Genomics*, **10**:17.
- Perry G.M.L., Ferguson M.M. and Danzmann R.G.**, 2003. Effects of genetic sex and genomic background on epistasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Genetica*, **119**(1):35–50.
- Pfaffl M.W.**, 2003. Livestock transcriptomics: Quantitative mRNA analytics in molecular endocrinology. Habilitation, Faculty Center of Life and Food Sciences, Technische Universität München, Germany.
- Pfender W., Saha M., Johnson E. and Slabaugh M.**, 2011. Mapping with RAD (restriction-site associated DNA) markers to rapidly identify QTL for stem rust resistance in *Lolium perenne*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **122**(8):1467–1480.
- Pichot Y., Comps M., Tige G., Grizel H. and Rabouin M.A.**, 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae* Gen. N., SP. N., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **43**(1):131–140.
- Poder M., Auffret M. and Balouet G.**, 1983. Études pathologiques et épidémiologiques des lésions parasitaires chez *Ostrea edulis* L. - Premiers résultats d'une recherche prospective comparative chez les principales espèces de mollusques des zones ostréicoles de Bretagne Nord. In *Bases biologiques de l'aquaculture*, Ifremer, Montpellier, pp. 125–138.
- Prado-Alvarez M., Gestal C., Novoa B. and Figueras A.**, 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. *Fish & Shellfish Immunology*, **26**:72–83.
- Pritchard J.K., Stephens M. and Donnelly P.**, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**(2):945–959.
- Provan J. and Bennett K.D.**, 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**(10):564–571.
- Pépin J.F., Riou A. and Renault T.**, 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, **149**(2):269–276.
- Quesada H., Beynon C.M. and Skibinski D.O.**, 1995. A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation. *Mol Biol Evol*, **12**(3):521–4.
- Quilang J., Wang S.L., Li P., Abernathy J., Peatman E., Wang Y.P., Wang L.L., Shi Y.H., Wallace R., Guo X.M. and Liu Z.J.**, 2007. Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers. *Bmc Genomics*, **8**.

- Ranson G.**, 1967. Les espèces d'huîtres vivant actuellement dans le monde, définies par leurs coquilles larvaires ou prodissoconques. Étude des collections de quelques-uns des grands musées d'histoire naturelle. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **31**:127–274.
- Reeb C.A. and Avise J.C.**, 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: Mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics*, **124**(2):397–406.
- Reece K.S., Siddall M.E., Stokes N.A. and Burreson E.M.**, 2004. Molecular phylogeny of the haplosporidia based on two independent gene sequences. *J. Parasitol.*, **90**(5):1111–1122.
- Reis B.Y., Butte A.S. and Kohane I.S.**, 2001. Extracting knowledge from dynamics in gene expression. *Journal of Biomedical Informatics*, **34**(1):15–27.
- Renault T.**, 1996. Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**(2):551–561.
- Robert M., Garcia C., Chollet B., Lopez-Flores I., Ferrand S., Francois C., Joly J.P. and Arzul I.**, 2009. Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mol Cell Probes*, **23**(6):264–71.
- Rogier H., Hervio D., Boulo V., Clavies C., Hervaud E., Bachère E., Mialhe E., Grizel H., Pau B. and Paolucci F.**, 1991. Monoclonal antibodies against *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospera), an intrahaemocytic parasite of flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms*, **11**:135–142.
- Rombel I.T., Sykes K.F., Rayner S. and Johnston S.A.**, 2002. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. *Gene*, **282**(1-2):33–41.
- Ronaghi M.**, 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*, **11**:3–11.
- Rosenblum E.B. and Novembre J.**, 2007. Ascertainment bias in spatially structured populations: A case study in the Eastern fence lizard. *Journal of Heredity*, **98**(4):331–336.
- Rousset F.**, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**(4):1219–28.
- Rowley A.F. and Powell A.**, 2007. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific, or nonspecific? *Journal of Immunology*, **179**(11):7209–7214.
- Rozen S. and Skaletsky H.**, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, **132**:365–86.
- Rutherford K., Parkhill J., Crook J., Horsnell T., Rice P., Rajandream M.A. and Barrell B.**, 2009. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, **16**(10):944–945.
- Saavedra C. and Bachère E.**, 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture*, **256**(1-4):1–14.



- Saavedra C., Zapata C., Guerra A. and Alvarez G., 1993. Allozyme variation in european populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **115**(1):85–95.
- Saavedra C., Zapata C. and Alvarez G., 1995. Geographical patterns of variability at allozyme loci in the european oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **122**(1):95–104.
- Saitou N. and Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4):406–425.
- Sargent D., Passey T., Šurbanovski N., Lopez Girona E., Kuchta P., Davik J., Harrison R., Passey A., Whitehouse A. and Simpson D., 2012. A microsatellite linkage map for the cultivated strawberry (*Fragaria ananassa*) suggests extensive regions of homozygosity in the genome that may have resulted from breeding and selection. *TAG Theoretical and Applied Genetics*:1–12.
- Saulnier D., De Decker S. and Haffner P., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods*, **77**(2):191–197.
- Sauvage C., 2008. Développement de marqueurs moléculaires liés à la résistance à la mortalité estivale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* - Approche QTL. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle.
- Sauvage C., Bierne N., Lapègue S. and Boudry P., 2007. Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*, **406**(1-2):13–22.
- Sauvage C., Boudry P., de Koning D.J., Haley C.S., Heurtebise S. and Lapègue S., 2010. QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics*, **41**(4):390–399.
- Schadt E.E. and Lum P.Y., 2006. Reverse engineering gene networks to identify key drivers of complex disease phenotypes. *Journal of Lipid Research*, **47**(12):2601–2613.
- Schlotterer C., 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, **5**(1):63–69.
- Schott E.J., Pecher W.T., Okafor F. and Vasta G.R., 2003. The protistan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. *Experimental Parasitology*, **105**(3-4):232–240.
- Shapiro L. and Scherer P.E., 1998. The crystal structure of a C1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Current Biology*, **8**(6):335–338.
- Shifman S., Bell J.T., Copley R.R., Taylor M.S., Williams R.W., Mott R. and Flint J., 2006. A high-resolution single nucleotide polymorphism genetic map of the mouse genome. *PLoS Biol*, **4**(12):e395.

- Simpson J.T., Wong K., Jackman S.D., Schein J.E., Jones S.J.M. and Birol I.**, 2009. ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research*, **19**(6):1117–1123.
- Snyder M.J.**, 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **48**(4):529–547.
- Sobolewska H. and Beaumont A.R.**, 2005. Genetic variation at microsatellite loci in northern populations of the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **85**(4):955–960.
- Sobolewska H., Beaumont A.R. and Hamilton A.**, 2001. Dinucleotide microsatellites isolated from the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular Ecology Notes*, **1**(1-2):79–80.
- Spelman R.J. and van Arendonk J.A.M.**, 1997. Effect of inaccurate parameter estimates on genetic response to marker-assisted selection in an outbred population. *Journal of Dairy Science*, **80**(12):3399–3410.
- Tajima F.**, 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**(3):585–595.
- Takeuchi T., Kawashima T., Koyanagi R., Gyoja F., Tanaka M., Ikuta T., Shoguchi E., Fujiwara M., Shinzato C., Hisata K., Fujie M., Usami T., Nagai K., Maeyama K., Okamoto K., Aoki H., Ishikawa T., Masaoka T., Fujiwara A., Endo K., Endo H., Nagasawa H., Kinoshita S., Asakawa S., Watabe S. and Satoh N.**, 2012. Draft genome of the pearl oyster *Pinctada fucata*: A platform for understanding bivalve biology. *DNA Research*, **19**(2):117–130.
- Tanguy A., Bierne N., Saavedra C., Pina B., Bachère E., Kube M., Bazin E., Bonhomme F., Boudry P., Boulo V., Boutet I., Cancela L., Dossat C., Favrel P., Huvet A., Jarque S., Jollivet D., Klages S., Lapègue S., Leite R., Moal J., Moraga D., Reinhardt R., Samain J.F., Zouros E. and Canario A.**, 2008. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene*, **408**(1-2):27–36.
- Taris N., Lang R.P. and Camara M.D.**, 2008. Sequence polymorphism can produce serious artefacts in real-time PCR assays: hard lessons from Pacific oysters. *BMC Genomics*, **9**.
- Tarnowska K., Chenuil A., Nikula R., Feral J.P. and Wolowicz M.**, 2010. Complex genetic population structure of the bivalve *Cerastoderma glaucum* in a highly fragmented lagoon habitat. *Marine Ecology-Progress Series*, **406**:173–184.
- Tasumi S. and Vasta G.R.**, 2007. A Galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *The Journal of Immunology*, **179**(5):3086–3098.

- Thiel G., Al Sarraj J. and Stefano L.**, 2005. cAMP response element binding protein (CREB) activates transcription via two distinct genetic elements of the human glucose-6-phosphatase gene. *Bmc Molecular Biology*, **6**.
- Thiriou-Quévèreux C. and Ayraud N.**, 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. *Marine Biology*, **70**:165–172.
- Tige G., Grizel H., Rabouin M.A., Cochenec N., Audic G. and Langlade A.**, 1982. Maladie hémocytaire de l'huître plate causée par *Bonamia ostreae* : évolution de la situation épizootiologique en Bretagne au cours de l'année 1981. *Sciences et Pêche, Bull. Inst. Pêches Illarit.*, **328**.
- Tiscar P.G., Quaglio F., Della Salda L., Ceschia G., Delgado M.L. and Restani R.**, 2002. Presenza di *Bonamia ostreae* in ostriche piatte (*Ostrea edulis*) del Nord Adriatico. *Bollettino SIPI*, **35**:2–10.
- Uddin M.J., Cinar M.U., Grosse-Brinkhaus C., Tesfaye D., Tholen E., Juengst H., Looft C., Wimmers K., Phatsara C. and Schellander K.**, 2011. Mapping quantitative trait loci for innate immune response in the pig. *International Journal of Immunogenetics*, **38**(2):121–131.
- van Banning P.**, 1987. Further results of the *Bonamia ostreae* challenge tests in dutch oyster culture. *Aquaculture*, **67**(1-2):191–194.
- van Ooijen J.W.**, 2004. MapQTL 5: Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations.
- van Ooijen J.W.**, 2006. JoinMap 4: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations.
- Vasta G.R.**, 2009. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Micro*, **7**(6):424–438.
- Vasta G.R.**, 2012. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. In *Current topics in innate immunity II*, edited by J.D. Lambris and G. Hajishengallis, Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer New York, Advances in Experimental Medicine and Biology 946, pp. 21–36.
- Vera J.C., Wheat C.W., Fescemyer H.W., Frilander M.J., Crawford D.L., Hanski I. and Marden J.H.**, 2008. Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology*.
- Vercaemer B., Spence K.R., Herbinger C.M., Lapègue S. and Kenchington E.L.**, 2006. Genetic diversity of the European oyster (*Ostrea edulis* L.) in Nova Scotia: Comparison with other parts of Canada, Maine and Europe and implications for broodstock management. *Journal of Shellfish Research*, **25**(2):543–551.

- Verdugo R.A., Farber C.R., Warden C.H. and Medrano J.F.**, 2010. Serious limitations of the QTL/Microarray approach for QTL gene discovery. *Bmc Biology*, **8**:17.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M. and Eggen A.**, 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.*, **34**:275–305.
- Visscher P.M., Thompson R. and Haley C.S.**, 1996. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics*, **143**(2):1013–1020.
- Vitalis R., Dawson K. and Boursot P.**, 2001. Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection. *Genetics*, **158**(4):1811–1823.
- Wakasugi K. and Schimmel P.**, 1999. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science (New York, N.Y.)*, **284**(5411):147–51.
- Wang L.L., Song L.S., Zhao J.M., Qiu L.M., Zhang H., Xu W., Li H.L., Li C.H., Wu L.T. and Guo X.M.**, 2009. Expressed sequence tags from the zhikong scallop (*Chlamys farreri*): Discovery and annotation of host-defense genes. *Fish & Shellfish Immunology*, **26**(5):744–750.
- Wayne M.L. and McIntyre L.M.**, 2002. Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(23):14903–14906.
- Weir B.S. and Cockerham C.C.**, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**(6):1358–1370.
- West M.A.L., Kim K., Kliebenstein D.J., van Leeuwen H., Michelmore R.W., Doerge R.W. and Clair D.A.S.**, 2007. Global eQTL mapping reveals the complex genetic architecture of transcript-level variation in Arabidopsis. *Genetics*, **175**(3):1441–1450.
- Whitehead A. and Crawford D.L.**, 2006a. Variation within and among species in gene expression: raw material for evolution. *Molecular Ecology*, **15**(5):1197–1211.
- Whitehead A. and Crawford D.L.**, 2006b. Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(14):5425–5430.
- Williams G.C.**, ed., 1975. *Sex and evolution*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Wright S.**, 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**:323–354.
- Xu S.**, 2003. Theoretical basis of the Beavis effect. *Genetics*, **165**(4):2259–2268.
- Xue Q.G. and Renault T.**, 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**(3):155–163.

- Xue Q.G., Renault T., Cochenec N. and Gérard A.**, 2000. Separation of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes by density gradient centrifugation and SDS-PAGE characterisation of separated haemocyte sub-populations. *Fish & Shellfish Immunology*, **10**(2):155–165.
- Ytournel F.**, 2008. Déséquilibre de liaison et cartographie de QTL en population sélectionnée. Thèse de doctorat, AgroParisTech, Paris.
- Yu Z.N. and Guo X.M.**, 2003. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Biological Bulletin*, **204**(3):327–338.
- Yu Z.N. and Guo X.M.**, 2006. Identification and mapping of disease-resistance QTLs in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture*, **254**(1-4):160–170.
- Zhang L. and Guo X.**, 2010. Development and validation of single nucleotide polymorphism markers in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin by mining ESTs and resequencing. *Aquaculture*, **302**(1-2):124–129.
- Zhou R.N. and Hu Z.M.**, 2007. The development of chromosome microdissection and micro-cloning technique and its applications in genomic research. *Current Genomics*, **8**(1):67–72.

# Valorisations des travaux de thèse

Articles en premier auteur, en préparation :

**Harrang E., Lapègue S., Heurtebise S., Bierne N.** A high genetic load contributes to explain high protein diversity in a marine bivalve. (soumis à *Genetics*, révisions)

**Harrang E., Heurtebise S., Lapègue S.** QTL identification for survival to an experimentally induced bonamiosis infection in the European flat oyster *Ostrea edulis*. (en préparation)

**Harrang E., Faury N., Morga B., Gallerne C., Arzul I., Heurtebise S., Chollet B., Lapègue S.** An e-QTL approach to detect parts of the genome involved in the expression of candidate genes for resistance to bonamiosis in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. (en préparation)

**Harrang E., Lapègue S., Heurtebise S., Bierne N.** Nucleotide diversity and genetic structuration of an high gene flow marine bivalve. (en préparation)

Présentations orales lors de congrès :

**Harrang E., Arzul I., Lapègue S.**, 2009. Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la connaissance et l'amélioration de la résistance de l'huître plate à la bonamiose. Objectif de thèse. *Journées des doctorants Ifremer*. Brest, 14-15 oct. 2009.

**Harrang E., Chollet B., Faury N., Morga B., Arzul I., Heurtebise S., Lapègue S.**, 2010. An e-QTL approach to detect parts of the genome involved in the expression of candidate genes for resistance to Bonamiosis in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Annual Meeting of European NRLs for Mollusc Diseases*. Nantes, 24 mars 2010.

**Harrang E., Faury N., Morga B., Arzul I., Heurtebise S., Chollet B., Lapègue S.**, 2010. An e-QTL approach to detect parts of the genome involved in the expression of candidate genes for resistance to bonamiosis in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Congrès *EAS*. Porto (Portugal), 5-8 oct. 2010.

**Harrang E., Bierne N., Heurtebise S., Lapègue S.**, 2011. Diversité nucléotidique et structure génétique des populations d'un bivalve marin à fort flux génique, l'huître plate *Ostrea edulis*. Colloque *Petit Pois Déridé*. Toulouse, 29-31 août 2011.

Soumission acceptée pour une communication orale, mais mission annulée :

**Harrang E., Faury N., Morga B., Gallerne C., Arzul I., Heurtebise S., Chollet B., Lapègue S.**, 2011. An e-QTL approach to study the resistance to bonamiosis in the European

flat oyster, *Ostrea edulis*. Congrès *EAS*. Rhodes (Grèce), 18-21 oct. 2011.

Présentations orales lors de réunions de groupes de travail ou de projets européens :

**Harrang E., Arzul I., Lapègue S.**, 2009. Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la connaissance et l'amélioration de la résistance de l'huître plate à la bonamiose. Objectif de thèse. Projet Santé Animale. Ifremer, Nantes, 11 fév. 2009.

**Harrang E., Faury N., Morga B., Arzul I., Heurtebise S., Chollet B., Lapègue S.**, 2010. An e-QTL approach to detect parts of the genome involved in the expression of candidate genes for resistance to bonamiosis in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Projet européen Seafare. Porto (Portugal), 5 oct. 2010.

**Harrang E., Bierne N., Heurtebise S., Lapègue S.**, 2011. Diversité nucléotidique et structure génétique des populations d'un bivalve marin à fort flux génique, l'huître plate *Ostrea edulis*. Réunion ANR HiFlo. La Rochelle, 6-7 oct. 2011.

**Harrang E., Faury N., Morga B., Gallerne C., Arzul I., Heurtebise S., Chollet B., Lapègue S.**, 2011. An e-QTL approach to study the resistance to bonamiosis in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Projet européen Seafare. Cadix (Espagne), 16 décembre 2011.

Présentations de poster lors de congrès

**Harrang E.**, 2010. L'huître plate et la bonamiose, le combat inachevé. Sur la piste de l'eQTL... *Colloque des doctorants de 2ème année*. E.D. Gay Lussac, La Rochelle, 29 avril 2010.

**Harrang E., Bierne N., Heurtebise S., Morga B., Lapègue S.**, 2010. Fragmentation des populations naturelles d'*Ostrea edulis* : une adaptation locale de l'huître plate européenne ? *Colloque Ecologie 2010*. Montpellier, 2-4 sept. 2010.

**Harrang E., Faury N., Morga B., Gallerne C., Arzul I., Heurtebise S., Chollet B., Lapègue S.**, 2011. An e-QTL approach to study the resistance to bonamiosis in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *104th Annual Meeting of the National Shellfisheries Association*. Seattle, Washington (USA), 25-29 mars 2012.

Communications en co-auteur

**Heurtebise S., Harrang E., Lallias D. et Lapègue S.**, 2010. Bilan des productions expérimentales d'huîtres plates de 2005 à 2010 au Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade. *Rapport Interne/ AGSEA/LGP 2010-01*.

**Lapègue S., Heurtebise S., Harrang E., Morga B., Flahauw E., Sauvage C. et Boudry P.**, 2010. The use of SNPs in characterizing the oysters genomes and their resistance to pathogens. *European Aquaculture Society meeting*. Porto (Portugal), 2010.

**Lapègue S., Heurtebise S., Harrang E., Morga B., Flahauw E., Sauvage C. et Boudry P.**, 2010. SNPs detection and genotyping in oysters. *SNP workshop III Applications of SNP genotyping in non-model organisms*. Washington (USA), 22-24 march 2010.

**Lapègue S., Harrang E., Flahauw E., Heurtebise S., Klopp S., Martins F., Huvet A., Gayral P.** Development of SNP genotyping arrays in two non-model shellfish species. (en cours)



# Abstract

## **Contribution of molecular and cellular information to characterize the resistance of the European flat oyster to bonamiosis, and to detect signatures of natural selection**

The European flat oyster, an endemic species from European coasts, has been classified in the category of “endangered and/or declining species” since 2003. Indeed, the natural beds of this oyster, consumed since ancient times, have gradually been decimated by over-exploitation and by successive emergence of parasitic diseases. The parasite that causes the disease called bonamiosis has contributed to drastically reduce the French and European aquacultural production of flat oyster. Marine bivalve molluscs display two specificities that restrict possibilities to fight against diseases: they are grown in an open environment, and possess an innate immune system lacking in adaptive response. In this context, the selection of animals naturally resistant to bonamiosis is a very promising issue to revive the culture of the European flat oyster. To better understand the phenomenon of resistance against bonamiosis, several studies have focused on understanding the mechanisms of response of the flat oyster, and on the identification of genomic regions potentially involved in the mechanisms of disease resistance. In this context, the present work consisted in improving our understanding of the resistance of the European flat oyster against bonamiosis, and in better characterizing the genetic resources and the structuring of its natural populations.

Considering that the flat oyster is not a model organism, a preliminary genetic map was available for this species. It was therefore necessary to develop new molecular tools to optimize the coverage of its genome. SNP markers (single nucleotide polymorphism) have been developed by direct sequencing of PCR products and high-throughput sequencing.

To improve the understanding of resistance against bonamiosis, three experiments of infection with the parasite have been performed and used to characterize phenotypes of the oyster response at several study levels.

1– At the inter-family level, the objective was to detect genomic regions (QTL) associated with the mechanisms of response (survival/mortality) against bonamiosis in several families of oysters. This approach enabled to identify several genomic regions of interest shared between families, and new ones that had not yet been detected.

2– At the intra-family level, the objective was to detect genomic regions associated with the regulation of haemocytic activities (QTLs) or genes expression (eQTL) previously identified as potentially involved in the response to bonamiosis. This approach had never been used before on a bivalve mollusc. It has enabled to identify a positional correlation between the genomic regions involved in the survival or mortality to bonamiosis and those involved in the regulation of cellular or molecular responses.

3– At the inter-population level, the experiment aimed at detecting possible differential responses against bonamiosis between oysters from three natural populations geographically and ecologically distinct. This study has enabled to identify a possible adaptation of oysters from the bay of Quiberon to the parasitosis.

In order to improve the characterization of the natural resources of the European flat oyster, several populations covering the entire geographic range of the species were also studied. This

study confirmed the high nucleotide diversity of the flat oyster, assessing for the first time the overall genetic diversity of natural populations of a marine bivalve mollusc. This study also enabled to identify the genetic structure of populations, with coincidences between geographical discontinuities in allele frequencies of molecular markers under positive or divergent selection and biogeographical barriers.

Key words: European flat oyster, *Ostrea edulis*, bonamiosis, *Bonamia ostreae*, SNP markers, gene expression, haemocytic activity, linkage map, QTL, eQTL, natural populations, genetic diversity, genetic structure, natural selection.

# Résumé

## **Apport des informations moléculaires et cellulaires pour la caractérisation de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose, et pour la détection de signatures de la sélection naturelle**

L'huître plate européenne, espèce endémique des côtes européennes, est classée depuis 2003 dans la catégorie des « espèces menacées et/ou en déclin ». En effet, les gisements naturels de cette huître, consommée depuis l'antiquité, ont été progressivement décimés par la sur-exploitation et par l'émergence successive de maladies parasitaires. Le parasite responsable de la maladie nommée bonamiose a notamment contribué à réduire de façon drastique la part de l'exploitation de cette huître dans l'activité aquacole française, et européenne. Les mollusques bivalves marins présentent deux caractéristiques qui restreignent de fait le potentiel d'action pour lutter contre les maladies : ils sont cultivés en milieu ouvert, et possèdent un système immunitaire inné dépourvu de la capacité de réponse adaptative. Dans ce contexte, la sélection d'animaux naturellement résistants pour la bonamiose est une voie prometteuse pour la relance de la culture de l'huître plate européenne. Afin de mieux comprendre le phénomène de résistance à la bonamiose, plusieurs études se sont focalisées sur la compréhension des mécanismes de réponse de l'huître plate, et sur l'identification de régions génomiques potentiellement impliquées dans les mécanismes de résistance à la maladie.

Le présent travail de thèse se positionne dans ce contexte et consistait à améliorer la compréhension de la résistance de l'huître plate européenne vis-à-vis de la bonamiose, mais également à mieux caractériser la ressource génétique et la structuration de ses populations naturelles.

L'huître plate n'étant pas un organisme modèle, seule une carte génétique préliminaire était disponible chez cette espèce. Il a donc été nécessaire de développer de nouveaux outils moléculaires afin d'optimiser la couverture de son génome. Des marqueurs de type SNP (polymorphisme d'une seule base) ont ainsi été développés par séquençage de produits PCR et par séquençage à haut débit.

Afin d'améliorer la compréhension de la résistance à la bonamiose, trois expériences d'infection avec le parasite responsable de cette maladie ont été réalisées et ont permis de caractériser les phénotypes de réponse de l'huître plate à plusieurs échelles d'études.

1– À l'échelle inter-familiale, il s'agissait de détecter des régions du génome (QTL) associées aux mécanismes de réponse (survie / mortalité) à la bonamiose chez plusieurs familles d'huîtres. Cette approche a notamment permis d'identifier plusieurs régions génomiques d'intérêt communes entre les familles, et de nouvelles régions d'intérêt qui n'avaient pas encore été détectées.

2– À l'échelle intra-familiale, il s'agissait de détecter des régions génomiques associées à la régulation d'activités hématocytaires (QTL) ou à l'expression de gènes (eQTL) préalablement identifiés comme potentiellement impliqués dans la réponse à la bonamiose. Cette approche n'avait encore jamais été utilisée chez un mollusque bivalve. Elle a notamment permis de mettre en évidence une concordance positionnelle entre les régions génomiques impliquées dans la survie ou la mortalité à la bonamiose et celles impliquées dans la régulation des réponses cellulaires et/ou moléculaires.

3– À l'échelle inter-populationnelle, il s'agissait d'étudier un éventuel différentiel de réponse à la bonamiose chez des huîtres provenant de trois populations naturelles géographiquement et écologiquement distinctes. Cette étude a notamment permis d'identifier une possible adaptation à la parasitose des huîtres provenant de la baie de Quiberon.

Afin de mieux caractériser les ressources naturelles de l'huître plate européenne, plusieurs populations couvrant l'ensemble de l'aire de distribution de l'espèce ont également été étudiées. Cette étude a permis de confirmer la forte diversité nucléotidique de l'huître plate, en évaluant pour la première fois la diversité génétique globale des populations naturelles d'un mollusque bivalve marin. Cette étude a également permis d'identifier une structuration génétique des populations, avec coïncidence entre les discontinuités dans la distribution des fréquences alléliques des marqueurs moléculaires sous sélection positive ou divergente et les barrières biogéographiques.

Mots clés : Huître plate européenne, *Ostrea edulis*, bonamiose, *Bonamia ostreae*, marqueurs SNP, expression génique, activité hémocytaire, cartographie de liaison, QTL, eQTL, populations naturelles, diversité génétique, structure génétique, sélection naturelle.