



HAL
open science

Caractérisation génétique de l'effort reproducteur de l'huitre creuse, *Crassostrea gigas*, dans le cadre des mortalités estivales de juvéniles : approche QTL

Emilie Flahauw

► **To cite this version:**

Emilie Flahauw. Caractérisation génétique de l'effort reproducteur de l'huitre creuse, *Crassostrea gigas*, dans le cadre des mortalités estivales de juvéniles : approche QTL. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2013. Français. NNT : 2013LAROS406 . tel-01124316

HAL Id: tel-01124316

<https://theses.hal.science/tel-01124316>

Submitted on 6 Mar 2015

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

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences pour l'Environnement « Gay-Lussac »

IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (La Tremblade)

THÈSE
présentée par :
Emilie FLAHAUW

soutenue le 20 septembre 2013
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle
Discipline : Biologie des Organismes

**Caractérisation génétique de l'effort reproducteur de l'huître creuse,
Crassostrea gigas, dans le cadre des mortalités estivales de juvéniles :**

Approche QTL.

JURY :

Pascal FAVREL

Pascale LE ROY

Pascale GARCIA

Arnaud HUVET

Christopher SAUVAGE

Sylvie LAPEGUE

Professeur, Université de Caen Basse-Normandie, Rapporteur

Directrice de recherche, INRA, Rapporteur

Professeur, Université de La Rochelle, Examineur

Cadre de Recherche 2A, HDR, IFREMER, Examineur

Chargé de Recherche 2nde classe, PhD, INRA, Examineur

Cadre de Recherche 2B, HDR, IFREMER, Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Après tant d'heures consacrées à la préparation de ce manuscrit, le moment est venu de remercier tous ceux qui ont contribué (de près, de loin et même d'ailleurs...) à la réalisation de ce travail! J'ai attendu le dernier moment pour écrire cette partie parce que je pressentais l'émotion qui monterait en me remémorant ces 3 années (et un peu plus !) et qu'il fallait que je garde les idées claires de la première ligne de la page de garde jusqu'au point final du résumé.

Parce que sans financement, ce travail n'aurait pas pu être mené à bien, je tiens à remercier l'IFREMER et la Région Poitou-Charentes. Merci également à l'Agence Nationale de la Recherche d'avoir soutenu le projet GAMETOGENES dans lequel s'est inscrit ce sujet de thèse.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins de la Station IFREMER de La Tremblade. Je remercie Tristan Renault, responsable du LGP jusqu'à récemment, et Jean Prou, responsable de la Station, de m'avoir accueillie dans leur équipe.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Pascale Le Roy et Pascal Favrel de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir consacré une partie de leur été à lire mon manuscrit. Je remercie également Pascale Garcia d'avoir accepté de participer à ce jury. J'adresse un double merci à Arnaud Huvet et Christopher Sauvage qui ont fait partie de mon comité de thèse et ont répondu présents pour l'évaluation finale de ce travail.

Je souhaite remercier ma directrice de thèse, Sylvie Lapègue, qui m'a accordé sa confiance en acceptant ma candidature et dont les nerfs ont sûrement été mis à rude épreuve ces derniers mois sans qu'elle ne laisse rien paraître. A titre plus personnel, je la remercie de m'avoir conseillé de regarder « Sur la route de Madison » ! Merci également à Lionel Dégremont, qui a assuré le rôle de co-encadrant pendant les deux premières années de ma thèse, avant de s'accorder une parenthèse vendéenne ! Grâce à lui, j'ai appris tout ce qu'il fallait savoir sur l'élevage des huîtres. Malheureusement, je n'ai pas réussi à apprendre à compter les huîtres aussi rapidement que lui !

Je tiens à remercier très chaleureusement Philippe-Jacques Hatt qui aime partager son expérience et transmettre ses nombreuses connaissances. J'ai vraiment apprécié nos discussions et je garderai toujours le souvenir du bon accueil que lui et son épouse m'ont réservé lors de notre escale à Noirmoutier.

Le soutien administratif compte pour beaucoup dans la réussite d'un projet scientifique! Je tiens donc à remercier Martine pour les nombreuses commandes passées, Florence pour sa capacité à obtenir rapidement des références introuvables pour le commun des mortels, et, surtout, à Véronique pour la préparation des missions... pas toujours simple d'organiser le transport pour quelqu'un qui n'a pas le permis de conduire et ne veut pas prendre l'avion ! Merci également à Jeanne-Marie Bariche qui, depuis Nantes, s'est toujours montrée disponible pour répondre à mes premières questions concernant la mutuelle comme à mes dernières questions concernant la fin de mon contrat et dont je salue la grande humanité.

Sans un matériel biologique au top, ce travail n'aurait pas pu être accompli. Merci donc à toute l'équipe de l'écloserie pour l'intendance, la maintenance, la production de phytoplancton et les bons conseils! Un merci spécial à Elise qui a toujours été présente lorsqu'il fallait des bras supplémentaires pour les biopsies, les comptages ou les sorties en mer. Merci également à l'équipe de la nurserie de Bouin et plus particulièrement à Max, la nounou de mes bébés huîtres, pour son bon accueil et sa jovialité même si « on n'aura jamais la place pour caser tout ça ! ».

La force de l'équipe génétique, ce sont ses deux Super-Techniciens (oui oui, comme des Super-Héros... en mieux !). Il y a d'abord Florence : la rapidité de Bip-Bip associée à l'inventivité de Vil Coyote! Sans elle, mes huîtres n'auraient pas franchi le cap de la fixation avec succès : il fallait au moins l'intervention de la tornade Flo pour annuler les effets de la tempête Xynthia ! Merci également de m'avoir guidée pour ma première PCR : je m'en faisais une montagne mais, finalement, j'y ai pris goût ! Et puis, il y a Serge, mon colocataire pendant 3 ans : la sagesse d'Albus Dumbledore associée à la productivité d'Hermione Granger. Ce fut un réel plaisir de travailler à ses côtés, dans un calme apaisant ! Grâce à lui, j'ai pris conscience de mon addiction pour les post-it... de toutes les formes et de toutes les couleurs (et surtout plein de couleurs partout, tout le temps !)! Merci d'avoir su me faire une place parmi les cartons d'ordinateurs, les boîtes de logiciels et les collections d'échantillons !

Je tiens également à remercier les autres équipes de la Station : l'équipe « patho », et notamment Nicole et Philippe pour les commandes passées, parfois en urgence ; l'équipe de la cellule analytique, et notamment Bruno et Emmanuelle pour leurs nombreux conseils en histologie ; l'équipe du L'ER-PC et plus particulièrement Jean-Luc Seugnet, qui a piloté le bateau à chacune de mes sorties en mer et m'a toujours fait remonter à bord avant d'avoir de l'eau par-dessus mes cuissardes. Merci également à Sylvie Taillade dont les éclats de voix m'ont souvent fait sourire (ou sursauter !) et aux « anciens » dont l'humour et les anecdotes ont fait de chaque repas, un vrai moment de détente.

L'histologie ayant été une découverte, je tiens à remercier Arnaud (finalement, ce sera un triple merci !) qui m'a proposé de passer une semaine au L'PI de Brest pour apprendre à interpréter les lames d'histologie avec Virgile ! Merci donc à Virgile pour sa patience et la qualité de ses explications. Et merci à Pierre Boudry, responsable du L'PI, d'avoir accepté de m'accueillir ! Au cours de ces 3 ans, nous nous sommes rencontrés à plusieurs reprises et je reste impressionnée par sa culture et sa curiosité scientifiques !

Je tiens également à remercier les « non-ifremériens » qui ont contribué à mon travail de thèse : Armel Davenel et Stéphane Quellec, de l'IRSTEA de Rennes, pour leur investissement dans le projet « IRM des huîtres » même si « elles sont trop petites » ou qu'« elles coïncent la bulle » ; Frédéric Martins, de la plateforme de génotypage Genotoul, qui a formé Serge au génotypage des SNPs sur mes huîtres, et Christophe Boury, de la plateforme Genome Transcriptome de Bordeaux, qui a génotypé la deuxième série d'huîtres malgré des concentrations en ADN faibles, nulles voire négatives (oui oui, c'est un magicien !).

Ils n'ont été que de passage au L'GP mais leur contribution fut précieuse ! Merci à Philippe Laporte de m'avoir appris à « ouvrir les huîtres comme une fille ». Grâce à lui, je peux frimer un peu à Noël ! Merci à Tanguy et Caroline pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus au cours de ma première « grosse manip », merci aussi à François, qui m'a bien fait rire pendant le contrôle par la Gendarmerie au retour de Bouin... c'est vrai qu'il avait les yeux rouges mais c'était uniquement de la fatigue (contrairement aux accusations de Lionel, nous n'avions pas dormi pendant le trajet aller... à peine somnolé, peut-être, mais seulement quelques minutes !), c'est vrai que la vignette d'assurance n'était pas la bonne mais ce n'était pas sa faute ! Merci également à Cécile et Romain qui ont illuminé le labo de « bio mol » par leur gentillesse et leur joie de vivre... Et je garde le meilleur pour la fin, un énorme merci à mon stagiaire préféré, Brieg, qui a bien failli camper dans la salle du séquenceur et dont les petits post-it (encore eux !) m'ont manqué après son départ !

Un merci, peut-être original mais qui me tient à cœur, pour ce travail de thèse qui m'a amenée à repousser mes propres limites, que ce soit en touchant des animaux, en voyageant seule pour la première fois ou bien en prenant la parole en public. Ceux qui me connaissent savent à quel point tout cela est surprenant !

Quitter mon Nord natal n'a pas été facile mais, heureusement, dès mon arrivée en Charente maritime, j'ai rencontré des gens formidables ! Je tiens donc à remercier Marie-Claude et Claude, des agents immobiliers au grand cœur qui ont accordé leur confiance à un couple de « petits jeunes », ainsi que les adorables commerçants de la Presqu'île d'Arvert, Rosa et Dominique, pour leurs succulentes pizzas et José et Roselyne, pour leurs délicieux fruits et légumes en toute saison !

A Ronce-les-Bains, c'est bien connu, les rues ne sont pas vraiment peuplées pendant l'hiver ! J'ai pourtant eu la chance d'avoir des voisins exceptionnels : merci à la famille Plaza, sans qui je n'aurais jamais rencontré mon présentateur favori ; merci à Monsieur Moreau qui est capable de soutenir qu'il ne pleut jamais en Charente maritime avec un parapluie à la main ; et enfin, merci à Delphine, Dimitri, Margot et Yael pour nos longues discussions autour du grillage (les pauvres plants de tomates ont souffert de la soif pendant que nous plaisantions au lieu de les arroser !) et pour le « pets sitting » pendant les vacances !

Et bien sûr, il y a tous ceux qui m'ont encouragée dans ce projet fou malgré leur peine de me voir partir à 800km d'eux ! Un grand merci à MAdeline qui a quitté la recherche pour l'enseignement mais qui reste la seule personne de mon entourage à vraiment comprendre de quoi il s'agit quand je parle de QTL et de phénotypage... Merci d'être toujours présente, malgré la distance ! Merci également à mes trois autres « Emilie's Angels », Charlotte (alias Couz'd'Amour), Delphine (ma sœur) et Sophie (alias WonderWoman) qui m'ont aidée à mener de front la rédaction de ce manuscrit et la préparation du prochain grand événement de ma vie. Leurs idées, conseils, avis... m'ont permis d'avancer sans négliger mon travail !

Je suis très reconnaissante à mes beaux-parents qui ont toujours été d'un grand soutien malgré l'éloignement de leur fils unique ! Merci pour le bricolage, le jardinage, les nombreux déménagements, la recette du taboulé... votre présence le jour de ma soutenance !

Il ne sait pas lire mais son arrivée dans ma vie m'a permis de surmonter ma plus grande peur. Parce qu'il ne m'a jamais tenu rigueur de ma mauvaise humeur et que son regard de cocker peut suffire à me faire sourire, merci à Floyd !

Enfin, je dédie tout ce travail à ceux qui ont toujours cru en moi et sans qui je n'aurais jamais pu arriver jusqu'ici.

Tout d'abord, à mes parents qui m'ont apporté leur soutien financier et (surtout !) moral depuis ma naissance. J'ai compris en regardant autour de moi que ce n'était pas la règle mais une chance exceptionnelle ! Leur fierté est ma plus belle récompense ! Ces quelques lignes ne suffiront pas à leur exprimer toute ma gratitude.

Et je terminerai ces remerciements par celui qui partage ma vie depuis 11 ans (déjà ?!) : Mathieu qui m'a encouragée à postuler à cette offre de thèse. Je ne sais pas comment le remercier pour toutes les vaisselles, les passages d'aspirateur, les préparations de repas qu'il a assurés depuis le début de cette thèse (et encore plus vers la fin !), pour son soutien sans faille lorsque l'éloignement des miens devenait trop lourd à porter seule et surtout, pour sa demande en mariage inattendue mais profondément espérée, ce soir du 18 janvier 2012, sur le ponton de Ronce-les-Bains ! A deux, nous formons une équipe solide !

Pour conclure ces quelques pages, une pensée spéciale à Tata Sylvie qui, pour la première fois, n'a pas pu boire « une coupette » pour fêter ma réussite ! Tu me manques...

SOMMAIRE

Introduction générale	16
1. Dans un contexte de mortalités massives de naissain.....	17
2. Biologie de l'espèce.....	20
2.1. Systématique	20
2.2. Un cycle de vie marqué par les mortalités	20
2.3. Une anatomie tournée vers la reproduction	23
2.4. Une reproduction encore mystérieuse.....	24
2.4.1. Déterminisme sexuel.....	24
2.4.2. Développement de la gonade	26
2.4.3. Notion d'effort reproducteur	26
2.4.4. Lien avec les mortalités estivales	27
2.5. Génome.....	28
3. Recherche de QTLs chez les organismes marins.....	30
3.1. Principe de la recherche de QTLs.....	31
3.2. Caractères d'intérêt chez les espèces aquacoles.	34
3.3. QTLs détectés chez <i>Crassostrea Gigas</i>	34
4. Plan de la thèse	36
Partie I : De nouveaux outils pour caractériser l'effort reproducteur.....	39
1. Un matériel biologique particulier : les familles F2	39
1.1. Choix des grands-parents : la génération F0.	39
1.2. Production des parents : la génération F1.....	39
1.3. Production du matériel biologique de l'étude : la génération F2	40
1.3.1. Choix des géniteurs	40
1.3.2. Croisement	41
1.3.3. Obtention des gamètes et fécondation	43
1.3.4. Elevage larvaire.....	43
1.3.5. Micro-nurserie	44
1.3.6. Nurserie	45
1.3.7. Tests de survie	45
2. Nouveaux outils moléculaires : recherche des marqueurs et génotypage	46
2.1. Les marqueurs microsatellites	46
2.1.1. Choix des marqueurs	46
2.1.2. Génotypage des marqueurs microsatellites.....	49
2.1.3. Une utilisation des marqueurs microsatellites : l'assignation de parenté.....	52
2.2. Les marqueurs SNPs.....	53
2.2.1. Choix des marqueurs SNPs	53
2.2.2. Génotypage des marqueurs SNPs	54
2.2.3. Dosage de l'ADN par mesure de la fluorescence	54
2.2.4. Développement des marqueurs SNPs.....	54

3. Nouvelle technique de suivi de la gamétogenèse : l'Imagerie par Résonance Magnétique	79
3.1. Contexte.....	79
3.2. L'Imagerie par Résonance Magnétique	79
3.3. Validation de la technique d'Imagerie par Résonance Magnétique	81
3.3.1. Principaux résultats détaillés dans l'article 2	81
3.3.2. Correction des incertitudes	82
3.3.3. Article 2 : « Gonad volume assessment in the oyster <i>Crassostrea gigas</i> : Comparison between a histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method »	83
 Partie II : Caractérisation phénotypique des familles au cours de la gamétogenèse.....	91
1. L'histologie quantitative, une observation ponctuelle et destructive.....	92
1.1. Méthode.....	92
1.1.1. Préparation des lames.....	92
1.1.2. Analyse d'images	94
1.1.2.1. Analyse qualitative	94
1.1.2.2. Analyse quantitative.....	95
1.2. Résultats.....	96
1.2.1. Analyse qualitative des lames d'histologie.....	96
1.2.2. Analyse quantitative des lames d'histologie	96
2. L'Imagerie par Résonance Magnétique, un suivi temporel non destructif.	98
2.1. Principaux résultats détaillés dans l'article 3.....	98
2.2. Article 3 : Temporal monitoring of the gametogenesis in the Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> , by Magnetic Resonance Imaging (MRI).....	99
2.2.1. Introduction	100
2.2.2. Materials and methods	101
2.2.3. Results.....	105
2.2.4. Discussion and conclusions	112
 Partie III : Caractérisation génétique de l'effort reproducteur.....	120
1. Préambule	120
2. Article 4 : Détection de QTL de l'effort reproducteur chez l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	120
2.1. Introduction	120
2.2. Matériel et Méthodes.....	122
2.2.1. Matériel biologique	122
2.2.2. Suivi de la gamétogenèse par Imagerie par Résonance Magnétique	123
2.2.3. Analyse des images IRM	124
2.2.4. Observation de la gamétogenèse par histologie.....	125
2.2.5. Marqueurs moléculaires et génotypage	126
2.2.6. Cartographie génétique.....	126
2.3. Résultats.....	127

2.3.1. Suivi de la gamétogenèse par IRM	127
2.3.2. Suivi de la gamétogenèse par histologie	128
2.3.3. Marqueurs moléculaires et génotypage	129
2.3.4. Cartographie génétique.....	129
2.3.5. Détection de QTL.....	135
2.4. Discussion.....	142
2.5. Remerciements	144
2.6. Références	144
Partie IV : Contributions de cette étude à la caractérisation génétique de la réponse aux mortalités estivales	149
1. Préambule	149
2. Article 5 : Détection de QTL de réponse aux mortalités estivales chez l’huître creuse, Crassostrea gigas.	149
2.1. Introduction	149
2.2. Matériel et Méthodes.....	151
2.2.1. Matériel biologique	151
2.2.2. Suivi de la mortalité au cours d’un épisode de mortalité estivale.....	151
2.2.3. Mesure de la charge virale par PCR quantitative.....	152
2.2.4. Marqueurs moléculaires et génotypage sélectif.....	152
2.2.5. Cartographie génétique.....	153
2.2.6. Détection de QTL.....	153
2.3. Résultats.....	154
2.3.1. Suivi de la mortalité.....	154
2.3.2. Mesure de la charge virale	157
2.3.3. Marqueurs moléculaires et génotypage	157
2.3.4. Cartographie génétique.....	158
2.3.5. Détection de QTLs	163
2.4. Discussion.....	166
2.5. Remerciements	167
2.6. Références	167
Conclusion générale et Perspectives	172
1. Synthèse des résultats.....	172
1.1. Meilleure connaissance du caractère « effort reproducteur »	172
1.2. Meilleure connaissance génétique des caractères étudiés.....	174
1.2.1. Apport de cette étude à la connaissance du caractère « survie aux mortalités estivales ».....	174
1.2.2. Proximité des QTLs impliqués dans la survie et des QTLs impliqués dans l’effort reproducteur	175
2. Perspectives	178
2.1. La Nouvelle Génération de Séquençage.....	178
2.2. Apport du séquençage du génome de l’huître creuse	178

2.3. Utilisation des QTLs détectés dans un programme de sélection	179
Bibliographie hors articles.....	182
Annexe 1 : Extraction d'ADN avec le kit QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen.....	192
Annexe 2 : Protocole d'amplification de l'ADN par PCR en simplexe.....	193
Annexe 3 : Protocole d'amplification de l'ADN par PCR en multiplexe.....	194
Annexe 4 : Protocole de dosage de l'ADN par mesure de la fluorescence.....	195
Annexes 5 : Liste des 384 SNPs génotypés pour les articles 1 et 5.....	196
Annexe 6 : Annotation des 384 SNPs génotypés dans les articles 1 et 5	208
Annexe 7 : Préparation des lames d'histologie.....	215
Annexe 8 : Liste des 384 SNPs génotypés dans l'article 4	216
Valorisation des travaux de thèse.....	230
Abstract	232
Résumé.....	233

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Productions annuelles mondiale, européenne et française d'huîtres creuses, <i>Crassostrea gigas</i> , de 1950 à 2011.	16
Figure 2. Répartition des productions mondiale et européenne 2011 d'huîtres creuses, <i>Crassostrea gigas</i>	17
Figure 3. Mortalités moyennes d'huîtres creuses, <i>Crassostrea gigas</i> , de 1995 à 2012.....	18
Figure 4. Taux de mortalité des lignées « sensibles » et des lignées « résistantes » en comparaison à des lots d'huîtres témoins diploïdes et triploïdes.	19
Figure 5. Cycle de vie de <i>Crassostrea gigas</i>	22
Figure 6. Anatomie de l'huître creuse adulte.	23
Figure 7. Estimation semi-quantitative du pourcentage de surface gonadique déterminé par histologie d'huîtres « résistantes » et d'huîtres « sensibles » aux mortalités estivales D'après Samain et al. 2007.....	28
Figure 8. Estimation de la surface gonadique moyenne de 5 lignées d'huîtres « sensibles » et de 5 lignées d'huîtres « résistantes » aux mortalités estivales.....	28
Figure 9. Densité de distribution du polymorphisme chez <i>Crassostrea gigas</i> estimé par des fenêtres glissantes mais non-chevauchantes de 10 kb (Zhang et al., 2012).	30
Figure 10. Détection de QTL par la méthode "marqueur par marqueur".	32
Figure 11. Principe de détection d'un QTL par la méthode de cartographie d'intervalle.	33
Figure 12. QTLs impliqués dans la réponse aux mortalités estivales et la charge virale en virus OsHV-1.....	35
Figure 13. Réponse aux mortalités estivales en fonction de la date de mise sur estran des familles F1 ayant une descendance F2.....	41
Figure 14. Profils d'absorbance de 2 échantillons d'ADN distincts.	50
Figure 15. Dosage de l'ADN de 8 échantillons.	51
Figure 16. Exemples of clustering results obtained for the <i>Ostrea edulis</i> SNP array.	62
Figure 17. Illumina Functionality scores of the SNPs from the <i>C. gigas</i> and <i>O. edulis</i> arrays according to their in vitro or in silico origin.	64

Figure 18. Percentage of SNPs for which the genotyping failed, or that were considered as polymorphic or monomorphic according to their in vitro or in silico origin and for both arrays.....	65
Figure 19. Percentage of SNPs that were genotyped with success in relation with their Illumina Functionality score for both arrays.	66
Figure 20. Allele frequency spectrum for the 232 and 234 polymorphic SNPs genotyped respectively in <i>C. gigas</i> and <i>O. edulis</i> populations.	67
Figure 21. Use of assignment likelihood to distinguish between Likelihood of each pair of parents to be the real pair of each offspring (dot) considering the difference between the first and second more likely pair of parents.	68
Figure 22. Siemens Avanto 1,5T.....	80
Figure 23. Antenne tête utilisée pour homogénéiser le champ magnétique autour des huîtres.....	80
Figure 24. Système de plateaux conçu pour l'imagerie des huîtres.....	81
Figure 25. Images obtenues par IRM de deux huîtres creuses matures.	81
Figure 26. Corrélation entre la surface gonadique estimée sur les coupes histologiques et le volume gonadique estimé à partir des images IRM.....	82
Figure 27. Emplacement de la coupe histologique.....	93
Figure 28. Etapes de traitement d'une coupe histologique numérisée afin d'estimer le rapport gonado-somatique.	95
Figure 29. Sex-ratio des familles F2-19 et F2-21.....	96
Figure 30. Graphes des moyennes du rapport gonado-somatique pour les familles F2-19 et F2-21.....	97
Figure 31. Distributions du rapport gonado-somatique au sein des familles F2-19 et F2-21.	97
Figure 32. Distribution du rapport gonado-somatique en fonction du sexe au sein de la famille 19.	98
Figure 33. Description of the maturation stages based on MRI images..	106
Figure 34. Distribution of maturation stages over time.	107

Figure 35. Date of spawning for studied oysters in 2011 compared to date of spawning of standard oysters in 2011 and 2012.	108
Figure 36. Distribution of sex changes between 2011 and 2012.	109
Figure 37. Mortality rate in 2011 for studied and standard oysters.	111
Figure 38. Evolution of seawater temperature in 2011 and 2012.....	112
Figure 39. Production des familles expérimentales..	123
Figure 40. Carte génétique combinée de <i>Crassostrea gigas</i>	131
Figure 41. Cinétique de mortalité du naissain de 12 familles F2 au cours d'un épisode de mortalité estivale en août 2010.	154
Figure 42. Taux de mortalité de 12 familles F2 au cours d'un épisode de mortalité estivale survenu en août 2010 dans un bassin expérimental..	155
Figure 43. Taux de mortalité de 21 familles F2 au cours d'un épisode de mortalité estivale survenu en août 2010 sur estran..	156
Figure 44. Corrélation entre le taux de mortalité obtenu sur estran et le taux de mortalité obtenu en bassin expérimental au cours d'un épisode de mortalité estivale survenu en août 2010.....	156
Figure 45. Carte génétique combinée de <i>Crassostrea gigas</i>	160
Figure 46. Evolution du volume gonadique au cours des 6 sessions d'IRM de 2011 pour 6 individus (A, B, C, D, E et F) appartenant à la famille F2-18.....	173
Figure 47. Carte génétique combinée « Survie » et « Effort reproducteur ».....	176
Figure 48. Modélisation de l'effet d'un QTL dans un schéma de sélection classique (à gauche) et sur un schéma combiné (à droite)..	179

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Origine des familles F1	40
Tableau 2. Production des familles F2	42
Tableau 3. Taille de maille de tamis et opérations en salle d'élevage larvaire.	44
Tableau 4 Les marqueurs microsatellites multiplexés.....	47
Tableau 5. Les marqueurs microsatellites en simplexe (Pontreau, 2012).	48
Tableau 6. Caractéristiques des stades de maturité de la gonade de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	94
Table 7. Gender-related specificities	109
Tableau 8. Coefficients de corrélation de Pearson entre l'indice de chair et l'indice gonadique estimés par IRM sur la famille F218 et statistiques descriptives de l'indice gonadique.....	128
Tableau 9. Caractéristiques des cartes génétiques combinée (a) et des familles F2-18 (b), F2-19 (c) et F2-21 (d).	130
Tableau 10. Résultats des recherches de QTLs impliqués dans la gamétogenèse de l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> , sur les groupes de liaison (GL) des cartes des familles F2-18 (b), F2-19 (c) et F2-21 (d).....	138
Tableau 11. Statistiques descriptives de la charge virale pour les 3 familles F2 étudiées....	157
Tableau 12. Caractéristiques des cartes génétiques combinée (a) et des familles F2-18 (b), F2-19 (c) et F2-21 (d).	159
Tableau 13. Résultats des recherches de QTLs impliqués dans la réponse aux mortalités estivales de l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> , sur les groupes de liaison (GL) des cartes des familles F2-18 (b), F2-19 (c) et F2-21 (d).....	165

INTRODUCTION GENERALE

En 2011, la production mondiale d'huître creuse japonaise, *Crassostrea gigas*, s'est élevée à 4,4 millions de tonnes (FAO, 2013 et Figure 1). L'Asie est le 1^{er} producteur avec plus 96% de la production mondiale ; l'Europe arrive en 2^{ème} position avec environ 2,5%. La production française, avec ses 95 000 tonnes produites en 2011, représente 87% de la production européenne (Figure 2). L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est donc une espèce d'intérêt économique tant au niveau mondial qu'aux niveaux européen et français ; c'est pourquoi les mortalités massives de *C. gigas* sont étudiées depuis de nombreuses années.

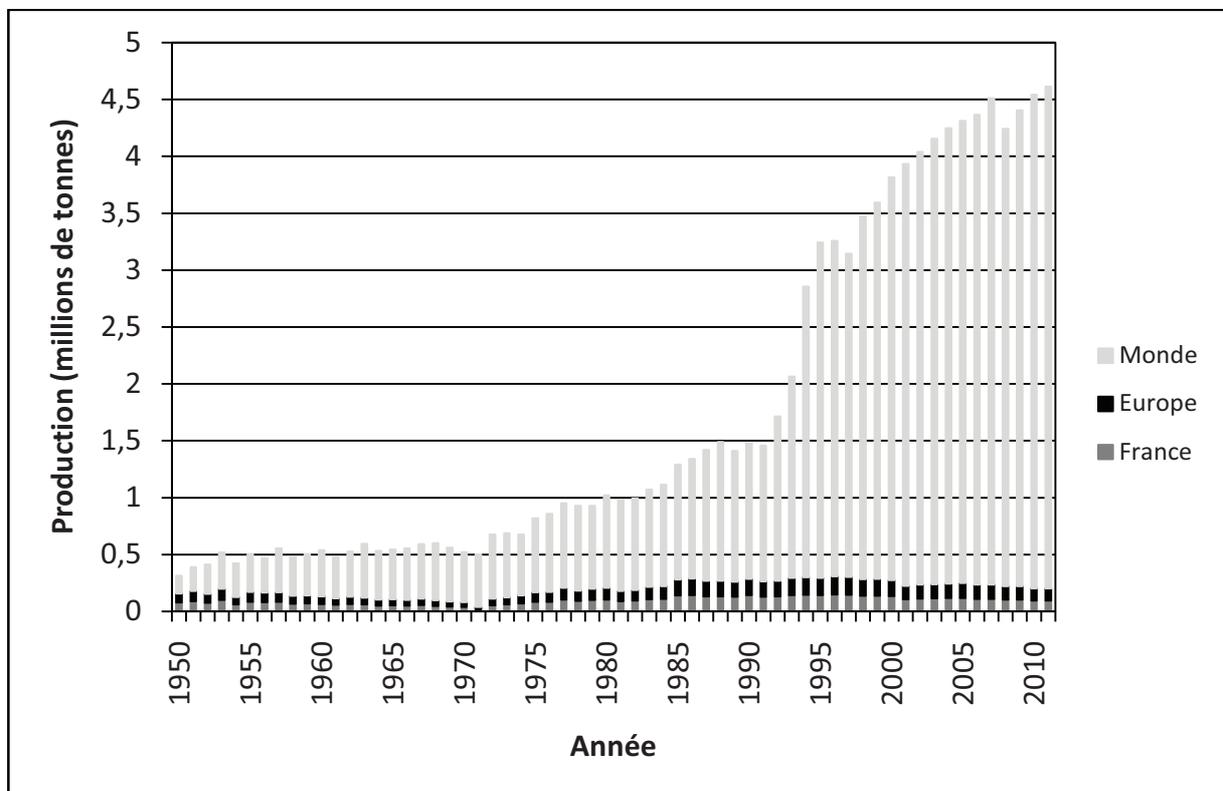


Figure 1. Productions annuelles mondiale, européenne et française d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, de 1950 à 2011 selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2013).

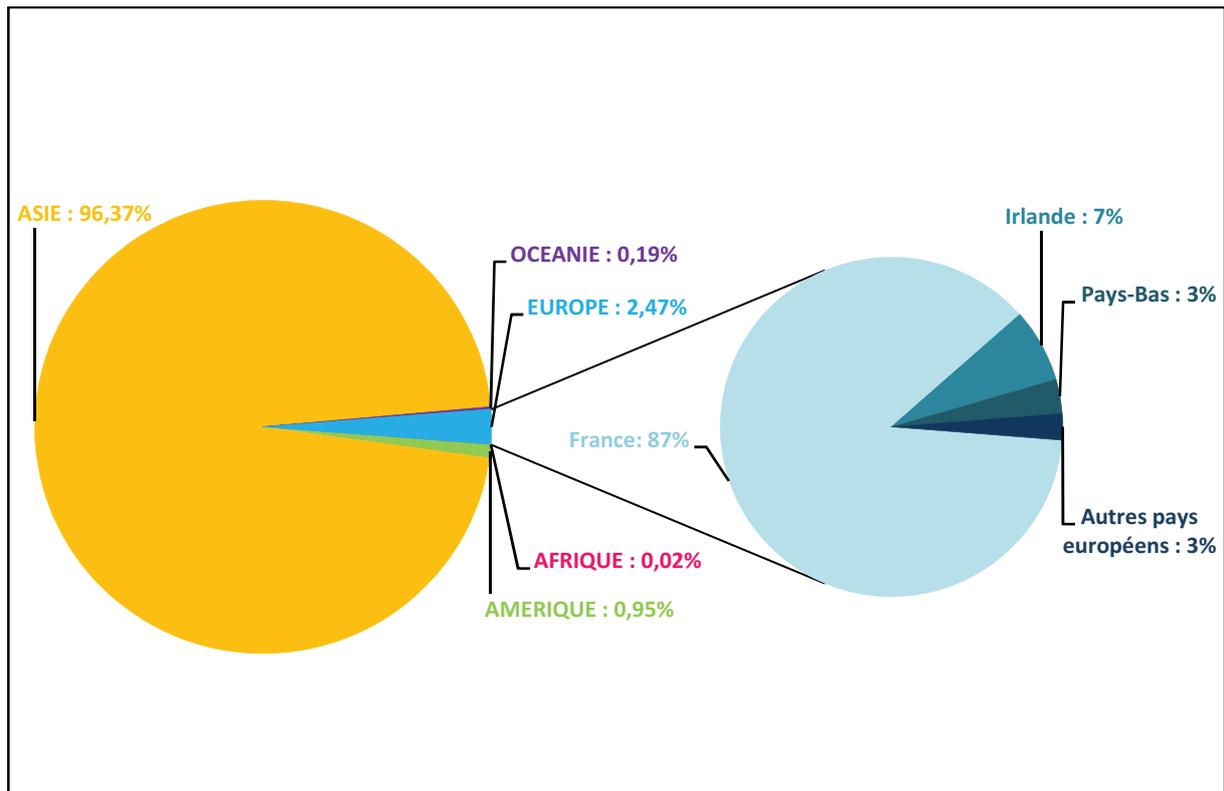


Figure 2. Répartition des productions mondiale et européenne 2011 d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, 2013).

1. Dans un contexte de mortalités massives de naissain

Les premières mortalités estivales d'huîtres creuses ont été enregistrées dès 1915 sur les côtes du Japon (Takeuchi et al., 1960). A la fin des années 1950, des mortalités estivales apparaissent sur la côte Ouest des Etats-Unis (Glude 1975; Mori 1979). Les mortalités sont alors associées à la surpopulation des bassins de productions aquacoles et aux conditions environnementales _ richesse en phytoplancton et température élevée de l'eau de mer (Lipovsky et Chew, 1972) _ en période de gamétogenèse (Beattie et al. 1980).

Sur les côtes françaises, des mortalités estivales ont été enregistrées dès les années 1980 (Maurer et al. 1986; Bodoy et al. 1990; Soletchnik et al. 1999). Des études sur ces mortalités ont mis en évidence qu'elles résultaient d'une conjugaison de facteurs environnementaux (température de l'eau et richesse en nutriments), infectieux (association de *Vibriosplendidus* et *Vibrioæstuarianus* dans de nombreux épisodes de mortalités estivales) et physiologiques (gamétogenèse, système immunitaire).

Depuis 2008, les mortalités estivales se sont accentuées et menacent essentiellement les juvéniles de *Crassostrea gigas*. Le renforcement du phénomène des mortalités estivales, nommée « mortalités massives », menace ce pan important de l'économie aquacole (Figure 3): selon le Conseil National Conchylicole, en France, 130 000 tonnes étaient produites chaque année jusqu'en 2009 mais, en 2010 et 2011, la production ne s'est élevée qu'à 80 000 tonnes (95000 selon l'organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture). Face à cet enjeu, les compétences scientifiques ont été mobilisées et ont déjà apporté de nombreuses réponses.

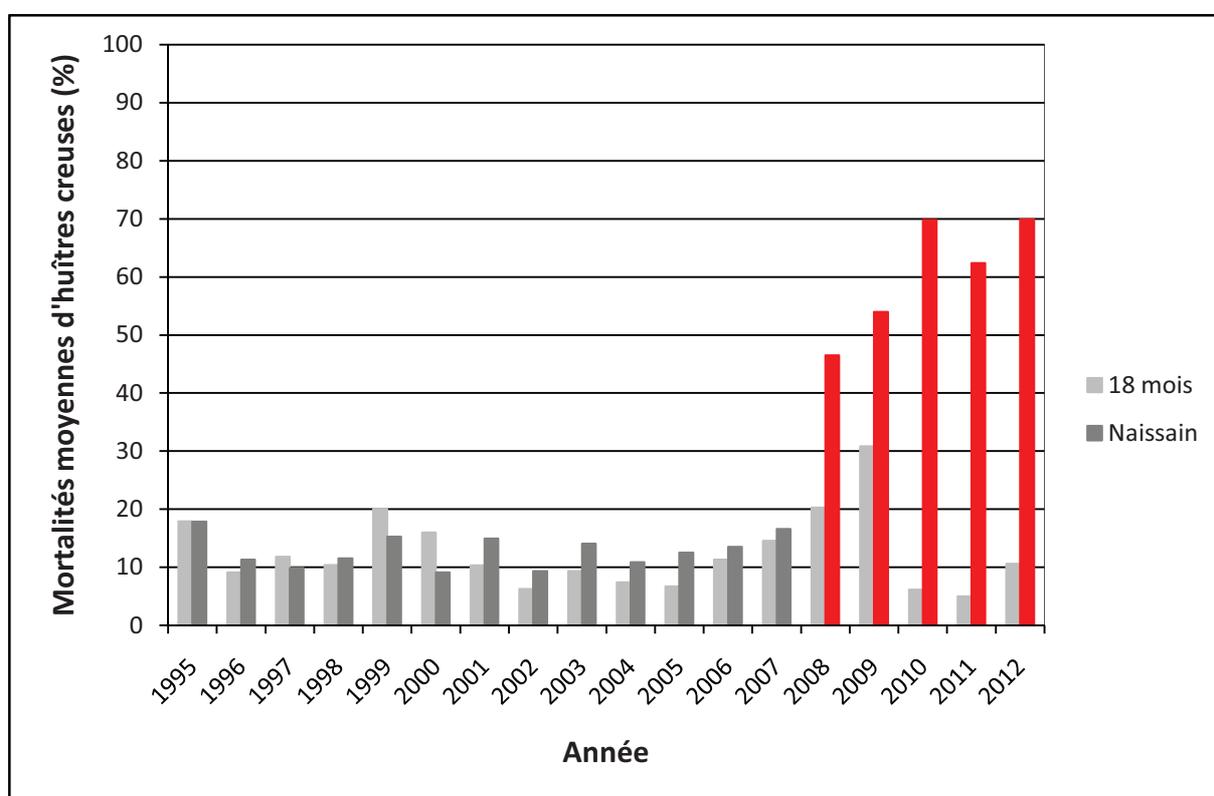


Figure 3. Mortalités moyennes d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, de 1995 à 2012. Depuis 2008 (en rouge), le taux de mortalité du naissain a significativement augmenté. Le calcul tient compte des données de mortalités d'huîtres diploïdes, triploïdes, issues de captage naturel et de production en éclosion. Le calcul des écarts-types étant biaisé par le changement de protocole entre 2008 et 2009, les écarts-types ne sont pas représentés. D'après les données des réseaux REMORA et RESCO – Ifremer.

En effet, au cours des épisodes de mortalités massives d'huîtres creuses juvéniles entre 2001 et 2003, une forte héritabilité de la survie _ comprise entre 0,47 et 1,08 _ a été mise en évidence (Dégremont et al., 2007 et 2010). Celle-ci résulte d'une forte composante génétique de la résistance/sensibilité à ce phénomène et a permis de sélectionner des

individus présentant un meilleur taux de survie, les lignées dites R, et d'autres un taux de survie plus faible, lignées dites S (Dégremont et al., 2010 et Figure 4). Plus récemment, le testage des lots contrastés et sélectionnés en 2001 confirme le différentiel de survie entre les lignées dans le contexte des mortalités massives du naissain observées depuis 2008 (Dégremont, 2011).

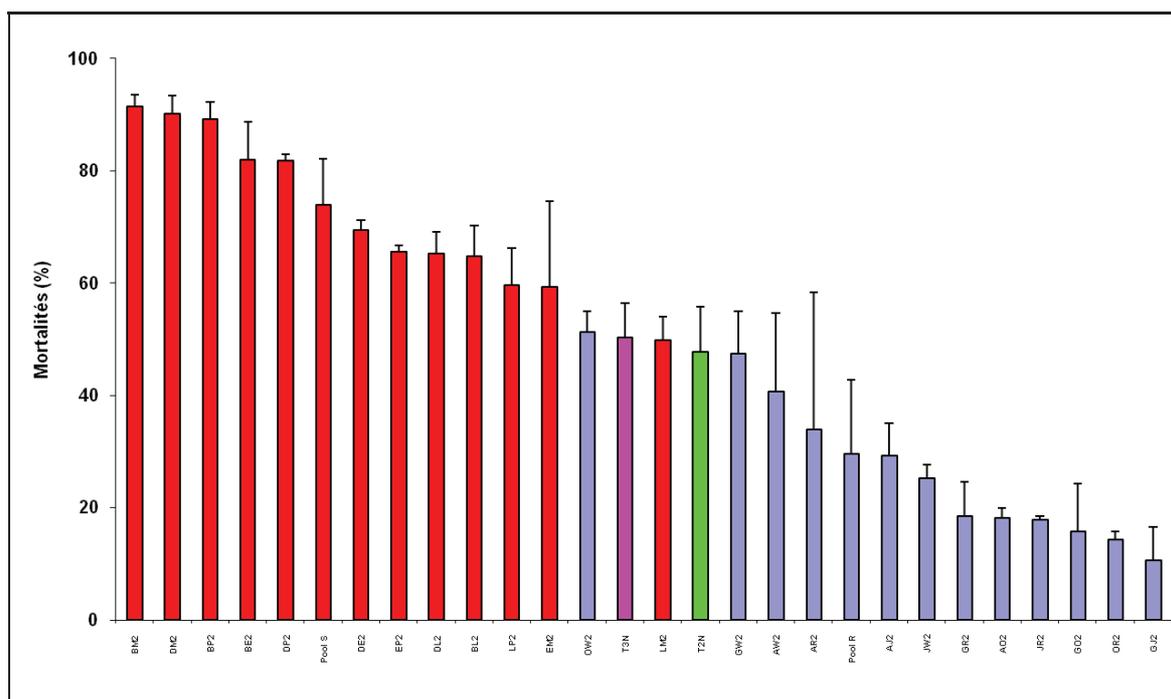


Figure 4. Taux de mortalité des lignées « sensibles » (en rouge) et des lignées « résistantes » (en bleu) en comparaison à des lots d'huîtres témoins diploïdes (en vert) et triploïdes (en rose).

Des agents pathogènes sont régulièrement impliqués dans les épisodes de mortalité de coquillages. En France, la bactérie *Vibrio splendidus* et le virus *Ostreid Herpes Virus 1* (OsHV-1) sont le plus souvent associés aux épisodes de mortalités massives d'huîtres creuses juvéniles (Lacoste et al., 2001 ; Le Roux et al., 2002 ; Dégremont, 2011; Garcia et al., 2011). L'OsHV-1 est un virus à ADN appartenant à la famille des Malacoherpesviridae (Davison et al., 2009). Il a été purifié à partir de larves de *Crassostrea gigas* infectées naturellement (Le Deuff et Renault, 1999) et son génome a été entièrement séquencé: il s'agit d'un ADN linéaire double brin de 207 kb codant au 124 gènes (Davison et al., 2005). Un variant d'OsHV-1, caractérisé par deux mutations non-synonymes au sein d'une même région codante du génome, semble être impliqué dans l'amplification du phénomène des

mortalités estivales observée depuis 2008 : l'*OsHV-1* μ var (Segarra et al., 2010). Dégremont et al. (2011) ont démontré que les individus sélectionnés R sont capables de ralentir l'augmentation de la charge virale en *OsHV-1* dans leurs tissus puis de la faire régresser sous le seuil technique de détection du virus par PCR quantitative.

Actuellement, les recherches concernent essentiellement les mortalités estivales massives de juvéniles. Cependant, il existe des mortalités à toutes les étapes du cycle de vie.

2. Biologie de l'espèce

2.1. Systématique

L'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est couramment appelée huître creuse du Pacifique ou huître japonaise. Il s'agit d'un mollusque bivalve dont la position systématique a été définie par Grassé (1960) de la façon suivante :

Règne	<i>Animalia</i>	Etre vivant hétérotrophe, qui se nourrit de substances organiques
Embranchement	<i>Mollusca</i>	Animal invertébré, masse viscérale protégée par un manteau sécrétant une coquille calcaire
Classe	<i>Bivalvia</i>	Coquille composée de deux parties distinctes, les valves, réunies par une charnière en permettant l'ouverture.
Ordre	<i>Filibranchia</i>	Filaments des branchies à jonctions ciliaires
Sous-ordre	<i>Pteriomorphia</i>	Coquille sessile (fixée à un substrat dur) et charnière dysodonte (dépourvue de dents)
Super famille	<i>Ostreoidea</i>	Coquille inéquivalve
Famille	<i>Ostreidae</i>	Valve gauche plus profonde que la droite
Genre	<i>Crassostrea</i>	Valve gauche creuse, espèce dioïque
Espèce	<i>gigas</i>	

2.2. Un cycle de vie marqué par les mortalités

Le cycle de vie de l'huître creuse (Figure 5) se compose de deux phases caractérisées par une différence d'habitat : la phase larvaire est pélagique (la larve se déplace dans la colonne d'eau) tandis que le reste de la vie est benthique (à partir du stade juvénile, l'individu vit fixé sur un substrat). Dès la première année du cycle de vie, les individus entrent en gamétogenèse. Lorsque les conditions de température et de nourriture sont suffisantes, les gonades arrivent à maturité au début de l'été. L'huître creuse étant ovipare,

les gamètes mâles et femelles sont émis dans le milieu pour donner lieu à la fécondation externe.

Au bout de 24h, la larve est protégée par une coquille dont la forme lui vaut le nom de « larve D » ; elle se nourrit et se déplace grâce à son velum. Au cours des premières semaines de vie, la qualité des gamètes peut être à l'origine d'anomalies chromosomiques ou de malformations. Les larves sont également très sensibles à la qualité de l'eau et aux agents pathogènes qui peuplent le milieu. Les huîtres connaissent donc d'importantes mortalités précoces aussi bien dans leur milieu naturel (Korringa, 1946 cité par Plough et Hedgecock, 2011) que dans un milieu contrôlé (Guo and Allen, 1994 cité par Plough et Hedgecock, 2011). Plough et Hedgecock (2011) estiment à 98% le taux de mortalité au cours des 60 premiers jours de vie.

En conditions favorables, la larve se développe pendant 2 à 3 semaines et atteint le stade « larve œillée » lors de la formation d'une tâche noire _ « l'œil » _ au milieu de la coquille de la larve qui signale l'approche de la métamorphose. En parallèle, on voit également le développement d'un « pied » qui servira à chercher le substrat le plus propice à la fixation de la larve, nommée pédivéligère. Comme pour bon nombre d'espèces, la métamorphose est une phase critique pour la survie des individus. En ce qui concerne les huîtres, si la difficulté à trouver le substrat qui servira de support à la croissance peut être source de mortalités, il a également été démontré que des régions du génome pouvaient être à l'origine de mortalités, essentiellement au moment de la métamorphose (Plough et Hedgecock, 2012).

Une fois ce substrat trouvé, la larve initie sa métamorphose : c'est la fin de la vie pélagique. Le stade juvénile est atteint lorsque l'individu ressemble à un adulte miniature. Il va donc poursuivre sa croissance et pourra produire des gamètes dès sa première année si les conditions environnementales le permettent (Normand et al., 2009). A ce stade, les individus sont menacés par les mortalités estivales, qui ne sont pas les plus importantes dans le cycle de vie de l'espèce, mais qui sont les plus visibles et qui ont le plus de conséquences sur les établissements ostréicoles.

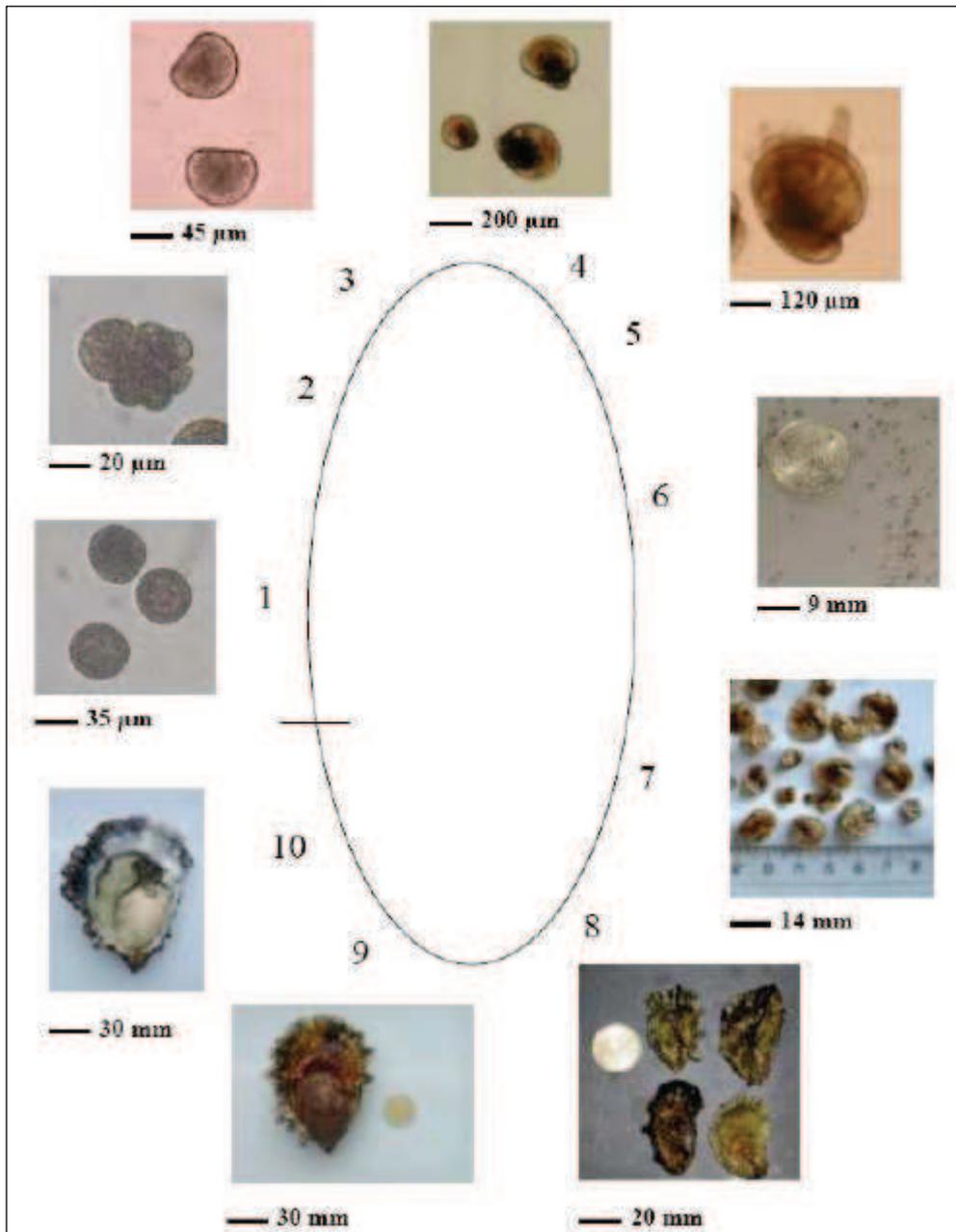


Figure 5. Cycle de vie de *Crassostrea gigas*. 1- Fécondation :ovocyte en présence de spermatozoïdes. 2- Embryon stade morula (2-3h). 3- Larves D(24h). 4- Larves véligères (14 jours). 5- Larve pêdivéligère (18 jours). 6- Naissains post-fixation (1 mois). 7- Naissains (2 mois). 8- Naissains (6 mois). 9- Adulte (10 mois). 10- Géniteur mature (10 mois). (D'après Dégremont, 2003).

2.3. Une anatomie tournée vers la reproduction

L'anatomie de l'huître creuse adulte est représentée sur la Figure 6. Comme chez tous les mollusques, la masse viscérale de l'huître est protégée par un manteau composé de deux lobes. Celui-ci sécrète une coquille calcaire composée de deux valves asymétriques: la droite est plate tandis que la gauche est creuse pour contenir la masse viscérale. Ces deux valves sont réunies par une charnière et le muscle adducteur assure l'ouverture et la fermeture de la coquille.

Le manteau filtre les éléments nutritifs afin que l'huître puisse se nourrir. Il forme la cavité palléale qui renferme les orifices anal et rénaux ainsi que les branchies qui retiennent les éléments nutritifs. Les branchies assurent également la fonction de respiration en absorbant l'oxygène dissout dans l'eau.

La fonction de reproduction n'est quant à elle pas assurée par un organe permanent. En effet, les gamètes s'organisent en un tissu diffus et temporaire, la gonade, dont le développement se réalise au cours d'un cycle annuel. Le volume de la gonade varie énormément d'un individu à l'autre, et même entre deux saisons de reproduction pour un même individu. Il peut parfois représenter plus de la moitié du volume total de l'animal.

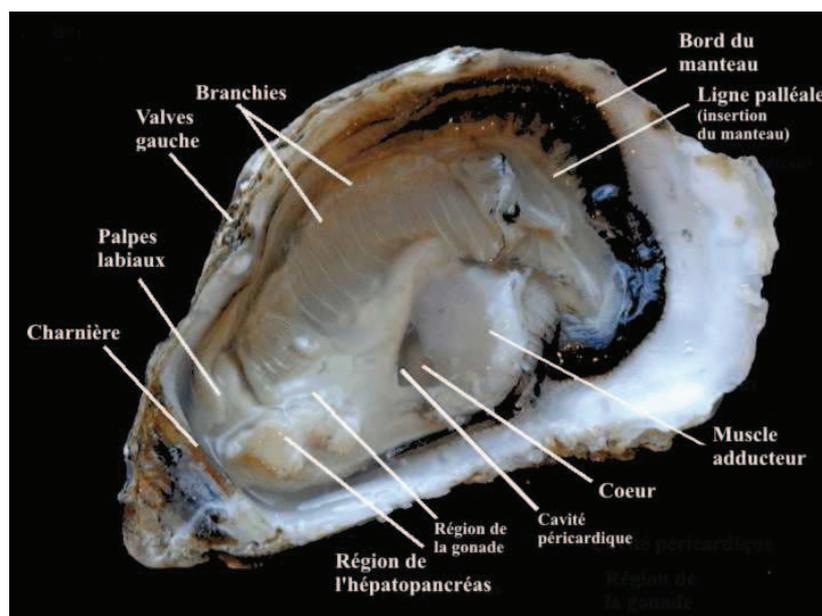


Figure 6. Anatomie de l'huître creuse adulte (Ifremer).

2.4. Une reproduction encore mystérieuse

La reproduction de l'huître creuse est un caractère complexe : si la gamétogenèse a déjà fait l'objet de nombreuses études, le déterminisme sexuel, quant à lui, n'est que peu décrit et toujours source de contradictions (Yusa et al., 2007 ; Hedrick et Hedgecock, 2010).

2.4.1. Déterminisme sexuel

La reproduction de l'huître creuse se caractérise par un hermaphrodisme alterné (Galtsoff, 1964; Le Dantec, 1968): un même individu peut être mâle et femelle au cours de sa vie. Le plus souvent, cet hermaphrodisme est de type protandre car les individus produisent généralement des gamètes mâles au cours des premiers cycles de gamétogenèse puis produisent des gamètes femelles dans la seconde partie de leur vie (Buroker, 1983). Lango-Reynoso (1999) a estimé que 50% des huîtres ont la capacité de changer de sexe, majoritairement dans le sens mâle puis femelle. Dans une moindre mesure, des femelles peuvent devenir mâles au cours de la gamétogenèse suivante. Des hermaphrodites synchrones (individus présentant simultanément des gamètes mâles et femelles) ont également été observés (Galtsoff, 1964).

Contrairement aux espèces pour lesquelles la présence de chromosomes sexuels confirme le déterminisme génétique du sexe des individus, le déterminisme sexuel de *C. gigas* est encore mal connu. Il semblerait cependant qu'il soit soumis aux conditions environnementales telles que la quantité de ressources organiques mise à disposition _ les mâles prédominant en conditions de manque de nourriture (Steele et Mulcahy, 1999) et les ressources abondantes favorisant le développement d'une gonade femelle (Enriquez-Diaz, 2004)_ ou la température de l'eau _ les mâles prédominant à basse température (Fabioux et al., 2005). L'hypothèse d'un déterminisme physiologique semblerait donc concorder avec ses observations puisqu'il a été décrit une plus forte capacité de stockage des ressources énergétiques (Deslous-Paoli et Héral, 1988 ; Soletchnik et al., 1997) et une croissance plus importante (Baghurst et Mitchell, 2002) des huîtres creuses femelles.

Des études sur des croisements contrôlés ont fait apparaître que des facteurs génétiques pouvaient également influencer le déterminisme sexuel (Hedrick et Hedgecock, 2010) :

- Haley (1977 et 1979, Hedrick et Hedgecock, 2010) proposait un modèle à 2 allèles, m , à l'origine du sexe mâle, et f , à l'origine du sexe femelle, pour 3 loci (6 allèles au total) :
 - les individus [$6m : 0f$], [$5m : 1f$], [$4m : 2f$] et [$3m : 3f$] seraient obligatoirement des mâles,
 - les individus [$2m : 4f$] et [$1m : 5f$] seraient des hermaphrodites alternés à tendance protandres,
 - les individus [$0m : 6f$] seraient obligatoirement des femelles.
- Guo et al. (1998) proposaient un modèle plus simple où le sexe serait déterminé par deux génotypes à un seul locus :
 - les individus [FM] seraient obligatoirement mâles,
 - les individus [FF] pourraient être mâles ou femelles.
- Hedrick et Hedgecock (2010) ont alors proposé un modèle alternatif à 3 génotypes pour un locus :
 - les individus [MM] seraient obligatoirement mâles,
 - les individus [FF] seraient obligatoirement femelles,
 - les individus [FM] seraient soit mâles, soit femelles.

Ces modèles ne permettant pas d'expliquer les observations de différents jeux de données laissent à penser que le déterminisme génétique du sexe ne reposerait pas sur un seul gène : une recherche de QTL avait révélé qu'un groupe de liaison se comporterait comme un chromosome sexuel et serait accompagné de 6 autres régions du génome réparties sur 5 autres groupes de liaison (Hedrick et Hedgecock, 2010). Cependant, Guo et al. (2012) n'ont détecté qu'un seul QTL potentiellement impliqué dans le déterminisme du sexe, confirmant l'hypothèse d'un modèle à un gène majeur.

2.4.2. Développement de la gonade

Plusieurs échelles ont été proposées pour décrire le développement de la gonade de *C. gigas* (Mann, 1979 cité et modifié par Steele et Mulcahy, 1999 et Normand et al., 2009) :

- En hiver, la gamétogenèse s'initialise mais la gonade n'est pas encore observable (stade 0)
- Au printemps, la gamétogenèse entre dans sa phase active. Au début, le tissu conjonctif est encore abondant mais les gonies, cellules germinales immatures, apparaissent (stade 1). Puis, par méiose, les oogonies donnent des ovocytes et les spermatogonies donnent des spermatocytes (stade 2). A ce stade, la gonade gagne en volume.
- En été, les gamètes arrivent à maturité (stade 3) et sont libérés dans l'eau de mer soit partiellement (stade 4 de Steele et Mulcahy, 1999), soit totalement (stade 4 de Normand et al., 2009 ; stade 5 de Steele et Mulcahy, 1999). Une fois la majorité des gamètes émis (stade 6 de Steele et Mulcahy, 1999), les hémocytes infiltrent le tissu gonadique et les gamètes résiduels sont éliminés par cytolysse ; on parle alors de résorption ou d'atrésie (stade 7 de Steele et Mulcahy, 1999).
- En automne, la résorption gonadique permettrait de reconstituer les réserves énergétiques afin d'alimenter d'autres fonctions physiologiques (Pouvreau et al., 2006) ou de préparer la gamétogenèse suivante (Lango-Reynoso, 1999).

2.4.3. Notion d'effort reproducteur

La théorie des budgets d'énergie dynamiques (DEB, Kooijman, 2000) a mis en évidence que, pour chaque être vivant, l'énergie apportée par la nourriture est répartie entre trois grandes fonctions : la survie, la croissance et la reproduction. L'effort reproducteur correspond donc à la fraction de cette énergie allouée à la reproduction, aux dépens des deux autres fonctions.

Chez les Mollusques, on considère que le volume de la gonade reflète l'investissement énergétique dans la reproduction. Chez l'huître, l'effort reproducteur peut être estimé par le calcul de l'occupation gonadique (ou Rapport Gonado-Somatique : RGS) proposé par Normand et al. (2009) à partir de la relation décrite par Enriquez-Diaz (2004). Il s'agit en effet du rapport de la surface gonadique (SG) sur la surface de la masse viscérale (SMV) estimées sur une coupe histologique dont la préparation sera détaillée dans la suite du manuscrit.

$$RGS = \frac{SG \times 100}{SMV}$$

L'huître creuse peut investir jusqu'à 65% de son budget énergétique annuel dans la reproduction, ce qui est considérable si on la compare à d'autres bivalves (Van der Veer et al., 2006). L'émission des gamètes peut quant à elle représenter une perte de poids frais de l'ordre de 62% (Deslous-Paoli et Héral, 1988).

2.4.4. Lien avec les mortalités estivales

Etant donné l'interdépendance de la survie et de la reproduction et étant donné la part importante de l'allocation énergétique à la reproduction, les huîtres creuses sont donc plus vulnérables en période de gamétogenèse active (Soletchnik et al., 1997). Or, les mortalités estivales surviennent à cette période (Cheney et al., 2000). Il n'est donc pas surprenant qu'une corrélation soit apparue entre le niveau d'effort reproducteur et la réponse aux mortalités estivales : des lignées sélectionnées pour leur résistance (R) ou leur sensibilité (S) aux mortalités estivales présenteraient des niveaux d'effort reproducteur différents (Samain et al., 2007 ; Figure 7). En effet, les individus résistants aux mortalités estivales présenteraient un investissement reproducteur plus modeste que les individus sensibles (Huvet et al., 2010 ; Figure 8). De plus, les individus sensibles auraient tendance à émettre partiellement leurs gamètes tout au long de la période favorable à la reproduction tandis que les individus résistants se contenteraient d'un seul épisode de ponte par saison de reproduction (Samain et al., 2007 ; Figure 7). Il apparaît donc important de comprendre

les relations, notamment génétiques, sous-jacentes à ces observations et donc, de caractériser l'effort reproducteur.

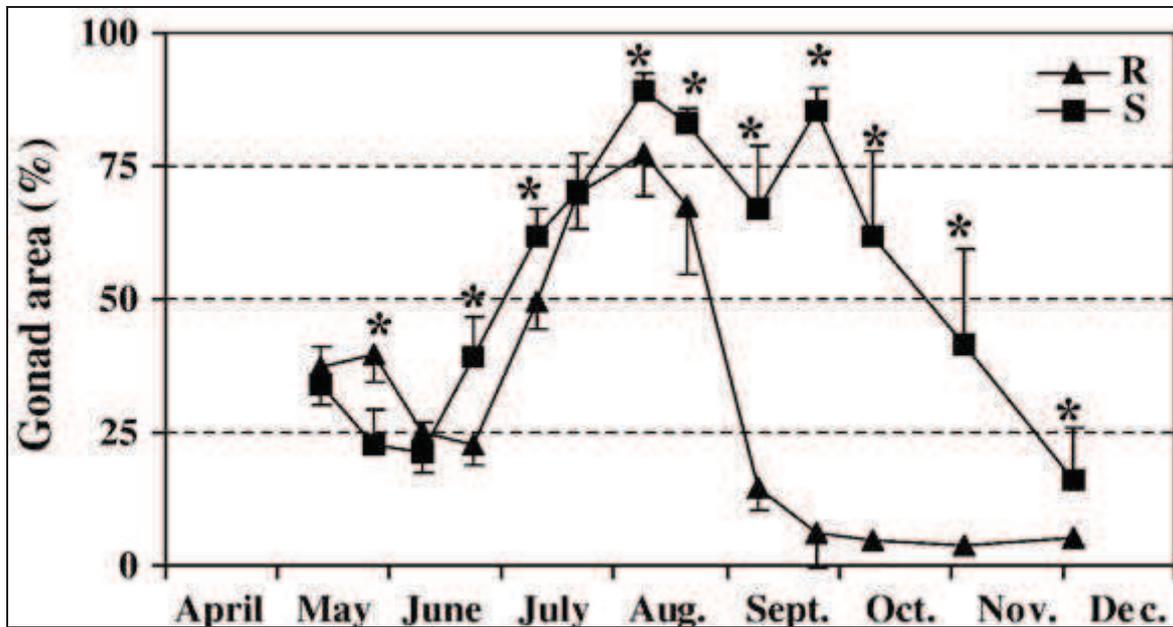


Figure 7. Estimation semi-quantitative du pourcentage de surface gonadique déterminé par histologie d'huîtres « résistantes » (R) et d'huîtres « sensibles » (S) aux mortalités estivales (* signifie que la différence est significative entre R et S). D'après Samain et al. 2007.

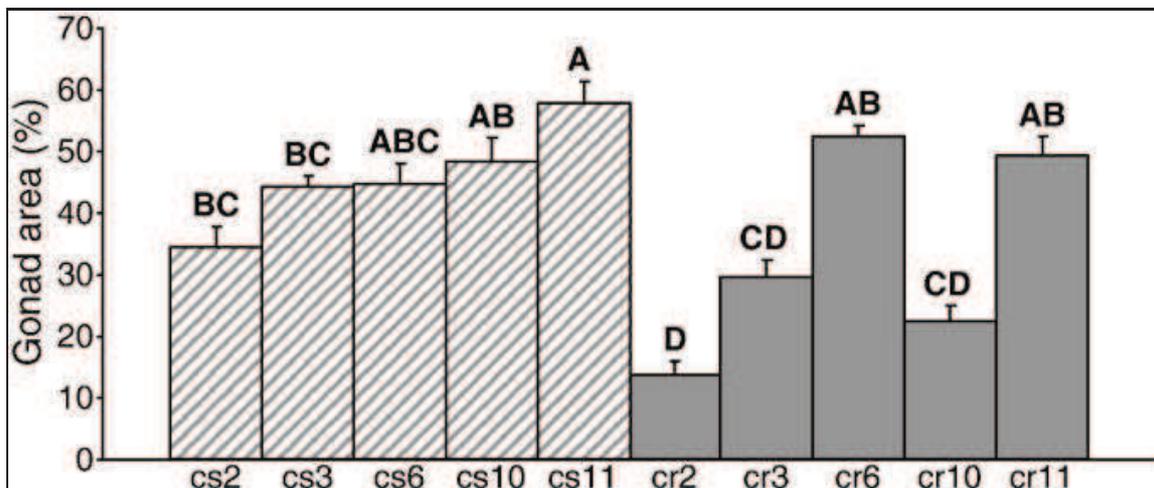


Figure 8. Estimation de la surface gonadique moyenne de 5 lignées d'huîtres « sensibles » (en hachuré) et de 5 lignées d'huîtres « résistantes » (en gris) aux mortalités estivales. Globalement, les lignées R présentent une surface gonadique moyenne significativement plus petite que les lignées S (respectivement $35 \pm 18,7\%$ contre $45,9 \pm 15,8\%$). D'après Huvet et al., 2010.

2.5. Génome

Le génome de l'huître creuse présente un important polymorphisme nucléotidique (Hedgecock et al., 2005). Ce polymorphisme a été mis en évidence au niveau des allozymes, puis des marqueurs microsatellites et plus récemment à partir des connaissances du transcriptome : des gènes différentiellement exprimés entre mâles et femelles, entre différents stades de maturité gonadique ou impliqués dans le développement gonadique (Dheilly et al., 2012) ont été détectés et leur séquençage a révélé des mutations pouvant également être utilisées comme marqueurs moléculaires.

Le développement et l'utilisation de ces marqueurs moléculaires a permis d'en apprendre davantage sur le génome de *Crassostrea gigas*:

- l'amplification de marqueurs microsatellites a révélé une abondance d'allèles nuls, c'est-à-dire d'allèles non-amplifiés, vraisemblablement à cause de mutations dans les séquences flanquantes servant de sites de fixation aux amorces nécessaires à l'amplification (McGoldrick et al., 2000; Huvet et al., 2000; Launey et Hedgecock, 2001; Reece et al., 2004). De plus, certains marqueurs microsatellites présentent jusqu'à 40 allèles différents (Huvet et al., 2000).
- le séquençage de portions du génome de *C. gigas* a révélé l'existence de SNP (Single Nucleotide Polymorphism), polymorphisme d'une seule paire de bases, environ toutes les 60 paires de bases dans les régions codantes et environ toutes les 40 paires de bases dans les régions non-codantes (Sauvage et al., 2007).

Récemment, une première version du génome de l'huître a été publiée et a confirmé cette grande diversité nucléotidique quel que soit le type de matériel biologique utilisé : le taux de polymorphisme est estimé à 1,3% pour les individus sauvages, après quatre générations de croisements frères-sœurs, le polymorphisme est réduit à 0,73% tandis qu'en combinant le génome sauvage et le génome consanguin, on observe un polymorphisme de 2,3% (Zhang et al., 2012 ;Figure 9). Le taux de polymorphisme de l'huître creuse ainsi estimé est plus élevé que celui estimé pour la plupart des génomes séquencés mais comparable au

polymorphisme estimé chez d'autres espèces connues pour leur fort polymorphisme et cohérent avec l'observation de Sauvage et al. (2007) car 1 SNP toutes les 40 pb correspond à un taux de polymorphisme de 2,5%.

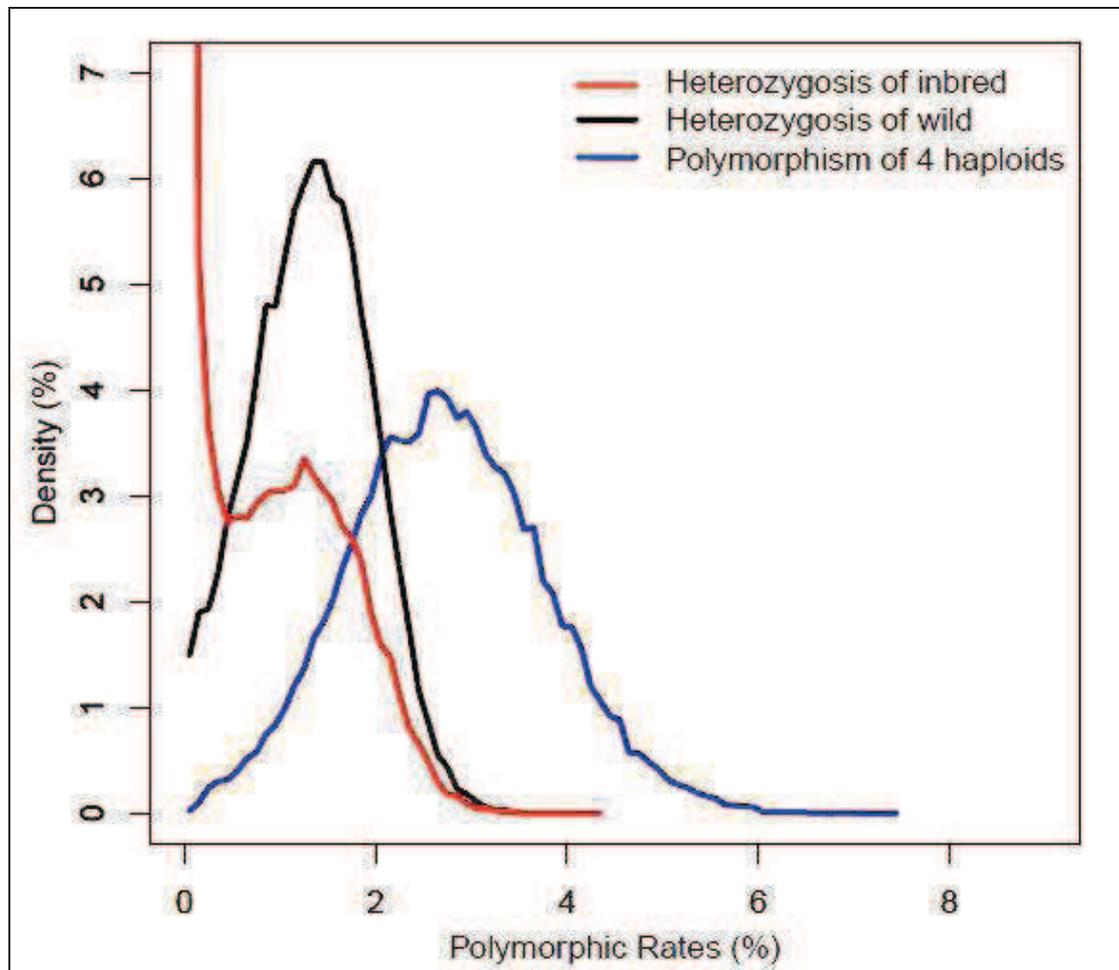


Figure 9. Densité de distribution du polymorphisme chez *Crassostrea gigas* estimé par des fenêtres glissantes mais non-chevauchantes de 10 kb (Zhang et al., 2012). Chez les individus sauvages (noir), le polymorphisme est homogène tout le long du génome tandis que chez les individus consanguins (rouge), une part importante de fenêtres présente un très faible polymorphisme car la consanguinité favorise l'homozygotie. En revanche, en combinant les génomes des individus sauvages et des individus consanguins (bleu), le taux de polymorphisme est plus élevé au sein de nombreuses fenêtres.

3. Recherche de QTLs chez les organismes marins

La diversité nucléotidique peut être utilisée comme outil via les marqueurs moléculaires et explique également la variabilité ou l'héritabilité de certains caractères. Pour faire le lien entre les variations du génotype (polymorphismes observables au niveau des marqueurs moléculaires) et les variations du phénotype (différences de réponse à une

même situation), on peut rechercher des régions du génome impliquées dans l'expression macroscopique de caractères d'intérêt : les QTLs (Quantitative Trait Loci).

3.1. Principe de la recherche de QTLs

Pour un marqueur M donné, le principe de la recherche de QTLs est d'observer, dans la descendance d'un individu hétérozygote M1/M2, s'il existe une différence de performance moyenne selon l'allèle M1 ou M2 transmis : si la variation de la performance peut être associée à l'allèle transmis, c'est qu'il existe un QTL génétiquement lié au marqueur M (Le Roy et Elsen, 2000). Par exemple, considérons le caractère « couleur » décliné en 3 phénotypes possibles (bleu, rouge et violet) observé chez 8 individus génotypés pour 2 marqueurs présentant 3 génotypes possibles : [AA], [BB] et [AB] (Figure 10). Lorsqu'on observe le génotype des individus F2 pour chaque marqueur, on remarque que :

- Pour le marqueur 1, le génotype [AA] est associé au phénotype « bleu », le génotype [BB] est associé au phénotype « rouge » et le génotype [AB] est associé au phénotype « violet ».
- Pour le marqueur 2, le génotype [AA] est associé aux phénotypes « bleu » et « violet », le génotype [BB] est associé au phénotype « violet » et le génotype [AB] est associé aux 3 phénotypes.

D'un point de vue statistique, l'association génotype-phénotype est donc significative pour le marqueur 1 mais pas pour le marqueur 2. Un QTL est alors lié au marqueur 1. Cependant, cette méthode nécessite de phénotyper un grand nombre d'individus pour vérifier que l'association marqueur-phénotype est statistiquement robuste (Lander et Botstein, 1989).

Individus	Génome	Génotypes aux marqueurs		Phénotypes	Détection de QTL	
		1	2		1	2
A		B A	B A		Oui	Non
B		B B	A B			
C		B A	B A			
D		A A	A A			
E		A A	A B			
F		B B	B A			
G		B A	B B			
H		A B	A A			

Figure 10. Détection de QTL par la méthode "marqueur par marqueur".

Lorsque l'on dispose d'une carte génétique, il est possible de rechercher des QTLs sur l'ensemble du génome, alors divisé en groupes de liaison. En effet, la liaison entre les marqueurs génétiques permet de localiser les régions du génome impliquées dans la variation de la performance observée. Lander et Botstein (1989) ont mis au point une méthode dont le principe est de balayer l'ensemble du génome en testant l'hypothèse d'absence de QTL à chaque position : la cartographie d'intervalle. Les marqueurs génétiques servent alors de « bornes » entre lesquelles se situe potentiellement un QTL. Cette méthode nécessite un nombre d'individus nettement moins élevé que l'analyse marqueur par marqueur. Reprenons l'exemple précédent mais en l'appliquant à une famille F2 (Figure 11), car c'est un type de croisement adapté à la détection de QTL (Massault, 2010). On considère que les grands-parents sont homozygotes pour 4 marqueurs d'un même groupe de liaison: F0-A, de couleur bleu, est homozygote [AA] pour tous les marqueurs et F0-B, de couleur rouge, est homozygote [BB] pour ces mêmes marqueurs. Les parents F1-C et F1-D sont donc théoriquement hétérozygotes [AB] pour les 4 marqueurs et leur phénotype est « violet ». Si

l'on croise les individus F1-C et F1-D, on obtient une génération F2 au sein de laquelle ségrège le caractère considéré : phénotypiquement, on observe des individus bleus tels que F2-E, des individus rouges comme F2-F et des individus violets tels que F2-G et F2-H. Ensuite, lorsqu'on observe le génotype des individus F2 pour chaque marqueur, on remarque que :

- Pour les marqueurs 1 et 2, le génotype [AA] est associé au phénotype « bleu », le génotype [BB] est associé au phénotype « rouge » et le génotype [AB] est associé au phénotype « violet ».
- Pour les marqueurs 3 et 4, les génotypes [AA] et [BB] sont associés au phénotype « violet » tandis que le génotype [AB] est associé aux phénotypes « bleu » et « rouge ».

D'un point de vue statistique, l'association génotype-phénotype est donc significative pour les marqueurs 1 et 2 mais pas pour les marqueurs 3 et 4. Un QTL est alors détecté entre les marqueurs 1 et 2.

Individus	Génome	Génotypes aux marqueurs				Phénotypes	Détection de QTL	
		1	2	3	4			
Grand-parent F0-A		A	A	A	A	Bleu		
Grand-parent F0-B		B	B	B	B			Rouge
Parent F1-C		B	B	B	A	Violet		
Parent F1-D		A	A	A	B			Rouge
Descendant F2-E		A	A	A	B	Bleu		Les marqueurs 1 et 2 sont associés à la variation du phénotype tandis que les marqueurs 3 et 4 ne peuvent pas être associés à la variation du phénotype. Un QTL est donc détecté entre le marqueur 1 et le marqueur 2
Descendant F2-F		B	B	B	A	Rouge		
Descendant F2-G		B	B	B	A	Violet		
Descendant F2-H		A	A	A	B	Violet		

Figure 11. Principe de détection d'un QTL par la méthode de cartographie d'intervalle.

3.2. Caractères d'intérêt chez les espèces aquacoles.

Chez les espèces aquacoles, les caractères d'intérêt pour lesquels des QTLs sont recherchés présentent un intérêt économique.

Parmi les caractères les plus étudiés, on retrouve la taille et la croissance des individus car améliorer la croissance de l'espèce permet de réduire les temps d'élevage. Chez la Truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, la capacité d'adaptation à l'eau de mer a été étudiée (Le Bras et al., 2011) car il a été prouvé que la croissance en eau de mer était meilleure qu'en eau douce (Sedgwick, 1970 ; Johnston et Cheverie 1985 cités par Le Bras et al., 2011). Chez les pétoncles, *Chlamys farreri*, *Argopecten irradians* et *Nodipecten subnodosus*, des QTLs impliqués dans la variation de la taille ont été détectés (Zhan et al., 2009 ; Li et al., 2012 ; Petersen et al., 2012).

Un autre caractère très étudié est la résistance aux maladies qui induisent d'importantes pertes pour les entreprises aquacoles. Chez le Saumon atlantique, *Salmo salar*, un QTL majeur de résistance à la nécrose pancréatique infectieuse qui provoque d'importantes mortalités a été identifié par Moen et al, 2009. Chez la Truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, un QTL majeur de résistance à un Rhabdovirus provoquant la Septicémie Hémorragique Virale a été détecté par Verrier et al. (2013). Chez l'huître creuse *Crassostrea virginica*, Yu et Guo (2006) ont identifié des QTLs de résistance à la maladie « Dermo » induite par le pathogène *Perkinsus marinus*.

Bien que des régions du génome soient détectées pour ces espèces aquacoles, les QTLs sont encore rarement utilisés pour orienter les programmes de sélection aquacoles. En 2007, le QTL détecté par Moen et al. (2009) a été intégré dans le programme de sélection de l'entreprise norvégienne Aqua Gen qui fournit des œufs de saumon à l'industrie aquacole.

3.3. QTLs détectés chez *Crassostrea Gigas*

Comme pour la plupart des espèces pour lesquelles des QTLs sont recherchés, les caractères considérés présentent généralement un intérêt économique. Ainsi, Hedgecock et al. (2007) ont identifié cinq QTLs impliqués dans la variation du poids et un QTL impliqué

dans la croissance. Plus récemment, Guo et al. (2012) ont également détecté trois QTL impliqués dans la croissance et un QTL lié au sexe. Plough et Hedgecock (2011) ont identifié une quinzaine de QTLs de viabilité associés à la survie au stade larvaire, essentiellement au moment de la métamorphose. Sauvage et al. (2010) ont, quant à eux, mis en évidence cinq QTLs liés à la survie aux mortalités estivales et à la charge virale en herpès virus OsHV1 (Figure 12). A ce jour, les QTLs détectés chez *Crassostrea gigas* ne sont pas utilisés dans des programmes de sélection.

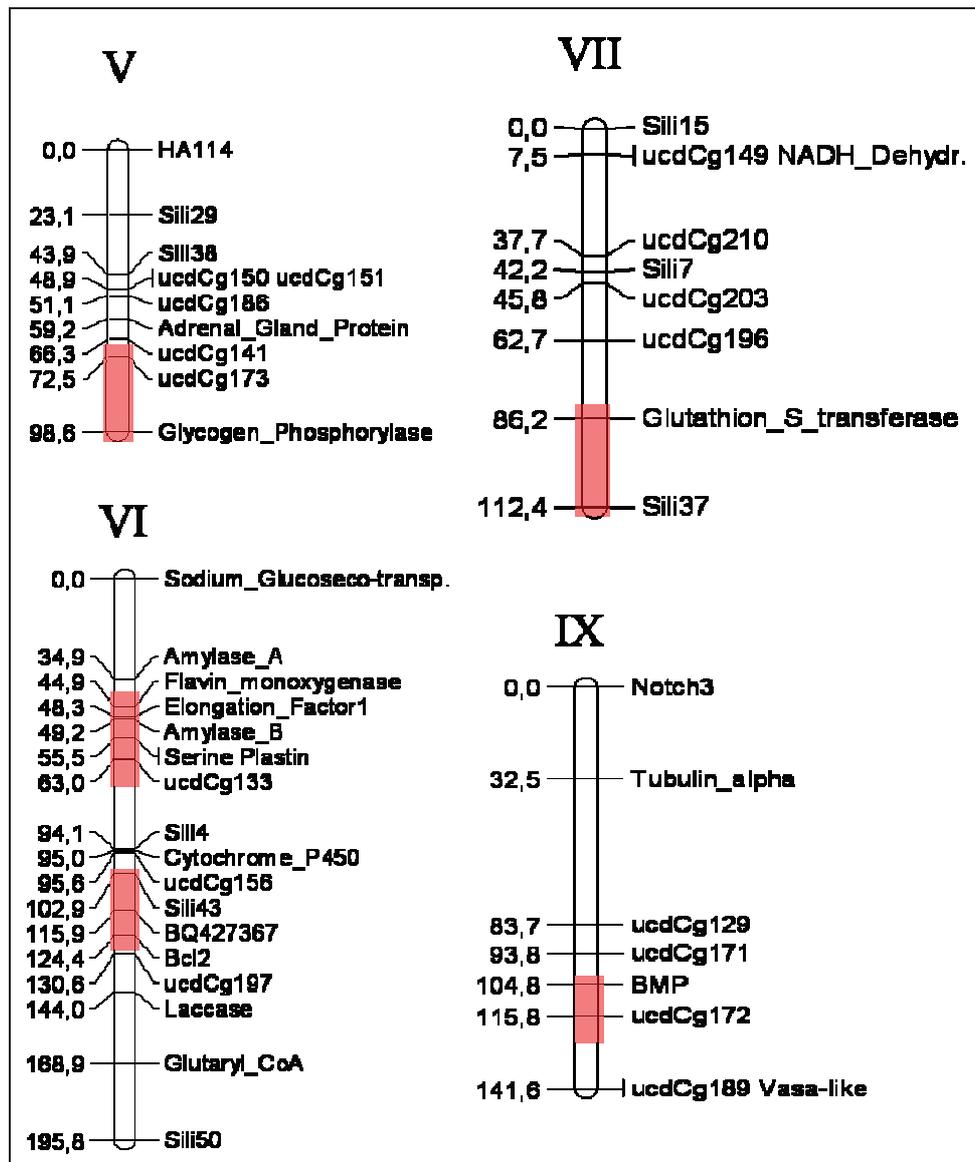


Figure 12. QTLs impliqués dans la réponse aux mortalités estivales et la charge virale en virus OsHV-1. Les rectangles rouges représentent les 5 QTLs répartis sur 4 groupes de liaison. D'après Sauvage et al., 2010.

4. Plan de la thèse

Les mortalités estivales de juvéniles d'huîtres creuses menacent l'économie aquacole française. Des études précédentes ayant mis en évidence une corrélation entre l'investissement dans la reproduction et la réponse aux mortalités estivales (Huvet et al., 2010), il apparaît important de mieux connaître l'architecture génétique de la gamétogenèse, jusqu'alors peu étudiée. Des régions du génome impliquées dans la réponse aux mortalités estivales ayant été détectées (Sauvage, 2008), il est également apparu intéressant de savoir s'il existait des zones du génome impliquées dans l'effort reproducteur et de vérifier si elles étaient communes à celles détectées pour la survie et la quantité d'agents pathogènes lors d'un épisode de mortalité estivale.

Pour répondre à ces questions, le projet GAMETOGENES a été financé par l'ANR (Agence Nationale pour la Recherche, projet ANR-08-GENM-041) de 2009 à 2012. Ce projet était un prolongement logique des précédents programmes dédiés à la production massive de données génomiques pour un mollusque d'importance économique : l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Il s'est inscrit ainsi dans la poursuite de certains travaux réalisés dans le cadre du projet européen AQUAFIRST terminé en 2008. Le projet GAMETOGENES s'est en effet appuyé sur les connaissances acquises au cours des programmes antérieurs pour développer de nouveaux outils en génétique, génomique fonctionnelle ainsi qu'en post-génomique afin d'améliorer la connaissance des bases génétiques et physiologiques de la reproduction et les processus associés dans le but d'améliorer la production aquacole. Les objectifs de ce projet étaient:

- l'identification des gènes spécifiquement exprimés dans les gonades des huîtres au cours d'un cycle de reproduction en utilisant des méthodes de transcriptomique, c'est-à-dire en déterminant des marqueurs spécifiques d'étapes de la gamétogenèse et en déterminant l'expression de ces gènes marqueurs en fonction de l'environnement,
- la détermination des bases génétiques de la variabilité de l'allocation à la reproduction à l'aide d'une approche QTL ,

- l'exploration de la fonction des gènes impliqués dans les processus de régulation de la reproduction à travers le développement de méthodes de post-génomique.

Le coordinateur était l'Université de Caen et les autres partenaires étaient l'Université de Brest, l'Université de Rennes et l'Ifremer (LPI de Brest et LGP de La Tremblade). Le LGP était particulièrement impliqué dans le deuxième objectif mais aussi dans la production d'animaux permettant les expérimentations d'autres partenaires.

Ce sujet de thèse s'est donc intégré dans le projet GAMETOGENES et a visé à détecter, par une approche QTL, les relations qui existent entre la survie aux mortalités estivales ou l'effort de gamétogenèse et certaines portions du génome. Cette approche a nécessité, d'une part, l'amélioration de la carte génétique constituée de marqueurs moléculaires de type microsatellites et SNPs et, d'autre part, la production et la caractérisation phénotypique d'un matériel biologique particulier de type « famille F2 ». En effet, des simulations ont démontré que la détection de QTLs est optimisée par ce type de croisement (Massault, 2010).

Dans la suite du manuscrit seront donc présentés principalement sous la forme d'articles scientifiques : le développement de nouveaux outils de caractérisation de l'effort reproducteur (Partie I), la caractérisation phénotypique de familles d'huîtres creuses au cours de la gamétogenèse (Partie II), la caractérisation génétique de l'effort reproducteur (Partie III) et, enfin, la contribution de cette étude à la caractérisation génétique de la réponse aux mortalités estivales (Partie IV). Une conclusion permettra de rappeler les principaux résultats obtenus, leurs limites, et de les mettre en perspective dans le cadre des programmes de sélection qui se mettent en place actuellement au sein de la filière ostréicole.

PARTIE I : DE NOUVEAUX OUTILS POUR CARACTERISER L'EFFORT REPRODUCTEUR

1. Un matériel biologique particulier : les familles F2

1.1. Choix des grands-parents : la génération F0.

Nous avons décidé d'utiliser une génération de type F2 afin de détecter les QTLs liés à la survie du naissain aux mortalités estivales et à l'effort reproducteur. Pour cela, nous avons donc choisi d'utiliser comme grands-parents des individus provenant de lignées sélectionnées au cours d'études précédentes pour ces 2 caractères. En effet, nous avons utilisé du matériel biologique sélectionné pour ses réponses contrastées aux mortalités estivales, les lignées R et S (Dégremont et al., 2010 a b c) : R signifie que la famille F0 est plus résistante aux mortalités estivales que les témoins et S signifie que la famille F0 est plus sensible aux mortalités estivales que les témoins. Nous avons également utilisé du matériel biologique aux performances contrastées en termes d'effort reproducteur, les lignées Hautes et Basses (Normand, 2009) : H signifie que la famille F0 présente un effort reproducteur supérieur à celui des témoins. B signifie que la famille F0 présente un effort reproducteur inférieur à celui des témoins.

1.2. Production des parents : la génération F1

Une famille F1 provient du croisement de deux individus provenant de deux familles F0 aux performances contrastées. Par exemple, un mâle issu d'une famille R et une femelle issue d'une famille S.

La génération F1 a été produite le 23 février 2009 (Tableau 1):

- Les lots F1 1 à 12 ont été produits à partir des individus F0 sélectionnés pour la variabilité de l'effort reproducteur.
- Les lots F1 18 à 24 ont été produits à partir des individus F0 sélectionnés pour la réponse aux phénomènes de mortalités survenus au cours de l'année 2008.

Femelle F0	Mâle F0	Lot F1
B6	H6	1
B5	H5	2
B4	H4	3
B3	H3	4
B2	H2	5
B1	H1	6
H6	B6	7
H5	B5	8
H4	B4	9
H3	B3	10
H2	B2	11
H1	B1	12
R1	S9	18
R8	S1	19
R4	S4	20
S4	R5	21
R5	S11	22
S11	R4	23
S1	R1	24

Tableau 1. *Origine des familles F1 (en blanc, lots sélectionnés pour l'effort de reproduction, en gris, lots sélectionnés pour la réponse aux phénomènes de mortalité).*

1.3. Production du matériel biologique de l'étude : la génération F2

Une famille F2 provient du croisement entre deux individus provenant d'une même famille F1, c'est-à-dire, un frère et une sœur.

1.3.1. Choix des géniteurs

Des individus F1 ont été ramenés de la station expérimentale de Bouin le 8 juillet 2009 et transférés sur estran le 10 juillet 2009 (500 individus par famille) et le 07 août 2009 (environ 300 individus) pour tester la différence de réponse aux mortalités estivales en fonction de l'âge de mise sur estran (Figure 13). Des individus de ces mêmes familles ont été préservés de toute mortalité à Bouin afin de ne pas biaiser la sélection des géniteurs (si on utilisait les survivants de l'épisode de mortalité, on sélectionnerait les individus les plus résistants de chaque famille). Ceux-ci ont été ramenés à l'écloserie expérimentale de La Tremblade et placés dans des conditions optimales induisant la maturation le 15 janvier 2010. La température a été progressivement augmentée jusqu'à 20°C.

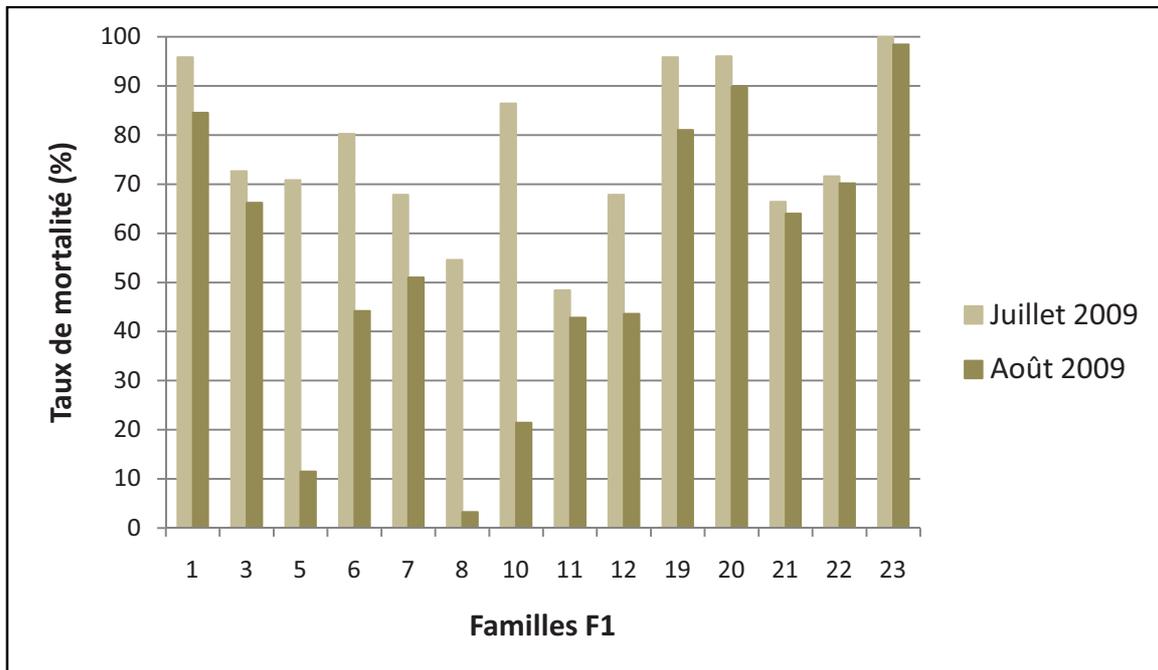


Figure 13. Réponse aux mortalités estivales en fonction de la date de mise sur estran des familles F1 ayant une descendance F2.

1.3.2. Croisement

Les croisements ont été réalisés du 15 au 19 février 2010, certains croisements ayant été reconduits suite à l'absence de larves le lendemain du croisement.

Pour chaque lot F1, un ou deux croisements bi-parentaux ont été réalisés (Tableau 2). Les lots 5, 8 et 10 de la F1 ont fait l'objet de 2 croisements bi-parentaux du fait du contraste de survie observé en fonction de l'âge de mise sur estran lors de l'épisode de mortalités 2009 (Figure 13). De la même manière, les lots 21 et 22 de la F1 ont également été représentés par 2 croisements bi-parentaux chacun en raison de leur mortalités moindres en 2009 par rapport aux autres lots de la F1 sélectionnés pour la réponse aux phénomènes de mortalités. Les lots 2, 3, 9, 11, 20, 22 et 23 de la F1 ont également été utilisés plusieurs fois pour des raisons pratiques : les lots 2, 3, 9, 20, 22 et 23 pour produire des croisements de remplacement au cours des jours suivants et le lot 11 pour palier à l'absence de mâles dans le lot 18 de la F1.

Lot F2	à partir du lot F1 produit en 2009	Date du croisement
1	lot 1	15/02/2010
2*	lot 2	
3*	lot 3	
4	lot 5	
5	lot 5	
6	lot 6	
7	lot 7	
8	lot 8	
9	lot 8	
10*	lot 9	
11	lot 10	
12	lot 10	
13	lot 11	
14	lot 12	
15	lot 11	
16	lot 19	
17*	lot 20	
18	lot 21	
19	lot 21	
20	lot 22	
21	lot 22	
22	lot 23	
23	lot 3	16/02/2010
24	lot 3	
25*	lot 2	
26*	lot 2	
27*	lot 20	17/02/2010
28	lot 20	
29*	lot 22	
30*	lot 22	
31*	lot 22	
32*	lot 2	18/02/2010
33*	lot 2	
34*	lot 2	
35*	lot 5	
36*	lot 5	19/02/2010
37*	lot 23	
38*	lot 23	
39*	lot 23	
40*	lot 9	
41*	lot 9	
42*	lot 9	

Tableau 2. Production des familles F2 (en blanc, lots sélectionnés pour l'effort de reproduction ; en gris, lots sélectionnés pour la réponse aux phénomènes de mortalité ; les lots éliminés pour absence de larves sont signalés par un *)

1.3.3. Obtention des gamètes et fécondation

Les gamètes ont été obtenus par scarification à l'aide d'un scalpel puis rinçage à l'eau de mer de la gonade. Les ovocytes ont été filtrés sur des tamis de maille 60 μm pour éliminer les macro-débris. Un échantillon recueilli sur une cellule de Malassez a permis une estimation du nombre de gamètes femelles par analyse d'image grâce au logiciel SAMBA. Trois millions d'entre eux ont été conservés dans un b cher de 800 ml contenant de l'eau de mer filtrée à temperature ambiante. La fécondation a eu lieu par ajout de spermatozo ides dans chaque b cher. Le ratio spermatozo ides/ovocytes a été contrôlé par observation au microscope. En cas d'excès de spermatozo ides, un ajout d'eau de mer filtrée a permis de diluer le mélange. En cas de déficit, des spermatozo ides ont été ajoutés. Dans les deux cas, un nouveau contrôle au microscope a été réalisé.

Une heure après, l'observation au microscope de globules polaires mettant en évidence la fécondation des ovocytes a déterminé le transfert des larves en salle d'élevage larvaire.

1.3.4.  levage larvaire

Après confirmation de la fécondation, les larves ont été placées dans des jarres de 30L d'eau de mer filtrée à 23 C. Deux jours plus tard, nous avons estimé le taux d'éclosion par le comptage de trois réplicats par lot. Au cours des trois semaines qu'a duré l'élevage larvaire, les larves ont été filtrées sur des tamis de maille croissante (de 45 μm jusqu'à 220 μm). Parallèlement, nous avons procédé à des réductions de densité ponctuelles pour optimiser la croissance des larves (Tableau 3).

Jour d'élevage	Maille du tamis (μm)	Opération
2	45	Réduction de densité (300.000)
5	60	-
8	85/70	Réduction de densité (150.000)
10	85	-
12	100	-
15	112 + 220	Fixation du 220
17	112 + 220	Fixation du 220
19	112 + 220	Fixation du 220
21	125/150/180 + 220	Fixation du 220
23	180 + 220	Fixation du 220

Tableau 3. Taille de maille de tamis et opérations en salle d'élevage larvaire.

En élevage larvaire, les larves ont été nourries avec un mélange algal composé d'*Isochrysis* (T-iso), de *Chaetoceros gracilis* et de *Tetraselmis suecica*. Afin de prévenir toute dégradation du milieu par les larves mortes ou du phytoplancton, un ajout d'antibiotiques a été effectué à chaque changement d'eau de mer (Flumisol : 800 μl / 30 L).

A partir du 1^{er} mars 2010, les larves retenues sur une maille de 220 μm et présentant des taches ocellaires (larves œillées) ont été transférées en salle de micro-nurserie pour permettre leur fixation. Les dernières larves ont été mises en fixation le 9 mars 2010.

1.3.5. Micro-nurserie

Les larves œillées ont été placées sur des tamis de maille 150 μm dont le fond avait préalablement été recouvert d'une fine couche de microbrisure de coquilles d'huîtres, substrat favorisant la fixation des huîtres. Ces tamis ont été disposés dans des raceways alimentés en séquentiel les premiers jours (conséquences de la tempête Xynthia du 28

février 2010) puis en flux continu d'eau de mer filtrée aux UV, chauffée à 21 °C et enrichie en phytoplancton.

Les 22 et 23 mars 2010, nous avons filtré les naissains sur un tamis de 500 µm et réduit les densités à 5000 naissains par tamis (maille de 350 µm).

Les 12 et 13 avril 2010, nous avons filtré les naissains sur un tamis de 2 mm en vue de leur transfert à la nurserie du site Ifremer de Bouin.

1.3.6. Nurserie

Pour assurer une croissance rapide, le naissain a été transféré à la station Ifremer de Bouin, le 14 avril 2010. Il a été placé sur des tamis de maille 1 mm (un tamis par lot) dans des raceways alimentés en eau de mer à la même température que dans le milieu naturel mais avec adjonction de phytoplancton et en immersion permanente.

1.3.7. Tests de survie

La recherche de QTLs nécessitant un nombre important d'individus à phénotyper, il n'était matériellement pas possible de suivre l'ensemble des 21 familles produites. En mai et juin 2010, deux tests de survie ont été menés sur l'ensemble des familles F2 afin de déterminer lesquelles présentaient les performances les plus appropriées pour la recherche de QTLs. Il a été décidé de retenir 12 d'entre elles dont les taux de mortalité étaient compris entre 30 et 80% afin de posséder un nombre suffisant d'individus morts et d'individus survivants à la fin de l'épisode de mortalité. Ce choix s'est vu renforcé par la prise en compte des performances de survie des familles F1 (dont sont issus les géniteurs de nos F2) enregistrées l'année précédente (Figure 13).

2. Nouveaux outils moléculaires : recherche des marqueurs et génotypage

2.1. Les marqueurs microsatellites

Une séquence d'ADN microsatellite consiste en une succession de répétitions d'un motif de 2 à 10 nucléotides. Le nombre de répétitions de ce motif (de 5 à 40 fois) fait varier la longueur de la séquence d'ADN. C'est la variabilité de cette longueur qui est source de polymorphisme car ces régions se transmettent à la descendance en suivant les lois de l'hérédité de Mendel. Situées principalement dans les introns, les séquences microsatellites peuvent être utilisées comme marqueurs moléculaires. Chez l'huître creuse, le fort polymorphisme peut entraîner jusqu'à plus de 40 allèles pour un marqueur microsatellite (Huvet et al., 2000).

2.1.1. Choix des marqueurs

Les marqueurs microsatellites utilisés au cours de cette étude sont des marqueurs couramment utilisés au LGP de La Tremblade. Au total, 36 marqueurs microsatellites ont été analysés, dont 15 en multiplexes 3 par 3, c'est-à-dire que 3 segments distincts sont amplifiés au cours d'une seule réaction (Li et al., 2010 ; Taris et al., 2005 ; Tableau 4) et 21 en simplexe (Li et al., 2003 ; Yamtich et al., 2005 ; Sauvage et al., 2010 ; Tableau 5).

Locus	Motif répété	Fluorochrome	Séquence des amorces 5'-3'	T _L (°C)	Taille fragment (bp)	Concentration dans le mix PCR (µM)	Numéro d'accès GenBank
PCR NICOPLEX				55			
CG 49	(GT)35	NED (noir)	F :CATCAGGGTAAATTAAGTAAGC R :CCACAGACGATTCATATATCCTG		142-182	0.2	Y12085
CG 108	(GT)15	FAM (bleu)	F: ATATGTAATGATTACGAAACT R:ATATGTAATGATTACGAAACT		128-166	0.4	Y12087
L 10	(AG)26	HEX (vert)	F:GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC R :CATGTTTTCCCTTGACTGATCC		136	0.2	AF170850
PCR multiplex 1				58			
CGE007	(TA)7	NED (noir)	F: TTTCCCTGAGAAGACCC R: AACCAAATCCATTCACATAAC		96-142	0.1	BQ427084
Cgsili43	(GA)10	HEX (vert)	F: AAATGCTGCAGAAATAATCC R: AGATGGCTACAGTAAAATGG		210-348	0.3	AM854072
Cgsili46	(TG)5A(GT)7	FAM (bleu)	F: CATGACAATCGAGTCCATAA R: CATGGTGGAGAAAGAGTTGT		165-211	0.09	AM856490
PCR multiplex 2				52			
CGE009	(AG)7	NED (noir)	F: TTCGTTGAAGGTGACAAGTG R: GCATTTTGGGATGAACAGA		114-128	0.1	CX068958
AMY	(TC)37	HEX (vert)	F: ACCGGTATTGCCGAGTTACAA R: AGTTAGGCATCCCCATTGTTC		199-369	0.2	Y08370
Cgsili44	(AG)7AAA(GA) ₄	FAM (bleu)	F: TGGCATTCATGGTTAATTT R: TGTTGTATGAAATGTCGGAA		349-355	0.1	AM858556
PCR multiplex 3				58			
Cgsili39	(AG)13	FAM (bleu)	F: GACCATACAGCTCTGCCAT R: GCTACTGAATGAGAATGGCT		355-383	0.09	AM854746
Cgsili50	(CA)10	FAM (bleu)	F: CTATCTGAGCAGCTTCTCT R: TCTCTGTCAGATGATCTCAGG		201-233	0.09	AM865904
Cgsili4	(AG)26	HEX (vert)	F: GGTGCAGTAGTTGAAACAT R: TCACATTTAACTAGCGCTCTC		227-349	0.24	AM854894
PCR multiplex 4				58			
CGG008	(AG)20	NED (noir)	F: TCTCCTACCCCGACAG R: GTGATGAACAAACCAAC		181-253	0.4	AJ579915
Cgsili37	(TC)15	FAM (bleu)	F: TTGCTGGTTGTGATGAATAG R: ATATCTGGCCTAACATGTGC		159-293	0.15	BQ427164
Cgsili6	(GA)26	HEX (vert)	F: ATGAACGTCCAAGTTCAGAC R: ACACATTCCTATAAAGCC		270-442	0.2	AM854296

Tableau 4 Les marqueurs microsatellites multiplexés

Locus	Motif répété	Séquence des Amorces 5'-3'	T _L (°C)	Na	Taille des fragments (pb)	Numéro d'accèsion GenBank	Publication associée
UcdCg 109	(CAT)n	F:GCTATGGTTGTCATCCTCGAA R:TGCCTTTATCGGTTTTGCTT	55	5	164-225	AF468525	(Li et al., 2003)
UcdCg 117	(TC)n	F: CCAAGCTTGCCTCACTCAA R: GAGTGTCTGGTGTGCCAAAT	58	7	288-332	AF468528	(Li et al., 2003)
UcdCg 119	(TC)n	F: AGGATGCCAATCGATTTATTT R: ACCATGCCGTCTTAGTGGAC	55	6	208-222	AF468529	(Li et al., 2003)
UcdCg 120	(CA)n(GA)n	F: GGGTGAGATTTAGGGGGAGA R: CTCCATCAAACCTGCCAAAC	55	5	149-155	AF468530	(Li et al., 2003)
UcdCg 129	(GA)n	F: CGAATTTTTCGGACATCGTT R: GTGGTATGCCTGCATCATGT	57	7	222-255	AF468534	(Li et al., 2003)
UcdCg 141	(TG)n	F: CTC AACGACTTTTTGCCTGA R: GTGTCTTCTATCCCGCAACG	57	6	227-262	AF468545	(Li et al., 2003)
UcdCg 149	(GA)n(GACA)n	F: TGATTAACGTGGGTGATTGAG R: TTTCTGACTGTCCTGTGTGA	60	7	213-245	AF468581	(Li et al., 2003)
UcdCg 151	(GT)n	F: AGGTAATCCGCAAACAGTGG R: GCATTGCGTCAGGATTAGGT	60	7	264-308	AF468553	(Li et al., 2003)
UcdCg 156	(GATA)n(GA-TG)n(TA)n	F: AGCAGACCTGGCAAATACG R: CCGTCATCAGGTCTGTTTT	50	7	116-208	AF468557	(Li et al., 2003)
UcdCg 165	(ATCT)n(CA)n	F: TTTTACCAGCACTCGCTGT R: TCCGAATTCACAAGTGTGTGT	57	5	171-239	AF468565	(Li et al., 2003)
UcdCg 166	(TC)n	F: CATCGGAACTAAATCGGGTAA R: TTCCTTTGTGCTGTCTTACAGG	58	6	204-237	AF468566	(Li et al., 2003)
UcdCg 172	(GAT)n	F: CCACCGTTAAACGTAGCATTG R: TTGTGTCCCTTTTCCGTCTC	60	2	242-250	AF468570	(Li et al., 2003)
UcdCg 173	(CT)n(CA)n	F: AAAATGGGAATTCAGTGTGCA R: CGGCACCGTTTTGTTATCT	57	6	217-250	AF468571	(Li et al., 2003)
UcdCg 181	(GT)n(GA)n	F: CACCCCAAGGACCACATAC R: TGTCAGCATGGGTAAGTCCA	60	4	214-263	AF468579	(Li et al., 2003)
UcdCg 186	(GA)n	F: GCCGCCGATTCTCTTAGATT R: GGCTAGCTAGTCATCACCCCTA	58	7	243-284	AF468584	(Li et al., 2003)
UcdCg 196	(GAT)n(GAC)n	F:CCTTTCATTTGGAGGTTACATTG R: ATCTTGCCATTTGCTTTTGG	55	4	265-273	AF468597	(Li et al., 2003)
UcdCg 198	(CAT)n	F: GAAAGACACGACCGGAGAGA R: CTGATGATGTCCACACCTG	58	6	220-250	AF468596	(Li et al., 2003)
UcdCg 200	(GAT)n	F: AAAGTTGCTTTGCTGTGCTC R: CGCTAACGTGCTTCATTCAA	58	4	232-265	AF468598	(Li et al., 2003)
UcdCg 210	(GAT)n	F: TTCACAATGAAGATGACAGTGC R: CCTCCTGCTCCATATCA	55	3	318-325	AY999708	(Yamitch et al., 2005)
Cgsili 7	(GA)n	F: ACAACGTATCAGTTCATT R: ATCTCCCGGCAAGTATATG	57	7	209-300	CU682571	(Sauvage, 2010)
Cgsili 45	(AG)nAAA (GA)n	F: GTCTAGAAATAAAGCTGGAA R: CAAGATTCCAAGGAAACAAA	57	7	184-211	AM857706	(Sauvage, 2010)

Tableau 5. Les marqueurs microsatellites en simplexe (Pontreau, 2012).

2.1.2. Génotypage des marqueurs microsatellites

2.1.2.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen. De 20 à 50 mg de branchies ont été prélevés sur chaque individu, comme indiqué dans le protocole présenté en Annexe 1. Ces échantillons ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN. Les échantillons de branchies des parents (F1) et des grands-parents (F0) ont, quant à eux, été prélevés le jour des croisements puis conservés dans de l'éthanol à 70%.

Afin de gagner du temps, l'ADN des individus caractérisés pour la reproduction a été extrait à l'aide de l'automate d'extraction Qiagen, le QiaCube, selon le même protocole, à l'exception de l'élution qui est réalisée dans 200 μL de tampon AE.

2.1.2.2. Dosage de l'ADN par spectrophotométrie

Le dosage de l'ADN a été réalisé à l'aide du Nanodrop 2000. Cet appareil présente l'avantage de mesurer la concentration de l'ADN sans dilution préalable. Il suffit de déposer 2 μL de la solution ADN+tampon d'élution. Il fournit également les valeurs d'absorbance à 260 (A260) et 280 nm (A280) et calcule les rapports A260/A280 et A260/A230 afin de vérifier l'absence de contamination de l'ADN extrait par d'autres protéines ou par des solvants organiques. Un extrait d'ADN est considéré comme pur lorsque le rapport A260/A230 est compris entre 1,8 et 2,2 et lorsque le rapport A260/A280 est compris entre 1,8 et 2. Cependant, les concentrations estimées par le Nanodrop ont tendance à être surestimées : il s'agit d'un dosage des acides nucléiques, par conséquent, l'ARN est également pris en compte.

De plus, l'appareil présente graphiquement ces valeurs d'absorbance. Il est ainsi aisé de distinguer une extraction d'ADN réussie (Figure 14, haut) d'une extraction d'ADN de mauvaise qualité (Figure 14, bas).

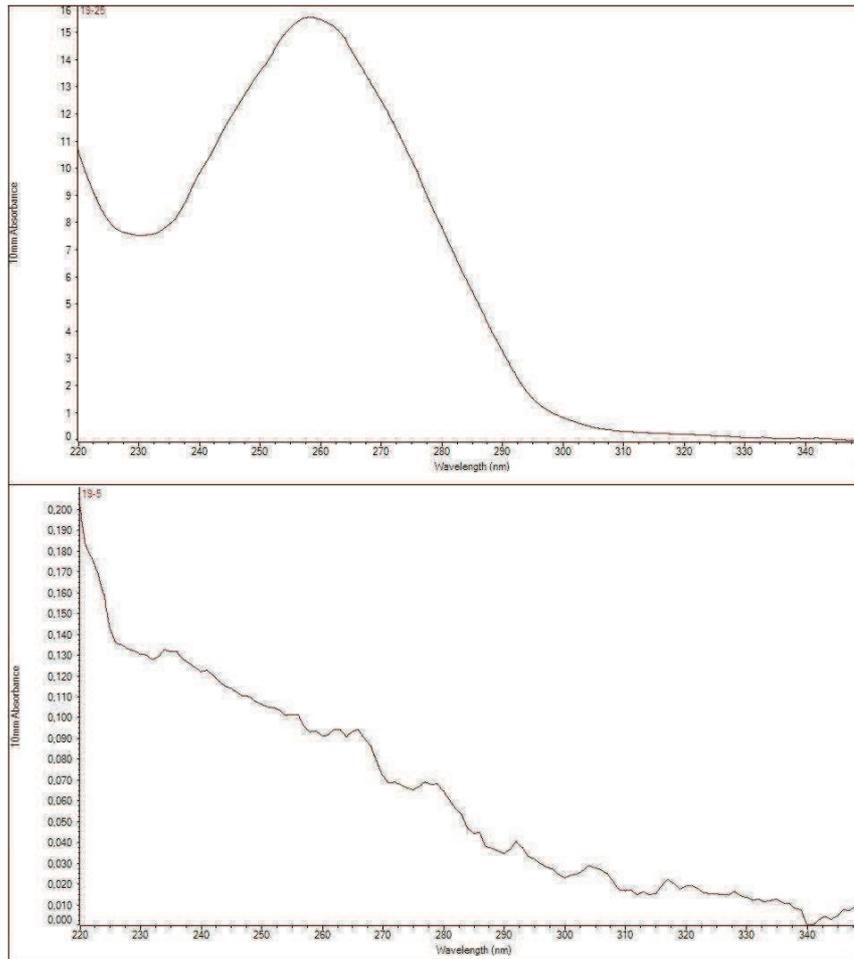


Figure 14. Profils d'absorbance de 2 échantillons d'ADN distincts. En abscisses, la longueur d'onde en nm. En ordonnées, l'absorbance à 10 nm. En haut, un échantillon d'ADN pur caractérisé par une courbe lisse. En bas, un échantillon d'ADN contaminé caractérisé par une courbe dégradée.

2.1.2.3. Vérification de la qualité des échantillons par migration sur gel d'agarose

La qualité des échantillons d'ADN de 56 individus par famille retenue pour la recherche de QTLs a été vérifiée sur gel d'agarose à 1% avant leur envoi à la plate-forme de génotypage de Toulouse pour le génotypage des SNPs (Figure 15).

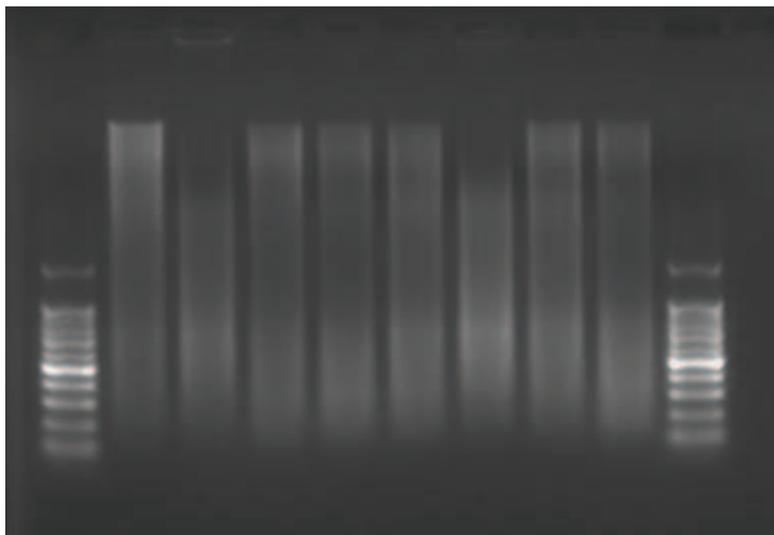


Figure 15. Dosage de l'ADN de 8 échantillons. Le marqueur de taille est déposé de part et d'autre.

2.1.2.4. Amplification de l'ADN : la PCR

La PCR permet de cibler un segment d'ADN particulier et de l'amplifier afin qu'il devienne observable.

Elle consiste en une succession d'étapes induites par des variations de température. Tout d'abord, une dénaturation de l'ADN-matrice permet la séparation des 2 brins d'ADN. Puis, au cours de la phase d'hybridation, le couple d'amorces spécifique du segment ciblé se fixe sur les séquences flanquantes du marqueur sur chacun des brins. Ensuite, une phase d'élongation permet la polymérisation des brins d'ADN complémentaires à partir de chaque amorce. Ces 3 phases constituent un cycle de PCR. Afin d'obtenir une quantité suffisante du segment ciblé, 30 cycles sont nécessaires.

Les protocoles de PCR en simplexe et en multiplexe sont détaillés dans les Annexes 2 et 3.

2.1.2.5. Electrophorèse des produits de PCR

2.1.2.5.1. Principe

Le génotypage a été réalisé à l'aide d'un séquenceur 16 capillaires (Applied Biosystems 3130 xl Genetic Analyzer®). Celui-ci permet de génotyper 16 échantillons d'ADN simultanément par le mécanisme de l'électrophorèse. Le polymère entraîne chaque

échantillon le long d'un capillaire. Au cours de la migration, les fragments sont séparés en fonction de leur taille qui pourra alors être enregistrée puis analysée par le logiciel Genemapper.

2.1.2.5.2. Protocole

Afin de gagner du temps et de l'argent, les produits de PCR des marqueurs amplifiés en simplexe ont été regroupés par 2 lors du génotypage. Les produits de PCR en multiplexe contiennent les produits d'amplification de 3 marqueurs différents. Afin de différencier les profils d'électrophorèse, les amorces des marqueurs microsatellites sont marquées à l'aide de fluorochromes de couleurs différentes (**Tableau 4**) : NED, de couleur jaune, HEX, de couleur verte et FAM de couleur bleue.

A ces produits de PCR, on ajoute un mix composé de 9 µL de formamide (maintien des fragments d'ADN simple brin malgré une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C) et 0,25 µL de marqueur de taille ROX[®] (permet au logiciel Genemapper de déterminer la taille des fragments d'ADN amplifiés). Ce marqueur de taille, de couleur rouge, n'interfère pas avec les couleurs des fluorochromes de marquages des amorces. Sa gamme (de 35 à 500pb) couvre largement l'amplitude de taille des fragments étudiés.

2.1.3. Une utilisation des marqueurs microsatellites : l'assignation de parenté

Le séquençage à haut débit présentant un coût très élevé, il a fallu choisir 3 familles parmi les 12 retenues précédemment. Avant d'affiner notre choix, nous avons voulu vérifier qu'aucun mélange accidentel entre les familles n'avait eu lieu. Pour cela, nous avons utilisé un multiplexe de 3 marqueurs microsatellites, le Nicoplex (Taris et al., 2005), et nous avons génotypé 8 descendants F2 par famille (4 morts et 4 survivants à l'épisode de mortalités estivales 2010) ainsi que les parents F1 et les grands-parents F0. Aucun mélange n'ayant été constaté, le choix s'est porté sur 3 familles dont les grands-parents avaient été sélectionnés pour la survie. En effet, la sélection pour l'effort reproducteur n'ayant été réalisée que par observation des gonades le jour du croisement, rien n'était sûr concernant ce trait. De plus, ces familles permettaient d'observer la variabilité de l'effort reproducteur au sein de lignées sélectionnées pour la survie.

2.2. Les marqueurs SNPs

Un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) est une variation d'une seule paire de bases du génome entre deux individus d'une même espèce. Chez l'huître creuse, on estime qu'il existe un SNP toutes les 40 paires de bases en moyenne (Curole et Hedgecock, 2005 ; Sauvage et al., 2007 ; Zhang et al., 2012).

2.2.1. Choix des marqueurs SNPs

En vue du génotypage, je me suis consacrée dès le début de ma thèse à la recherche bioinformatique de SNPs (SNPs *in silico*) sur la base de données SIGENAE. Ceux-ci devaient répondre aux contraintes de génotypage imposées par la technique Illumina : absence de polymorphisme dans une région de 120 bases centrée sur le SNP d'intérêt, à l'extérieur des régions répétées. Devant le petit nombre de SNPs obéissant à ces critères (13), j'ai étendu ma recherche en tolérant un faible polymorphisme au sein des régions flanquantes. Ceci a permis d'atteindre le nombre de 91 marqueurs. Au cours de mes recherches, j'ai également intégré 16 SNPs non répertoriés par SIGENAE. Cependant, les 107 SNPs ainsi trouvés ne répondant pas à l'objectif de génotyper les individus pour 384 marqueurs SNPs, nous avons demandé à Messieurs Christophe Klopp, coordinateur du projet SIGENAE au centre INRA de Toulouse et Cédric Cabau du centre INRA de Tours de nous fournir une nouvelle liste de SNPs répondant à des critères moins sélectifs que ceux publiés sur la base de données en ligne. En effet, pour qu'un SNP apparaisse sur la base de données, il fallait au moins 7 séquences à la position du SNP dont au moins 3 portant l'allèle minoritaire. Nous leur avons demandé d'alléger ces contraintes en réduisant à 5 séquences à la position du SNP dont au moins 2 portant l'allèle minoritaire.

Cette nouvelle recherche a permis d'allonger la liste de marqueurs SNPs potentiels en portant leur nombre à 307 au total répartis de la façon suivante :

- 78 SNPs répondant strictement aux critères imposés par la technique Illumina
- 217 SNPs dans les régions de 61 bases de part et d'autre contenant quelques polymorphismes éloignés du SNP d'intérêt

- 12 SNPs non retenus par les 2 recherches mais répondant au critère précédent

Pour finir, 77 SNPs *in vitro* ont été ajoutés à la liste. Ceux-ci proviennent en partie d'un séquençage de gènes potentiellement exprimés dans la gonade et 5 d'entre eux ont été précédemment publiés (Bai et al., 2009).

2.2.2. Génotypage des marqueurs SNPs

L'ADN utilisé pour le génotypage des SNPs correspond à un sous-échantillon de l'extraction d'ADN décrite précédemment. Le protocole utilisé a été fourni par les plateformes de génotypage de Toulouse (Article 1 et Article 5) et de Bordeaux (Article 4).

2.2.3. Dosage de l'ADN par mesure de la fluorescence

La technique Illumina étant très sensible à la quantité d'ADN réellement contenue dans les échantillons, ceux-ci ont été dosés par mesure de la fluorescence. Un intercalant de l'ADN, le PicoGreen®, est utilisé comme sonde fluorescente : sa fixation entre deux paires de bases de la molécule d'ADN double brin induit la formation d'un complexe luminescent. Celui-ci est excité à 510 nm puis le maximum de fluorescence est lu à 527 nm. Ensuite, la valeur obtenue est comparée aux valeurs obtenues pour une gamme-étalon dont les concentrations en ADN sont standardisées entre 0 et 100 ng/μL. Le protocole de dosage au PicoGreen® est détaillé dans l'Annexe 4.

2.2.4. Développement des marqueurs SNPs

2.1.2.6. Principaux résultats détaillés dans l'Article 1

Cet article présente le choix de marqueurs SNPs et le développement de deux jeux de 384 marqueurs pour l'huître creuse (Annexes 5 et 6) et l'huître plate à l'aide de la technologie BeadXpress Illumina. Le choix des SNPs a été réalisé à partir de séquences de gènes ou loci candidats pour des caractères d'intérêt, mais aussi à partir de bases de données principalement transcriptomiques. Chez l'huître creuse, qui nous intéresse dans le cadre de cette thèse, les SNPs du premier type, dit « *in vitro* », ont été principalement détectés à partir de l'alignement de séquences d'échantillons d'huîtres provenant de 24

huîtres grands-parents de familles F2 ségrégeantes au sein desquelles se trouvent les familles étudiées au cours de cette thèse. Le second type de SNPs, dits « *in silico* », a été obtenu après une analyse du 6^{ème} assemblage de la base de données transcriptomiques de *C. gigas* (http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html). Un total de 307 SNPs *in silico* et de 77 SNPs *in vitro* ont été choisis.

Le succès de génotypage est de 70,3% et le taux de conversion, qui n'inclut que les marqueurs polymorphes, est de 60,4%. Ces chiffres sont tout à fait comparables à ceux obtenus chez des espèces dites non modèles, c'est-à-dire ne disposant pas d'un nombre important d'informations génomiques ni du génome complet, comme c'était le cas au début de notre étude. Une analyse par simulation a également été réalisée afin d'estimer le nombre minimal de marqueurs nécessaires pour permettre des assignations de parenté chez cette espèce dans le cadre des programmes de sélection en cours de développement. La simulation s'est fondée sur des plans de fécondation tels que ceux réalisés au sein d'écloseries privées et sur les fréquences des allèles minoritaires estimées dans des populations sauvages incluses dans ce jeu de données. Il semblerait que 150 marqueurs SNPs permettent de réaliser, dans ces conditions, des assignations de parenté puissantes.

Un total de 1278 individus ont été génotypés avec ces marqueurs, dont 1084 appartenant à quatre familles ségrégeant pour la survie aux mortalités estivales de naissain (partie IV). Dans un second temps, les SNPs n'ayant pas fonctionné dans ce jeu de marqueurs, ont été remplacés par de nouveaux marqueurs à partir du 8^{ème} assemblage de la base de données huître de SIGENAE et utilisés dans le génotypage de familles pour lesquelles des QTLs liés à la reproduction et sa dynamique ont été recherchés (Partie III, Annexe 8).

2.1.2.7. Article 1 : Development of SNP genotyping arrays in two non-model shellfish species

« Développement de puces de génotypages SNPs chez deux espèces non-modèles de coquillages »

Sylvie LAPEGUE, Estelle HARRANG, Serge HEURTEBISE, Emilie FLAHAUW, Cécile DONNADIEU, Philippe GAYRAL, Nicolas GALTIER, Lucie GENESTOUT, Laetitia BARBOTTE, Rachid MAHLA, Pierrick HAFFRAY, Christophe KLOPP – En préparation pour soumission à Molecular Ecology Resources après correction de l'Anglais.

Cette étude étant un travail d'équipe, il est important de préciser les tâches que j'ai effectuées, seule ou accompagnée par les coauteurs :

- *La production et l'élevage des huîtres,*
- *L'extraction et le dosage de l'ADN au Nanodrop*
- *Le conditionnement de l'ADN en vue du génotypage*
- *La recherche des SNPs in silico*

2.1.2.7.1. Introduction

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are the most common type of heritable variation at the molecular level (Zhu et al., 2003) with for example around 4 million SNPs having been validated in humans (Sobrino et al. 2005). Their abundance in animal and plant genomes has led to their increased use in biological studies, from ecology to biology of evolution, and make them a central tool for population and quantitative genetics studies. They are widely used for genetic diversity analyses, the characterization of the genetic population structure, but also high-resolution genetic mapping, fine mapping of Quantitative Trait Loci (QTLs), linkage-disequilibrium based association mapping, parentage analyses, and marker-assisted selection. However their development and genotyping still remains a challenge in non-model species, for which the whole genome is still not sequenced and assembled (Seeb *et al.* 2011).

Molluscs are an important source of food for human consumption and are major fishery and aquaculture species all over the world, accounting for approximately 27% of the total aquaculture production (FAO 2009). By 2003, global production of the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, had expanded to 4.38 million tones, more than any other species of fish, molluscs or crustacean. Besides, in Europe, mussels and the European flat oyster, *Ostrea edulis*, remain an important aquaculture production based on natural recruitment in natural populations (mussels: 490000 t; *O. edulis*: 2700 t; FAO, 2009). Therefore molecular markers have been developed for decades to better characterize those species, populations and to be used as breeding programs tools. After allozymes, several mitochondrial sequences, AFLPs, microsatellites markers have been widely developed especially in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, for which several hundreds are now available allowing the development of first genetic maps (Hubert and Hedgecock 2004, Sauvage *et al.* 2010). Even if microsatellites remain the most popular markers in population genetic studies for non-model organisms (Guichoux *et al.* 2011) and to perform parentage assignment in aquaculture (Estoup *et al.* 1998; Haffray *et al.* 2012), this trend may soon be reversed in favor of SNPs due to the recent increase of commercially available genome-wide SNP arrays and high-throughput customer designed genotyping of targeted variants for biologically focused research.

There are two main differences between microsatellites and SNPs. First, as already mentioned, SNPs are more numerous than microsatellites in the genome of most species. On average, in the human genome, there is one SNP every 100-300 bp (Thorisson *et al.* 2005), compared to one SSR locus every 2-30 kb (Webster *et al.* 2002). Oysters are known for their high genetic variability (Hedgecock *et al.* 2005): in *Crassostrea gigas*, one SNP per 60 pb in coding regions and 40 bp in non-coding regions has been observed (Sauvage *et al.* 2007) and in *C. virginica*, the density of SNPs was estimated to be one every 20 bp on average (Zhang *et al.*, 2010). In the European flat oyster a recent study provided the estimations of an average density of 1 SNP every 76 bp in coding regions and 1 every 47 bp in non-coding regions (Harrang *et al.* 2013). Second the mutation rate per generation differs drastically between the two types of markers, with several orders of magnitude lower for

the microsatellites (Ellegren, 2000). As a consequence SNPs are typically diallelic (Krawczak 1999) whereas microsatellites generally have high allelic richness, reaching up to 20 in the European flat oyster (Taris *et al.* 2009; Lallias *et al.* 2010) and even 40 in the Pacific cupped oyster (Rohfritsch *et al.* 2013). Consequently, several SNPs are often needed for a single microsatellite to get the same resolution. Hence, on the basis of simulations, one may need 2 to 3 SNPs to have the same power than one microsatellite for linkage studies (Seddon *et al.* 2005). The ratio can be about 5 SNPs for 1 microsatellite in parentage analyses (Glaubitz *et al.* 2003) and can reach 4-12 SNPs for one microsatellites in genetic structure studies depending on the private alleles present in SNPs (Rosenberg *et al.* 2003) or 5-20 in association studies (Ohashi and Tokunaga, 2003). In QTL detection and fine genome mapping, increasing the number of markers is clearly of interest and their usefulness will depend on the polymorphism present in the initial biological material.

The abundance of SNPs in plant and animal genomes together with the cost reduction of detection and genotyping, and the increased throughput favor the usage of SNPs in most studies. A large number of SNP genotyping technologies were developed in recent years (Gupta *et al.* 2008) including medium to high throughput SNP genotyping methods in non model species (Garvin *et al.* 2010). Among them the Golden Gate Genotyping technology from Illumina that has been reported as a reliable technology allowing to genotype large collections of samples (up to 480) for hundreds of SNP markers (up to 3072), displaying high levels of SNP conversion rate and reproducibility (Ganal *et al.* 2009). This assessment was corroborated in outbred species with high levels of nucleotide diversity (Grattapaglia *et al.* 2011). Therefore this approach was chosen for both oyster species included in this study, which are undomesticated and very polymorphic at the nucleotide level. SNPs can be detected by amplicon resequencing targeting specific genes of by large *in silico* sequence resources. In both the Pacific cupped oyster and the European flat oyster, large EST databases have been recently obtained (Fleury *et al.* 2009; Morga *et al.* 2011, 2012; Cahais *et al.* 2012) and allows the *in silico* approach whereas resequencing of amplicon was already performed to detect a few SNPs in first linkage (Sauvage *et al.* 2010), populations structure or evolutionary studies (Rohfritsch *et al.* 2013; Harrang *et al.* 2013).

Therefore, we describe in this paper the discovery and design of the first sets of 384 SNP markers, with the two *in vitro* and *in silico* detection approaches, both in the Pacific (Annexes 5 et 6) and European flat oyster using the Illumina BeadXpress genotyping system. As breeding programs are developing for the Pacific cupped oyster, we also included a simulation analysis for this species in order to investigate the potential use of a sub panel of the array in parentage analysis.

2.1.2.7.2. Material and methods

2.1.4.2.2.1. **Biological material**

For the Pacific cupped oyster, biological material consisted in 1084 individuals involved in four different three-generation outbred pedigrees, used for linkage and QTL mapping for survival to spat summer mortalities. Furthermore we added 194 samples from five European wild and selected populations, for a total of 1278 individuals. For the European flat oyster less individuals were used (1070 in total), however similarly consisting in 434 individuals involved in two different three-generation outbred pedigrees used for linkage and QTL mapping and 636 from 16 natural populations sampled all over Europe.

DNA was extracted from gills using a Wizard® DNA Clean-up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) when the samples were collected in 70% alcohol and a QiAamp DNA mini kit (Qiagen) when the samples were fresh or frozen. DNA quantification was performed with a Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, LLC, Willington, DEL, USA).

2.1.4.2.2.2. **SNP discovery and selection for array construction**

For each species, two sets of sequences were considered. The SNPs that were detected in sequences obtained by sequencing several individuals for candidate genes in the lab will be referred as *in vitro* SNPs. The SNPs that were detected by aligning different sequences from databases of contigs will be referred as *in silico* SNPs.

For the Pacific cupped oyster, *in vitro* sequencing investigated 103 loci from ESTs developed in the Pacific oyster and retrieved from the Genbank database

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) as well as from specific libraries obtained in order to detect genes involved in summer mortalities events (Fleury *et al.* 2009). Primers were designed using the online software Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000). For a first set of ESTs (61), 24 oysters belonging to a third generation of selection for the resistance to summer mortality were used for this SNP discovery phase (Sauvage 2008; Sauvage *et al.* 2007). A second set of ESTs (42) were added and 10 of the 24 oysters were used for sequencing as described in Sauvage *et al.* (2007). Sequence alignment was performed with ClustalW via the BioEdit interface (Hall 1999) and DNAMAN version 4.1 (www.lynnon.com). The validity of each SNP was checked individually on nucleotide sequences and sequence alignments. Finally 5 SNPs were added from the 20 developed by Bai *et al.* (2009).

For the *in silico* SNPs, we investigated the 6th assembly of the *Crassostrea gigas* EST database (http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html). The database contained results of the assembly of 55,851 public ESTs from dbEST and 417 Genbank mRNA sequences. The assembly, performed by tgi (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/>), produced an alignment file from which 1370 SNPs were extracted. We looked for SNPs that followed the initial criteria: a minimal depth of 7 sequences with a minimal number of 3 identical alleles for the less frequent one, and the absence of any other SNP in the 60 bp (left and right) segment flanking the analyzed SNP. As those conditions appeared too stringent, not allowing us to get enough SNPs, we relaxed those criteria with a minimal depth of 5 sequences with a minimal number of 2 identical alleles for the less frequent one, and the possibility to have another SNP among the 120 bp around the SNP, although not frequent and far from the analyzed SNP.

For the European flat oyster, *in vitro* sequencing investigated 40 loci from two EST libraries (Morga *et al.* 2011, 2012). Primers were designed using the online software Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000). A total of 16 oysters from 4 different natural populations collected on the Atlantic and Mediterranean coasts were used to investigate polymorphism. The PCR and sequencing protocols were the same as in Harrang *et al.* (2013). Sequence alignment was performed with ClustalW via the BioEdit interface (Hall 1999). The validity of each SNP was checked individually on nucleotide sequences and sequence alignments.

For the in silico SNPs, we investigated a beta assembly of the transcriptome of *O. edulis* from the PopPhyl EST database (Cahais *et al.* 2012). Briefly, for *O. edulis*, this database was constructed from RNA (extracted according to Gayral *et al.* 2011) of 8 individuals from the natural range. The 454 and the Illumina reads have been assembled using a multi kmer strategy (kmers : 37, 41, 45, 49, 53, 57 and 61 assembled with velvet version 1.1.03. Contigs longer than 100 bp from every assembly were then meta-assembled with tgi (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software/). The Illumina reads have been remapped on the contigs using bwa (0.5.9-r16) and a compressed alignment file has been produced using samtools view (version 0,1,11). The alignment file was then used to call the SNPs with samtools pileup and varFilter (version 0,1,11). We looked for SNPs that represented different contigs, with a minimum depth of 20 to 500 sequences and no other SNP among the 120 bp around the SNP. The Phred score was initially settled at 20 but could be increased to reach the highest value (228) according to the high number of SNPs available.

2.1.4.2.2.3. SNP genotyping array

The Illumina GoldenGate technology (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) was used to carry out the genotyping reactions in accordance with the manufacturer's protocol (Lin *et al.* 2009, Fan *et al.* 2006). Respectively ten and four DNA samples were duplicated across the different plates for the cupped and flat oyster assays, in order to assess the reproducibility of the genotyping assay. One negative control (water) was also added to each of the 15 plates of the two assays. Data generated from the BeadXpress™ reader were analysed with GENOMESTUDIO software for automated genotype clustering and calling. A quality score for each genotype was generated. GenCall and GenTrain scores measure the reliability of SNP detection based on the distribution of genotypic classes (AA, AB and BB). A GenCall score cutoff of 0.25 was used to determine valid genotypes at each SNP and the SNPs retained had to get a minimum GenTrain score of 0.25. These scores represent stringent thresholds previously applied in studies of different species (human: Fan *et al.* 2003; trout: Sanchez *et al.* 2009; pine: Lepoittevin *et al.* 2010).

Then for each sample, the Call rate was calculated as the number of SNPs for which a genotype was obtained. If the call rate of a sample was below the call rate of the negative

control, the sample was discarded from the analysis. Furthermore, samples that showed a GC50 too different (± 0.01) from the mean of the samples were also discarded from the analysis.

Clusters were visually inspected to ensure high quality data (Figure 16). SNPs that did not show clear patterns of cluster separation were excluded from further analysis. It usually corresponded to situations of cluster compression (i.e. when the homozygous clusters normalized theta values were not in the [0, 0.1] or [0.9, 1] ranges). Indeed, the compression of the BB homozygous cluster towards the AA cluster could result from a paralog gene matching the A allele, increasing the signal for the A dye for both BB and AB genotypes.

The Minor Allele Frequencies (MAF) of each SNP was calculated in both arrays.

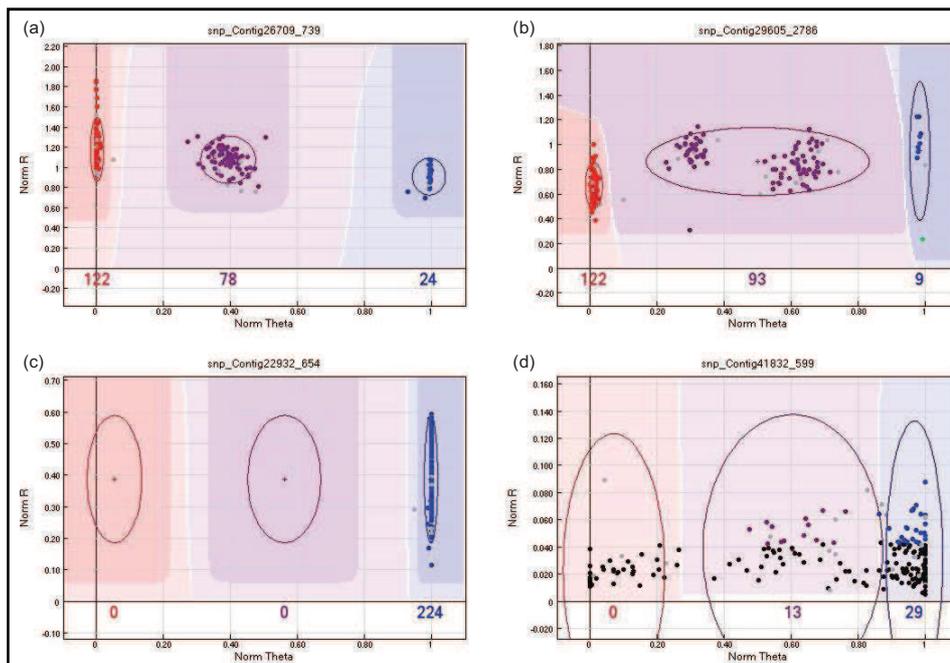


Figure 16. Examples of clustering results obtained for the *Ostrea edulis* SNP array. Each dot represents a single sample among a subset of 224 *O. edulis* samples and four SNPs. The y axis (Norm R) is the normalized sum of intensities of the two dyes involved, and the x axis (Norm Theta) represents the normalized Theta between 0 (homozygous for allele A) and 1 (homozygous for allele B). (a) Pattern considered as successful and polymorphic with the three clusters (AA in red, AB in purple, BB in blue). (b) Atypical pattern with two heterozygous clusters that was however considered as successful as those two clusters encompassed samples from two different populations and the different clusters were well separated. (c) Pattern considered as successful but monomorphic. (d) Pattern showing ambiguous clustering with a low intensity, considered as a failed SNP

2.1.4.2.2.4. Parental assignment power

For the Pacific cupped oyster, for which several breeding programs are being developed, we performed an analysis in order to determine an efficient and accurate SNP panel for parental assignment. Therefore we used AccurAssign[®] software (Barbotte *et al.* 2012) that uses the probabilities of Mendelian transmission of the markers together with the maximum of likelihood for *in silico* validation. Briefly, the genotypes of parents and offspring of a given cross are simulated on the basis of the allelic frequencies of the markers in a set of populations (here the set provided by 4 population samples of the Pacific cupped oyster). Genotyping errors can be taken into account. Then the likelihood of a pair of parents for a given offspring is estimated. When all the parents are present in the scheme, four situations can be met: the pair of parents is correct, incorrect, one parent can't be assigned, none of the parents can be assigned. In this study we compared six panels of 50, 75, 100, 150 or 200 SNPs. The cross used to generate the simulated offspring involved 14 sires and 16 dams (each sire is crossed with 3 dams), on 3 generations. Two hundreds offspring have been generated in total. The genotypes of all parents and 200 offspring were generated, and a genotyping error rate and a missing genotypes rate of respectively 1% and 5% were applied. Then we compared the likelihood of each pair of parents considering the difference between the first and second more likely pair of parents, and the four situations described above.

For the flat oyster, a total of 420 *in vitro* SNPs were detected in the dataset of 40 sequenced fragments. Among them, the indels (n=34) were discarded. Moreover, 347 SNPs were also discarded because of neighboring polymorphisms or low functionality scores. However as we wanted some genes of interest to be represented in the dataset of SNPs, we kept a few (n=13) of them with neighboring polymorphisms. To favor genotyping, polymorphic nucleotides were assimilated to degenerate nucleotides. In total, 52 *in vitro* SNPs were included in the assay representing 35 different gene fragments. On the other hand, a total of 1305 *in silico* SNPs fitted the proposed criteria. Therefore we chose the SNPs with the highest Illumina Functionality score (>0.935) to complete the array with 332 SNPs (Figure 17).

Finally, for both species, the SNPs were mainly chosen in the highest]0.9-1] class of Illumina Functionality scores (Figure 17), especially for the *in silico* SNPs of *O. edulis* (100%). However, SNPs with lower scores were kept (even lower than 0.6 as recommended by Illumina) as (1) for *in vitro* SNPs as we wanted to try to keep as much as possible of SNPs located in genes related to traits of interest, (2) for *C. gigas* we did not have a lot of SNPs even after we relaxed the criteria. The list and characteristics of the SNPs in both arrays are given in Tables S1 and S2.

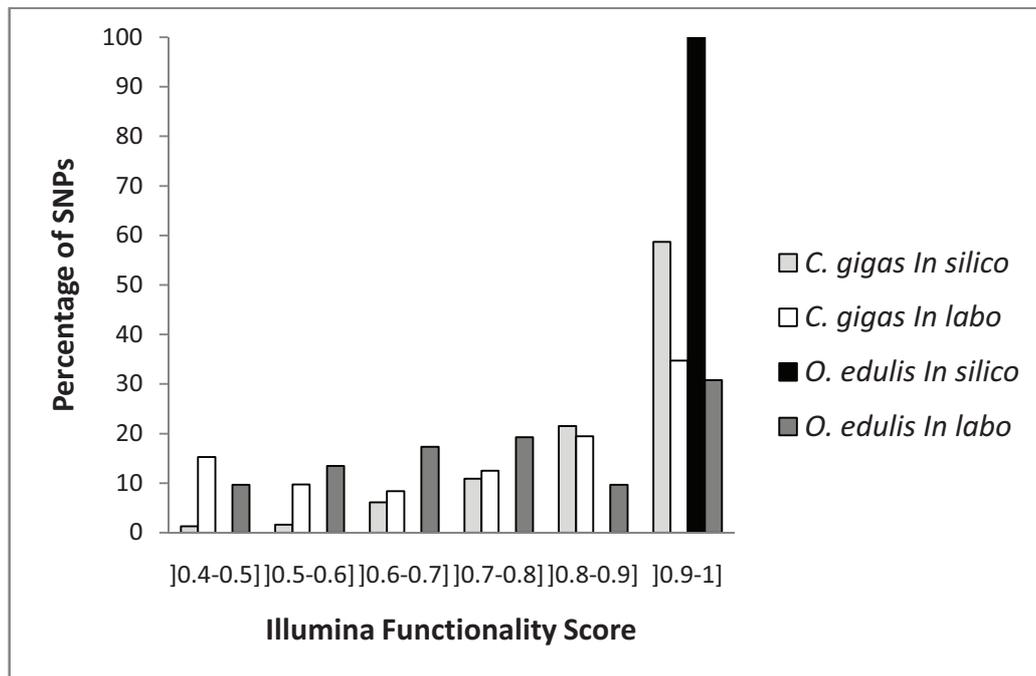


Figure 17. Illumina Functionality scores of the SNPs from the *C. gigas* and *O. edulis* arrays according to their *in vitro* or *in silico* origin.

2.1.4.2.2.5. Reproducibility and success rate

According to the call rate and GC50 estimated for the samples, 24 *C. gigas* and 29 *O. edulis* samples were excluded from further analyses, which correspond to a loss of respectively 2.2% and 2.7 % of the samples. For the 10 replicated samples in the cupped oyster and the 4 replicated samples in the flat oyster, the same genotype was observed over the replicates within or between plates, yielding a reproducibility rate of 100%.

Based on the GenTrain score and visual inspection of the cluster separation (Figure 16), 232 were considered as polymorphic for *C. gigas*, while 38 were monomorphic and 114 failed. For *O. edulis* 234 SNPs were polymorphic whereas 67 were monomorphic but 83 failed. The main difference between the two arrays, when considering the two types of SNPs (*in silico* and *in vitro*), comes from the higher percentage of *in vitro* SNPs that failed compared to *in silico* SNPs for *O. edulis* (Figure 18). Hence, for *O. edulis*, *in vitro* SNPs showed significantly higher genotyping success compared to *in silico* SNPs (+30% with χ^2 -test P-value of 1.9e-06). For *C. gigas*, we observed an independency between the category of the SNPs (failed, polymorphic, monomorphic) and its origin (*in silico*, *in vitro*) with χ^2 -test P-value of 0.05951.

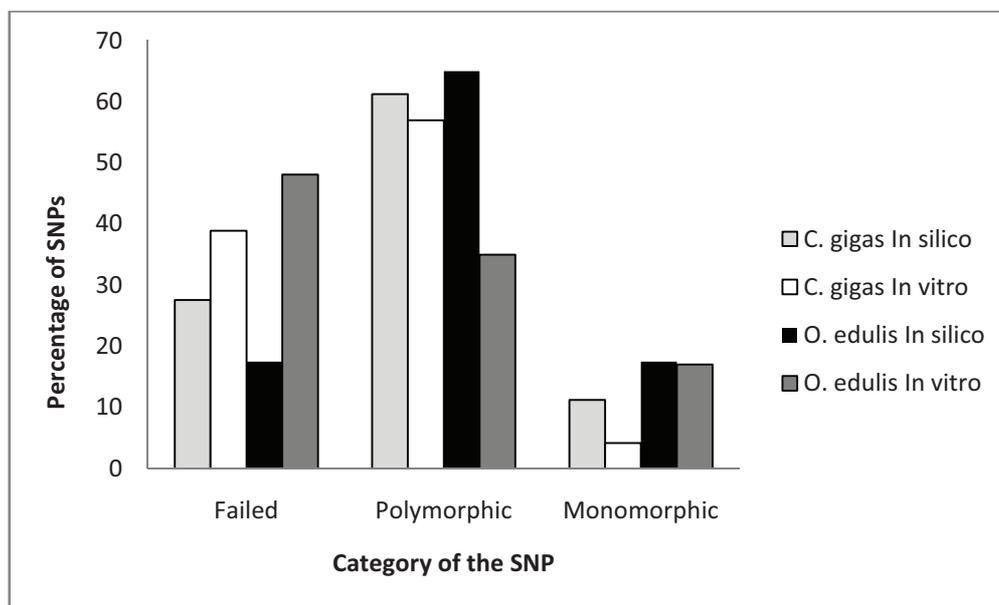


Figure 18. Percentage of SNPs for which the genotyping failed, or that were considered as polymorphic or monomorphic according to their *in vitro* or *in silico* origin and for both arrays.

The GenTrain scores repartition of the polymorphic SNPs were very similar for both species: 4% and 10% below 0.5, 50% and 50% between 0.5 and 0.8 and 47% and 39% above 0.8, respectively for *C. gigas* and *O. edulis* polymorphic SNPs.

We measured the global success of the genotyping assay with the success rate which corresponds to the number of SNPs that were successfully genotyped divided by the total number of SNPs in the assay. This rate includes both monomorphic and polymorphic SNPs.

Then we measured the conversion rate which corresponds to the number of polymorphic SNPs only divided by the total number of SNPs in the assay, as defined by Fan et al. (2003). For *C. gigas*, the global success rate was 70.3% and the conversion rate 60.4%. Those rates were very similar to those measured for *O. edulis* with 78.4% for the global success rate and 60.9% for the conversion rate.

Interestingly, this success was not strictly correlated with the Illumina Functionality score (Figure 19) but showed a significant increase after the score of 0.7, between 65 and 80% for *C. gigas* and 60 and 81% for *O. edulis* (respectively P-values of 0.0027 and 0.0001).

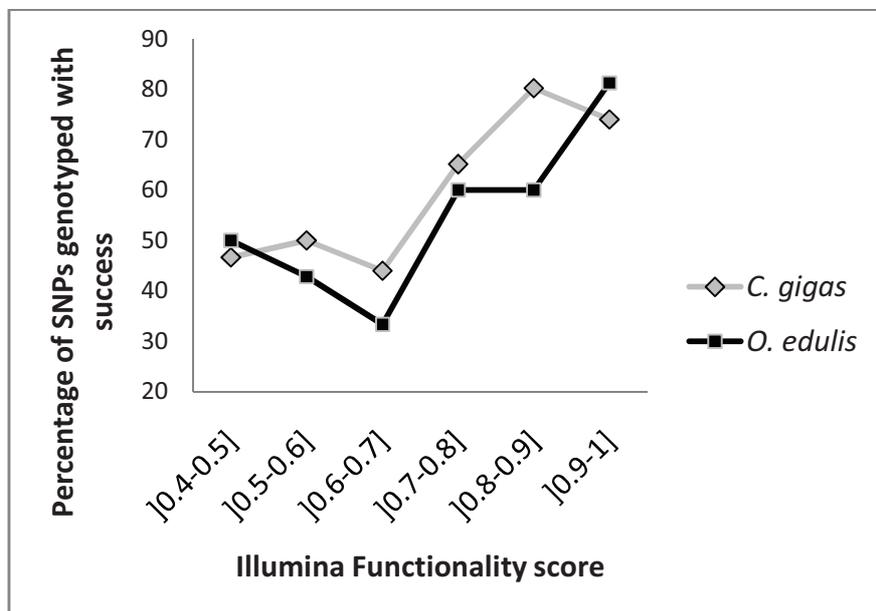


Figure 19. Percentage of SNPs that were genotyped with success in relation with their Illumina Functionality score for both arrays.

Finally MAF indicated a biased frequency for low frequencies for *C. gigas* as 30% of SNPs (Figure 20).

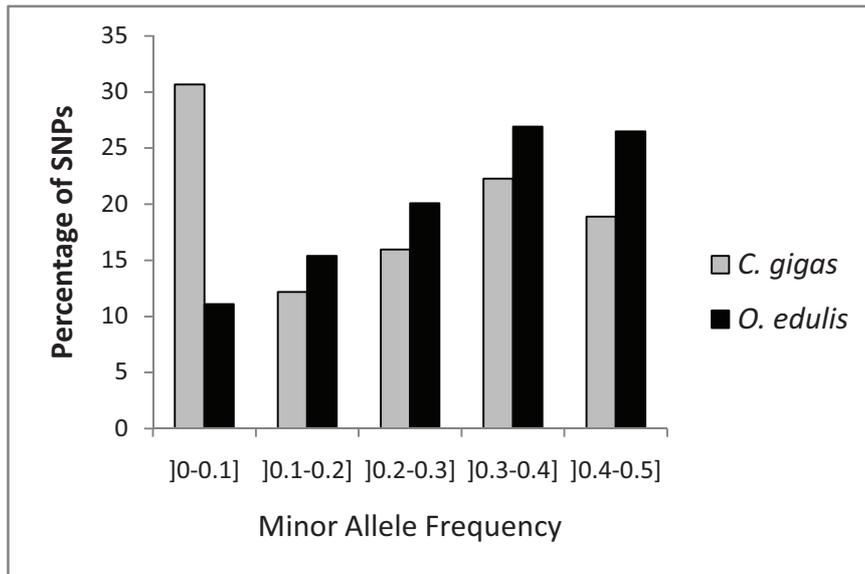


Figure 20. Allele frequency spectrum for the 232 and 234 polymorphic SNPs genotyped respectively in *C. gigas* and *O. edulis* populations.

A subset of 203 SNPs successfully genotyped on 156 samples from four European wild and selected populations were focused on in order to characterize the power of SNP panels for assignment. Estimations of mean MAF in those four populations were all very close to 0.3 (Figure S1).

2.1.4.2.2.6. Power of SNP panels for assignment

Based on the estimation of MAF in a subset of 203 SNPs and four wild and selected populations, simulations were performed in order to test the power of assignment of several SNPs panels (Figure 21). When all the parents are present in the scheme, four situations can be met: the pair of parents is correct (in green), incorrect (in red), one parent can't be assigned (in dark blue), none of the parents can be assigned (light blue). In this study we compared six panels of 50, 75, 100, 150 or 200 SNPs. From 150 markers, we can observe that no pairs of parents were incorrect and the group of offspring assigned to their both parents can be distinguished from false positive results linked to one or two parents missing. Therefore we can consider that at least 150 markers from this panel with a mean MAF of 0.3 are useful to perform a powerful parental assignment.

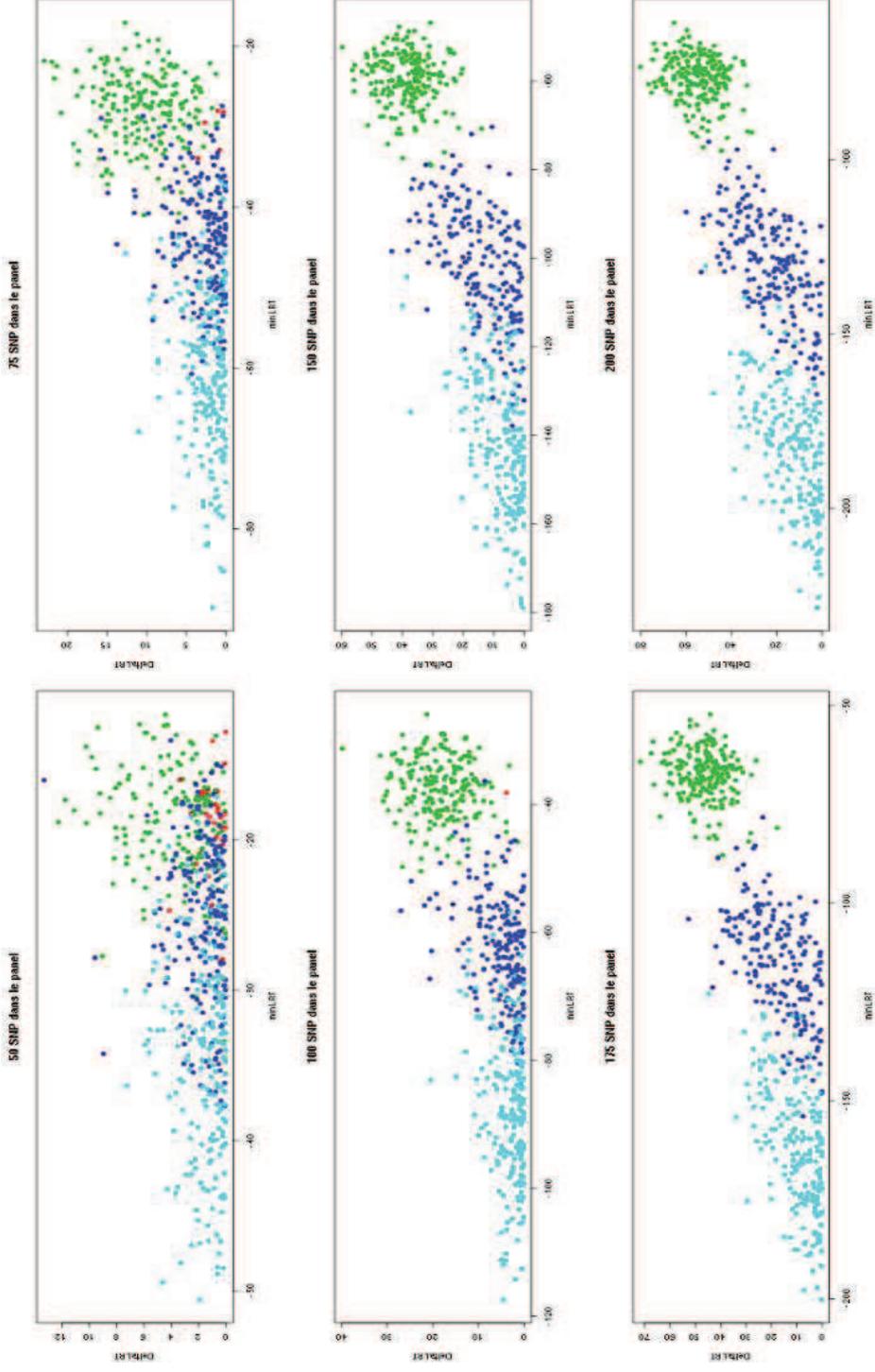


Figure 21. Use of assignment likelihood to distinguish between Likelihood of each pair of parents to be the real pair of each offspring (dot) considering the difference between the first and second more likely pair of parents. This representation allows to distinguish between real positive results (the parents are correct in green or incorrect in red) from false positive results (one parent in dark blue or two parents in light blue are missing).

2.1.2.7.3. Discussion

In non model species a classical approach to discover SNPs relies on sequencing random genomic DNA fragments (Primmer *et al.* 2002) or targeting conserved regions of orthologous sequences from closely related species (Aitken *et al.* 2004). In oysters, this second strategy was initiated thanks to the availability of candidate genes of interest for a better understanding of the physiology, reproduction, immunology of this species (Huvet *et al.* 2004; Renault *et al.* 2011). However this approach yielded in a relatively low number of markers for an important effort, but a real contribution of those markers to better characterize the genetic structure of populations (Rohfritsch *et al.* 2013) and develop genetic maps and allow the detection of QTLs of traits of interest in aquaculture (Sauvage *et al.* 2009). Moreover SNPs derived from ESTs are located in functional genes allowing establishment of potential links between functional genetic variation and those traits.

Among the variety of technologies available for SNPs genotyping, our main concern was the flexibility in terms of multiplexing and Illumina's Goldengate assays were allowing 48-384 loci to be genotyped in a single reaction with the BeadXpress platform and 96-1536 with BeadArray platform. Hence we did not know how many SNPs could be retrieved after the *in silico* analyses. When comparing both oyster species, we can see that the database availability is of importance. Hence we had to be less stringent for *C. gigas* SNP discovery in order to retrieve enough SNPs to be submitted to Illumina. This can be observed in the lower proportion (60%) of *in silico* *C. gigas* SNPs with Illumina functionality score comprised between 0.9 and 1, compared to the 100% *in silico* SNPs available in this same category for *O. edulis* SNPs. However when comparing the genotyping success between both species, the main difference between the two arrays, comes from the higher percentage of *in vitro* SNPs that failed compared to *in silico* SNPs for *O. edulis* (+30%, Figure 18) leading to a bad conversion rate for those *in vitro* *O. edulis* SNPs. We did not observe this for *in vitro* *C. gigas* SNPs although the repartition of *in vitro* SNPs for *C. gigas* and *O. edulis* were very similar between the classes of Illumina functionality scores (Figure 17). Contrary to our observations, a different conversion rate pattern between *in silico* and *in vitro* SNPs is more generally expected in favor of *in vitro* SNPs (e.g. Lepoittevin *et al.* 2010). Hence, genotyping

failures could arise from low quality of SNPs flanking sequences, or from the presence of an exon-intron junction near the SNP of interest (Wang *et al.* 2008). However error sequencing could either be observed in both *in vitro* or *in silico* SNPs as this step is performed in both cases, leading to false-positive SNPs (pseudo-SNPs). In our case, this difference between the two arrays could be partially due to the impact of the sample size at the SNP discovery step on the conservation rate (Lepoittevin *et al.* 2010) as 24 samples were sequenced in *C. gigas* and 16 samples in *O. edulis*.

It has to be noted that the *C. gigas* database is regularly updated and the last assemble performed is the 8th one in March 2011 (http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html). Although the database we explored in 2009 contained results of the 6th assembly of 55,851 public ESTs from dbEST and 417 Genbank mRNA sequences, this same database is now containing results of the 8th assembly of 1,013,570 public ESTs from dbEST and Genbank mRNA sequences. Therefore we can expect a far higher number of potential SNPs to be included in future genotyping arrays.

Besides, without considering the SNP origin criteria, both arrays were very similar in terms of GenTrain scores repartition of the polymorphic SNPs with 4% and 10% below 0.5, 50% and 50% between 0.5 and 0.8 and 47% and 39% above 0.8, respectively for *C. gigas* and *O. edulis* polymorphic SNPs, indicating a good success of genotyping. When those rates were completed by a visual inspection of the clusters, the global success rates were respectively 70.3% and 78.4% for *C. gigas* and *O. edulis*, and the conversion rates were respectively 60.4% and 60.9%. Those conversion rates are relatively slower when compared to those obtained in non-model species such as 66.1% to 71% in Eucalyptus (Grattapaglia *et al.* 2011), or 66.9% and 68.75% the maritime pine (Lepoittevin *et al.* 2010; Chancerel *et al.* 2011) but higher than the 40.6% obtained in catfish (Wang *et al.* 2008). It is however very far from the success rates obtained in model species which can rely on much more genomic databases or even whole genomes sequenced such as soybean (Hyten *et al.* 2008), barley (Rostoks *et al.* 2006), pea (Deulvot *et al.* 2010), maize (Yan *et al.* 2009), or barrel medic (Loridon *et al.* 2013) that often exceeded 80%. However the conversion rate can drastically vary upon the screening population used to detect SNPs. Hence this rate can be as low as 12.5-19.5% or

12.3-18.4% in F2 mapping families in maritime pine (Chancerel *et al.* 2011) or sugar pine (Jermstad *et al.* 2011) for SNPs that were not a priori screened for their polymorphism in the mapping pedigrees. On the contrary, it can reach 86% in a 384-array that was designed on the polymorphisms of the parents of the map in a non-model species such as *Cucurbita pepo* (Esteras *et al.* 2012). In non model species more particularly, genotyping failures may be due to (1) low quality of SNPs flanking sequences, (2) the presence of an exon-intron junction near the SNP of interest, or (3) the assembly and/or amplification of paralogous sequences, leading to false-positive SNPs. In this last case, it has been observed the shifting of the two homozygous clusters together, leading to a “cluster compression” (Hyten *et al.* 2009; Yan *et al.* 2010). Therefore those SNPs patterns have been discarded even when showing a clear cluster separation.

Finally this GoldenGate technology appears robust for genotyping even in non-model species. Hence although the functionality score calculated by the Illumina Assay Design Tool is a first indication on the likelihood for a SNP to be successfully genotyped, it appears that SNPs with low scores can however be genotyped. This is particularly important when SNPs of interest need to be included in an assay, for example if they represent loci of interest (outliers in population genetics or QTLs to be included in a genotyping panel in selection). In the two oyster arrays, 30 to 50% of SNPs with scores below 0.7 could be genotyped. Upon this score, the genotyping success increased importantly between 60 to 80%. This is in agreement with different studies performed in non model species (Lepoittevin *et al.* 2010; Pavy *et al.* 2008) and with Illumina’s recommendations of using only SNPs with a functionality score above 0.6 to ensure a high success rate for the array. However in oysters’ arrays, this threshold seems to be 0.7 for a clear improvement. Both arrays were very powerful as we observed an excellent reproducibility and as only a few samples had to be excluded. It has to be noted particularly for the *C. gigas* array as half of the individuals from the QTL families were dying when sampled, that led to a lower DNA quality, which however did not reduce notably the genotyping results.

When considering the informativeness of such arrays in different kind of studies, the MAF parameter is of interest in order to be aware of potential biases in interpreting

genotyping data. For example rare alleles might influence the estimations of parameters in population genetics (ref). In our oyster arrays, we observed a particularly high number of *C. gigas* SNPs showing a low MAF (31% of the SNPs with a MAF below 10%). This could be a consequence of the panel used to detect *in vitro* SNPs included in the assay. Hence *in vitro* SNPs were detected on a small number of animals being the parents of QTL families and originating of Marennes-Oléron bay. However the proportion of *in vitro* SNPs among all SNPs with a MAF below 0.1 was the same order as the proportion of *in vitro* SNPs in the polymorphic panel of SNPs (respectively 20 and 17%). Consequently this high number of SNPs with a low MAF is mainly based on *in silico* SNPs. The difference of stringency applied for the SNP discovery of both arrays could explain this result.

Although next-generation genotyping promises to become a powerful force for population genomics and genomic selection, low to medium arrays will continue to be sufficient for many applications especially in non-model species (Seeb et al. 2012). The powerful and flexibility of those arrays will be used in several flat oyster population studies at the European and more regional scale in order to characterize the genetic diversity and structure of oyster populations, potentially identify discontinuity in the distribution of allele frequencies and signature of selection. The *C. gigas* panel will be tested for the characterization of the very closely related sub species *C. gigas* and *C. angulata* (Huvet et al. 2004) in order to confirm admixture observed in nature and characterize a set of diagnostic markers for the development of tools to be applied for conservation and management of both species (e.g. Pritchard et al. 2012; Burgarella et al. 2009). This panel will also be used to characterize the French cupped oyster resources at the origin of programs of selection. Furthermore it might allow a better characterization of the QTLs detected for a better survival to spat summer mortalities (Sauvage et al. 2010). Without already thinking of Marker Assisted Selection, medium-throughput genotyping technologies can already be useful in oyster breeding programs that are currently developing in providing tools improving the management of stocks or the phenotyping of mixed families in hatchery. Therefore we performed a simulation analysis in order to identify a first order of magnitude of markers that might be necessary to provide a powerful tool for parental assignment in the

cupped oyster. For the four wild oyster populations we observed a mean MAF close to 0.3 for a subset of our panel, which is also the value observed after the genotyping of families produced in shellfish hatcheries (Haffray *et al.* 2013). Therefore we based our simulations on this value and observed that at least 150 markers from this panel with a mean MAF of 0.3 are useful to perform a powerful parental assignment. This result was the same order of magnitude that the one estimated for French bovine parental assignment (Barbotte *et al.* 2012), however considering crosses that are relevant for shellfish hatcheries (P. Haffray, pers. com.). This panel could be useful in parental assignment in breeding programs but also in restocking programs that are considered for the Pacific cupped oyster. Finally those first SNP panels are prone to be improved, especially the *C. gigas* one thanks to the availability of new transcriptomic assemblies and the recently sequenced genome (Zhang *et al.* 2012).

2.1.2.7.4. Acknowledgements

We thank projects that supported those researches: GigADN project was supported by FranceAgrimer (contract n°SIVAL NL: 2010-1021) with the active participation of Gildas Gautier (SFC breeding company, Noirmoutier France) and Marc Vandeputte (INRA). GAMETOGENES project (ANR-08-GENM-041) was partially funded by a grant from the Agence National de la Recherche « Génomique animale » Programme (ANR-08-GENM-041). The authors are grateful to all members of staff of the Ifremer hatchery in La Tremblade and of the nursery in Bouin for producing and rearing the oysters. SEAFARE project (Sustainable and Environmentally Friendly Aquaculture for the Atlantic Region of Europe – n°2009-1/123) was partially funded by, the Atlantic Area Transnational Program (2007–2013). The authors wish to acknowledge the support from the Genomic platform of Genopole Toulouse Midi Pyrénées, on which genotyping work has been performed.

2.1.2.7.5. References

Bai J, Li Q, Kong LF et al. (2009) Characterization of 20 single nucleotide polymorphism markers in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics*, **40**, 1004-1005.

Barbotte L, Boichard D, Genestout L, Haffray P, Chapuis H, Chantry-Darmon C, Boscher M. Y. (2012). A new parental assignment tool for complex mating and large number of animals. In *Abstract Book 33rd Conference of the International Society for Animal Genetics* (p. 100), Cairns, Australie.

Burgarella C, Lorenzo Z, Jabbour-Zahab R et al. (2009) detection of Hybrids in nature : application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity*, **102**, 442-452.

Cahais V, Gayral G, Tsagkogeorga G, Melo-Ferreira J, Ballenghien M, Weinert L, Chiari Y, Belkhir K, ranwez V, Galtier N (2012) Reference-free transcriptome assembly in non-model animals next-generation sequencing data. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 834-845.

Chancerel E, Lepoittevin C, Le Provost G et al. (2011) Development and implementation of a highly-multiplexed SNP array for genetic mapping in maritime pine and comparative mapping with loblolly pine. *BMC Genomics*, **12**, 368.

Eklblom R, Galindo J (2011) Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*, **107**, 1-15.

Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, **49**, 746-756.

Estoup A, Gharbi K, SanCristobal M, Chevalet C, Haffray P, Guyomard R (1998) Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, 715-725.

Esteras C, Gomez P, Monforte AJ et al. (2012) High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. *BMC Genomics*, **13**, 80.

Fan JB, Oliphant A, Shen R et al. (2003) Highly parallel genotyping. *Cold Spring Harbor symposia on Quantitative Biology*, **68**, 69-78.

Fan JB, Gunderson KL, Bibikova M et al. (2006) Illumina universal bead arrays. *Methods in Enzymology*, **410**, 57-73.

Fleury E, Huvet A, Lelong C, et al. (2009) Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics*, **10**, 341.

Ganal MW, Altmann T, Roder MS (2009) SNP identification in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 211-217.

Garvin MR, Saitoh K, Gharrett AJ (2010) Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 915-934.

Gayral P, Weinert L, Chiari Y, Tsagkogeorga G, Ballenghien M, Galtier N (2011) Next-generation sequencing of transcriptomes: a guide to RNA isolation in non-model animals. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 650-661.

Haffray P, Genestout L, Barbotte L, Lapègue L (20013) GigADN : Tentative de mise au point du contrôle de filiation avec des marqueurs ADN chez l'huître creuse. Rapport final FranceAgrimer, 27pp.

Glaubitz JC, Rhodes OE, DeWoody JA (2003) Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, **12**, 1039-1047.

Guichoux E, Lagache L, Wagner S *et al.* (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology resources*, **11**, 591-611.

Grattapaglia D, Silva-Junior O, Kirst M, Marco de Lima M, Faria DA, Pappas Jr GJ (2011) SNP genotyping in the highly heterozygous genome of Eucalyptus: assay success, polymorphism and transferability across species. *BMC Plant Biology*, **11**, 65.

Gupta PK, Rustgi S, Mir GG (2008) Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity*, **101**, 5-18.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.

Haffray P, Bugeon J, Rivard Q, Quittet B, Puyo S, Allamelou J.M., Vandeputte M., Dupont-Nivet M (2013). Genetic parameters of in-vivo prediction of carcass, head and fillet yields by internal ultrasound and 2D external imagery in large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In press in *Aquaculture*.

Harrang E, Lapègue S, Morga B, Bierne N (2013) A high load of non-neutral amino-acid polymorphisms explains high protein diversity despite moderate effective population size in a marine bivalve with sweepstakes reproduction. *Genes Genomes Genetics*, **3**, 333-341.

Hedgecock D, Gaffney PM, Gouletquer P, Guo X, Reece K, Warr G (2005) A case for sequencing the Pacific oyster genome. *Journal of Shellfish Research*, **24**, 429–441.

Hubert S, Hedgecock D (2004) Linkage maps of DNA microsatellite markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, **168**, 351-362.

Huvet A, Fabioux C, McCombie H, Lapègue S, Boudry P (2004) Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine Ecology Progress Series*, **272**, 141-152.

Hyten DL, Song Q, Choi I-Y *et al.* (2008) High-Throughput genotyping with the GoldenGate assay in the complex genome of soybean. *Theoretical and Applied genetics*, **116**, 945-952.

Jermstad KD, Eckert AJ, Wegrzyn JL *et al.* (2011) Comparative mapping in pinus: sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.) and loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and Genomes*, **7**, 457-468.

Krawczak M (1999) Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms. *Electrophoresis*, **28**, 1676-1681.

Lepoittevin C, Frigerio J-M, Garnier-Géré P *et al.* (2010) *In vitro* versus *in silico* detected SNPs for the development of a genotyping array: what can we learn from a non-model species ? *Plos ONE*, **5**, e11034.

Lallias D, Boudry P, Lapègue S, King J, Beaumont AR (2010) Strategies for the retention of high genetic variability in European flat oyster (*Ostrea edulis*) restoration programmes. *Conservation Genetics*, **11**, 1899-1910.

Lin CH, Yeakley JM, McDaniel TK, Shen R (2009) Medium- to high-throughput SNP genotyping using VeraCode Microbeads. In: Bugert P, ed. DNA and RNA Profiling in Human Blood. New York: Humana Press. Pp 129-142.

Loridon K, Burgarella C, Chantret N *et al.* (2013) Single-nucleotide polymorphism discovery and diversity in the model legume *Medicago truncatula*. *Molecular Ecology Resources*, **13**, 84-95.

Morga B, Arzul I, Faury N, Segarra A, Chollet B, Renault T (2011) Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an *in vitro* infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**, 323-333.

Morga B, Renault T, Arzul I (2012) New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish & Shellfish Immunology*, **32**, 958-968.

Ohashi J, Tokunaga K (2003) Power of genome-wide linkage disequilibrium testing by using microsatellite markers. *Journal of Human Genetics*, **48**, 487-491.

Pavy N, Pelgas B, Beauseigle S *et al.* (2008) Enhancing genetic mapping of complex genomes through the design of highly-multiplexed SNP arrays : application to the large and unsequenced genomes of white spruce and black spruce. *BMC Genomics*, **9**, 17.

Pritchard VL, Abadia-Cardoso A, Garza JC (2012) Discovery and characterization of a large number of diagnostic markers to discriminate *Oncorhynchus mykiss* and *O. clarkii*. *Molecular Ecology Resources*, **12**, 918-931.

Rohfritsch A, Bierne N, Boudry P, Heurtebise S, Cornette F, Lapègue S (2013). Population genomics shed light on the demographic and adaptive histories of European invasion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. In press in *Evolutionary Applications*,

Rozen, S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, **132**, 365-86.

Rosenberg NA, Li LM, Ward L, et al. (2003) Informativeness of genetic markers for inference of ancestry. *American Journal of Human Genetics*, **73**, 1402-1422.

Sanchez CC, Smith TPL, Wiedmann RT *et al.* (2009) Single nucleotide polymorphism discovery in rainbow trout by deep sequencing of a reduced representation library. *BMC Genomics*, **10**, 599.

Sauvage C, Bierne N, Lapègue S, Boudry P (2007) Single nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*, **406**, 13–22.

Sauvage C (2008) Development of molecular markers associated with resistance to summer mortality in oyster *Crassostrea gigas* - QTL approach. PhD Thesis, University of La Rochelle, France, 272 pp.

Sauvage C, Boudry P, de Koning D-J, Haley CS, Heurtebise S, Lapègue S (2010) Quantitative Trait Loci for resistance to summer mortality and OsHV1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics*, **41**, 390-399.

Seeb JE, Carvalho G, Hauser L, Naish K, Roberts S, Seeb LW (2011) Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms *Molecular Ecology Resources*, **11 (Suppl.1)**, 1-8.

Sobrino B, Brion M, Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, **154**, 181-194.

Stapley J, Reger J, Feulner PGD et al. (2010) Adaptation genomics: the next generation. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**, 705–712.

Taris N, Boudry P, Bonhomme F, Camara MD, Lapègue S (2009) Mitochondrial and nuclear DNA analysis of genetic heterogeneity among recruitment cohorts of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Biological Bulletin*, **217**, 233-241.

Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD (2005) the international Hapmap project web site. *Genome Research*, **15**, 1592-1593.

Wang S, Sha Z, Sonstegard TS, Liu H, Xu P, et al. (2008) Quality assessment parameters for EST-derived SNPs from catfish. *BMC Genomics*, **9**, 450.

Webster MT, Smith NGC, Ellegren H (2002) Microsatellite evolution inferred from human-chimpanzee genomic sequence alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 8748-8753.

Yan J, Yang X, Shah T et al. (2010) High-Throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize. *Molecular Breeding*, **25**, 441-451.

Zhang LS, Guo XM (2010). Development and validation of single nucleotide polymorphism markers in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin by mining ESTs and resequencing. *Aquaculture*, **302**, 124-129.

Zhang G, Fang X, Guo X et al. (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, **490**, 49-54.

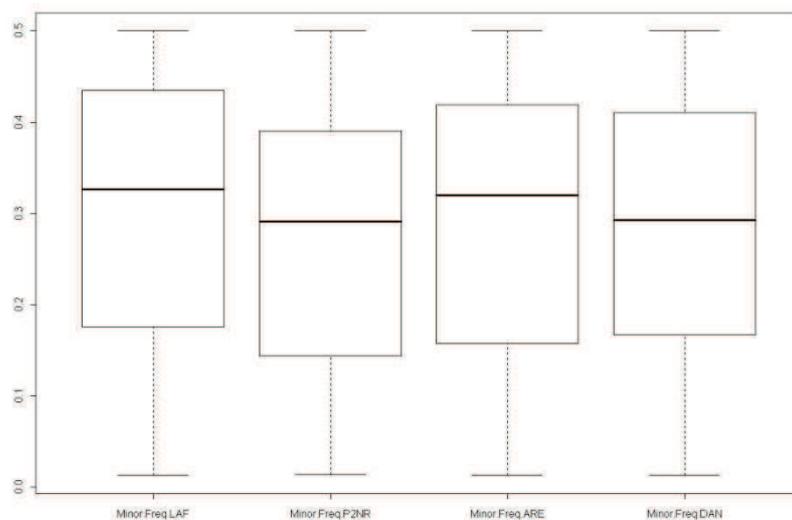
Zhu YL, Song QJ, Hyten DL, Van Tassell CP, Matukumalli LK, Grimm DR, Hyatt SM, Fickus EW, Young ND, and Cregan PB (2003) Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*, **163**, 1123-1134.

Author Contributions

SL conceived the protocols and wrote the first draft of the manuscript. EH, SH, EF, CD, PG, NG, CK participated to the choice of the *in silico* and *in vitro* SNPs. SL, SH, CD performed the SNPs genotyping, and SL, LG, LB, RM, PH participated to the characterization of the power of the panels assignment through simulations. All authors participated to the writing of the manuscript.

Supplementary material

Fig. S1 Box plot representation of Minor Allele Frequency (MAF) for a subset of four *C. gigas* populations for a subset 203 SNPs that were polymorphic in this subset.



3. Nouvelle technique de suivi de la gamétogenèse : l'Imagerie par Résonance Magnétique

3.1. Contexte

On considère que l'effort reproducteur peut être approché par la taille de la gonade. La taille de la gonade de l'huître creuse est estimée via une coupe histologique. Bien qu'efficace, cette méthode s'avère destructive : la coupe dans la masse viscérale entraîne nécessairement la mort de l'animal. L'histologie ne permet donc pas le suivi d'un même individu pendant la totalité de la période de gamétogenèse. Or, dans le cadre de ma thèse, il apparaissait indispensable d'en apprendre davantage sur le comportement physiologique des individus au cours d'une saison de reproduction incluant un épisode de mortalité estivale.

Des études précédentes (Pouvreau et al., 2006 ; Hatt et al., 2009) ont mis en évidence que l'IRM permet d'observer l'anatomie de l'huître à travers sa coquille et, par conséquent, sans incidence apparente sur la survie de l'animal. De plus, la richesse en lipides de la gonade de l'huître en fait un organe facilement observable par IRM et l'observation des animaux au cours de plusieurs séances IRM offre la possibilité de suivre son évolution au cours d'une saison de gamétogenèse.

Si le maintien en vie des individus était un argument de poids dans le choix de cette nouvelle technique, il fallait également s'assurer que les conclusions tirées de l'observation des images étaient comparables aux observations classiques. Nous avons donc sacrifié un échantillon d'individus pour procéder à des coupes histologiques à l'issue de différentes séances d'IRM.

3.2. L'Imagerie par Résonance Magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique est une technique d'imagerie couramment utilisée par le corps médical. Non-invasive, elle permet d'observer l'intérieur du corps du patient sans avoir besoin de l'irradier. En effet, elle repose sur les propriétés quantiques des noyaux atomiques : un aimant très puissant diffuse un champ magnétique qui permet l'alignement des moments magnétiques de spin propres à chaque particule. Puis, des

champs magnétiques oscillants moins intenses modifient cet alignement pour produire un signal électromagnétique. C'est ce signal qui sert à localiser les différents tissus via l'IRM. Les huîtres ont été imagées par un appareil d'IRM médical, le Siemens Avanto 1,5T (Figure 22), au sein de l'unité PRISM de l'IRSTEA de Rennes. Afin que le champ magnétique soit le plus homogène possible, les huîtres ont été placées à l'intérieur d'une antenne tête (Figure 23), prévue pour explorer l'encéphale humain. Pour pouvoir imager 15 huîtres simultanément, un système de plateaux en plexiglass superposés a été conçu (Figure 24).



Figure 22. Siemens Avanto 1,5T.



Figure 23. Antenne tête utilisée pour homogénéiser le champ magnétique autour des huîtres.



Figure 24. Système de plateaux conçu pour l'imagerie des huîtres.

3.3. Validation de la technique d'Imagerie par Résonance Magnétique

3.3.1. Principaux résultats détaillés dans l'article 2

La comparaison des images obtenues par IRM et par histologie a été réalisée à deux niveaux :

- d'un point de vue qualitatif, nous avons pu définir une échelle de stades de maturité inspirée de l'échelle de Steele et Mulcahy (1999) mais fondée sur les critères observables sur les images IRM. Nous avons également pu définir des critères objectifs pour identifier le sexe des individus matures. En effet, les gonades femelles apparaissent à un niveau de gris plus élevé (donc plus clair) que les gonades mâles (Figure 25).

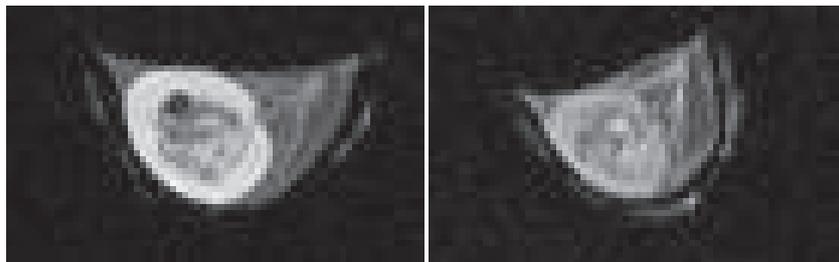


Figure 25. Images obtenues par IRM de deux huîtres creuses matures, une femelle (à gauche) et un mâle (à droite).

- d'un point de vue quantitatif, une corrélation fortement significative a été mise en évidence entre la surface gonadique mesurée sur les images IRM et la surface gonadique mesurée sur les images des coupes histologiques. Une corrélation fortement significative a également été identifiée entre cette dernière et le volume de la gonade estimé grâce à l'ensemble des images IRM

(Figure 26). Cependant, des éléments somatiques de niveaux de gris équivalents à ceux de la gonade ayant pu être intégrés à l'estimation de ce volume, une incertitude de l'ordre de 29% demeure sur la valeur du volume gonadique.

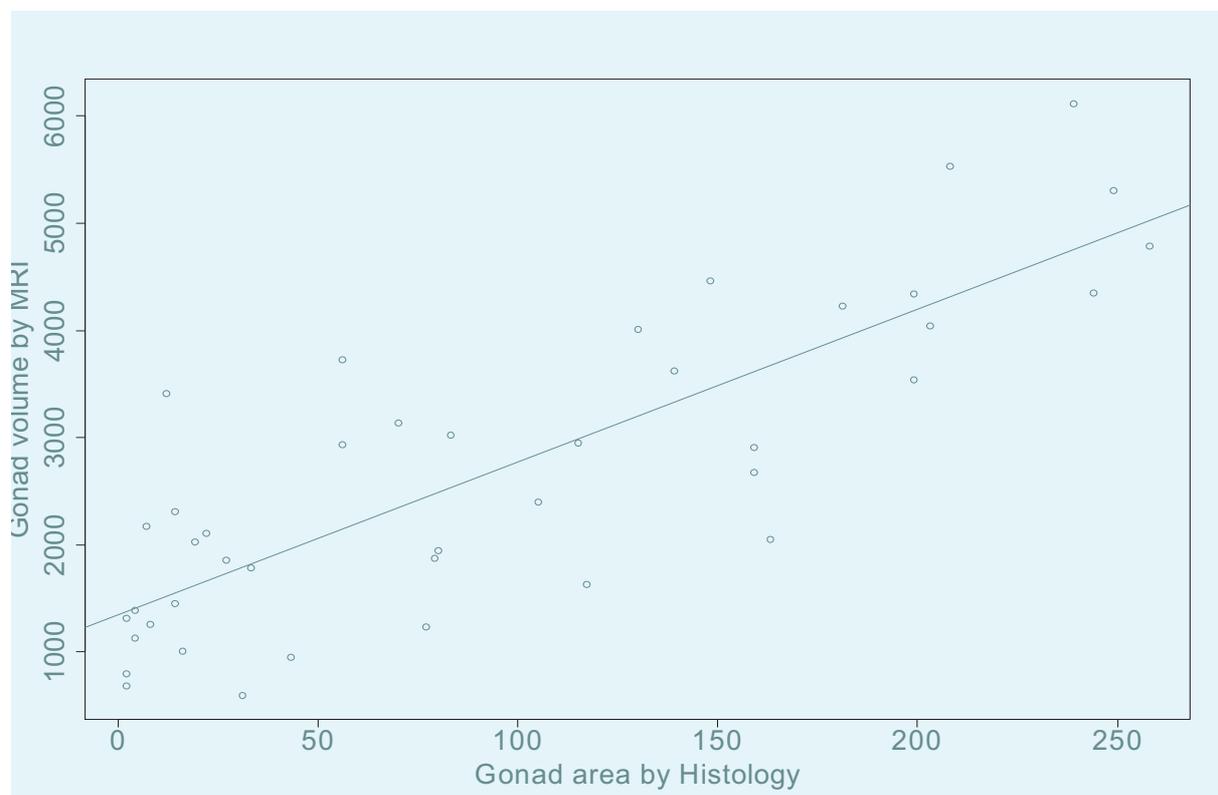


Figure 26. *Corrélation entre la surface gonadique estimée sur les coupes histologiques et le volume gonadique estimé à partir des images IRM.*

3.3.2. Correction des incertitudes

L'article 2 fait état d'une incertitude de 29% pour l'estimation du volume de la gonade. Celle-ci avait été estimée à partir des écarts à la droite de régression entre le volume de la gonade estimé par IRM et la surface de la gonade estimée par histologie (Figure 26). Afin d'amoinrir cette incertitude, les images à l'origine des points extrêmes ont été réexaminées. Les écarts importants étaient dus à des anomalies de l'image. La correction de ces anomalies a permis de réduire l'incertitude. Cependant, les différences induites par la position des huîtres sur les plateaux n'ont pas pu être compensées par le calcul d'un terme correctif. En effet, le scanner utilisé est réglé automatiquement et l'expérimentateur n'a pas réussi à intégrer un terme correctif dans les paramètres.

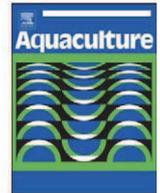
3.3.3. Article 2 : « Gonad volume assessment in the oyster Crassostrea gigas: Comparison between a histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method »

« Evaluation du volume de la gonade de l'huître *Crassostrea gigas* : Comparaison entre une méthode histologique et une méthode d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) »

Emilie FLAHAUW, Stéphane QUELLEC, Armel DAVENEL, Lionel DEGREMONT, Sylvie LAPEGUE, Philippe-Jacques HATT– Publié dans *Aquaculture* en 2012

Cette étude étant un travail d'équipe, il est important de préciser les tâches que j'ai effectuées, seule ou accompagnée par les coauteurs :

- *La production, l'élevage, le conditionnement et le marquage des huîtres,*
- *L'histologie, de la fixation à l'analyse des coupes,*
- *L'analyse des images IRM.*



Gonad volume assessment in the oyster *Crassostrea gigas*: Comparison between a histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method

Emilie Flahauw^a, Stéphane Quéllec^{b,c}, Armel Davenel^{b,c}, Lionel Degremont^a,
Sylvie Lapegue^a, Philippe-Jacques Hatt^{a,*}

^a Ifremer, AGSAE LGP, Mus du Loup, 17390 La Tremblade, France

^b Irstea, IRM Food, 17 Avenue de Cucillé, CS 64427, 35044 Rennes Cedex, France

^c Université Européenne de Bretagne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2012

Received in revised form 4 October 2012

Accepted 5 October 2012

Available online 12 October 2012

Keywords:

Oyster

Crassostrea gigas

Reproduction

Histology

Magnetic resonance imaging

MRI

ABSTRACT

Previous studies comparing *Crassostrea gigas* selected lines with different susceptibility to summer mortality concluded that the higher the reproductive effort the lower the survival. But they were lacking individual follow up of this reproductive effort which would be of great interest to help us to understand the physiology of the oysters facing summer mortalities. The most frequently used method for assessing the volume of the gonad is to measure the area it occupies on histological sections. Gonad measurement by magnetic resonance imaging, in contrast, is non-destructive and therefore makes it possible to assess individual evolution as well as to compare individuals. The present study compared the values of gonad volume by this method with the values of gonad surface obtained by the histological method. The two methods were used successively to assess the volume of the gonads of the same individual oysters at different maturation stages. There is a very highly significant linear relation between the results of these two methods. The estimated uncertainty about the volume value is 29%. Causes of this uncertainty are considered and discussed.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oysters are a major aquaculture species produced along the coasts of France. In 2010, the total French production consisted of 82 800 t Pacific oyster *Crassostrea gigas* and 1300 t European flat oyster *Ostrea edulis* (FranceAgriMer, 2011). However, since 2008, significant mortality has affected *C. gigas* spat in all French oyster production areas. Over the years, these high mortality rates have led to seed-supply problems in most shellfish farming areas. Moreover, both types of spat – hatchery and capture – are affected by the phenomenon. As resistance to summer mortality is a highly heritable character (Dégrement et al., 2010), genetic selection is underway to improve the survival of farmed oysters. A national programme has been established that will select improved strains and distribute them to oyster farms. The diagnosis of the causes of these mortalities is based on the analysis of environmental factors, farming practices, occurrences of new pathogens, and oyster physiology (Huvet et al., 2010; Samain et al., 2007; Segarra et al., 2010).

The common practice for studying oyster biology in oyster beds is to sacrifice sampled oysters and make direct observation of their whole soft tissues and microscopic observation of histological sections.

Consequently, oysters cannot be followed individually over time, which prevents the measurement of some physiological parameters and, more importantly, prevents the monitoring of individual phenotypes over the maturation period. A new technique has recently been tested that offers a non-destructive alternative to these methods. The first analyses of *C. gigas* by magnetic resonance imaging (MRI) (Davenel et al., 2006; Pouvreau et al., 2006a) concluded that the MRI technique is able to quantify the volume and mass of the whole flesh and of some organs in a non-destructive way, thereby allowing the observer to follow the growth of individual oysters over time. Considering the large investment oysters make in reproduction (Bourles et al., 2009; Deslous-Paoli and Héral, 1988; Pouvreau et al., 2006b) and the observation of selected oyster lines with different gonad average sizes and different susceptibilities to summer mortality (Huvet et al., 2010; Samain et al., 2007), the gonad was considered a priority organ for study. Further research using the MRI method highlighted a positive relationship between the effort devoted to reproduction and subsequent growth of the tissues and showed that growth variability within a group of oysters was overestimated by the more commonly used histological method (Hatt et al., 2009).

The most commonly used method for assessing the volume of the gonad is to measure the area it occupies on histological sections (Fabioux et al., 2005). The present study compared gonad measurement by MRI with gonad measurement by the histological method, applying the two methods successively to assess the volume of the gonads of the same individual oysters.

Abbreviations: ANOVA, Analysis of variance; MRI, Magnetic resonance imaging; ROI, Region of interest.

* Corresponding author. Tel.: +33 5 4676 2649; fax: +33 5 4676 2611.

E-mail address: pjhatt@ifremer.fr (P.-J. Hatt).

2. Materials and methods

2.1. Oysters

The 300 oysters used in this study were all members of a single biparental full-sib family, from a second laboratory generation (F2 family). Reproduction and larval rearing took place at the Ifremer hatchery in La Tremblade (Charente-Maritime, France) in February 2010. Post-larval rearing was also done at this hatchery. Afterwards, the oysters were grown on at the Ifremer nursery in Bouin (Vendée, France) from April to October 2010. They were then transferred to the Agnas area of the Marennes-Oléron oyster *parcs* (France) where they were reared at 50 cm from the ground in oyster bags, with approximately 150 oysters per bag.

2.2. Magnetic resonance imaging

These oysters were imaged on the PRISM facilities at Irstea (Rennes, Brittany, France) on 4 April, 5 May, and 7 June 2011. They were transported out of water between La Tremblade and Rennes (time of transport between 4 and 14 h) in coolers to limit temperature stress, covered with cotton clothes soaked in seawater. In clear seawater many oysters kept closed and could not expel air bubbles. Therefore, prior to MRI scanning, they were placed in vats containing phytoplankton-enriched seawater from the La Tremblade hatchery. After one hour, most of the oysters had opened their valves and had filtered water from the tray, thus expelling most of the air bubbles that had become trapped between their valves during transport. The few bubbles that remained in the oysters were clearly visible on the MR images and their volume was measured and corrected for when making oyster volume measurements. The epibionts were brushed from the shells and then the shells were dried with tissues to limit parasitic signals, without any other modification.

MRI measurements of oysters were performed with a Siemens Avanto imager operating at 1.5 T (63.86 MHz), equipped with a “head” probe, which allowed the simultaneous examination of 15 oysters placed on five levels. A T1-weighted 3D gradient echo sequence provided 52 contiguous images, highlighting animal tissues, particularly gonadic tissues.

The main parameters of the MRI protocol were:

- Dimensions of the observed field = $161.9 \times 185 \text{ mm}^2$ (matrix: 280×320)
- Dimensions of the pixel on transverse cuts = $0.58 \times 0.58 \text{ mm}^2$
- Distance between two successive transverse cuts = 1.5 mm, making the dimensions of the voxel $0.58 \times 0.58 \times 1.5 \text{ mm}^3$
- Repetition time = 11 ms; echo time = 3.01 ms; flip angle = 20°
- Number of transverse cuts across the volume = 52
- Filters = correction distortion + standard pre-acquisition + elliptical filter
- Time of acquisition for 52 sections = 12 min 56 s (number of excitations = 6)

An algorithm based on a 3D Object Counter plug-in using the ImageJ software (developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD and available by ftp at zippy.nimh.nih.gov/ or <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) was used to extract an image stack of each oyster and calculate its grey-level stack histogram.

2.3. Histology

Forty two oysters were sampled the day after MR imaging, 10 on April, 10 on May and 22 on June. They were selected on view of MRI so the sample comprised males and females of various gonad size and development; no fully immature adults were observed. For each sample, histological sections were prepared as described in Fabioux et al. (2005). Briefly, 3-mm cross sections of the visceral mass were excised

in front of the pericardial cavity and immediately fixed in Davidson's solution (Shaw and Battle, 1957) for 48 h. After dehydration and paraffin wax embedding, 5- μm sections were cut, mounted on glass sections, and stained with Harris' hematoxylin-Eosin Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967).

2.4. Qualitative analysis of histological sections

All the 42 sampled oysters were analysed. Sex and gamete maturation stages were determined under a light microscope according to the reproductive scale of Steele and Mulcahy (1999). Only the three stages detailed by Huvet et al. (2010) were observed. Briefly, stage 1 was assigned when there were no mature gametes, stage 2 was assigned when there were maturing gametes, and stage 3 was assigned when the gonad was full of mature gametes.

2.5. Analysis of images of histological sections

Histological sections were also scanned with a digital scanner (Hewlett Packard Scanjet 7400c), and images were saved in TIFF format. Tissue areas were measured using IMAQ Vision Builder image analysis software (National Instruments Corp, Austin, Texas, USA). Firstly, each image was transformed to greyscale. Then, a first region of interest (ROI) was drawn using a graphics tablet (Wacom Bamboo Pen and Touch, Wacom, Tokyo, Japan) to remove areas corresponding to gills and other peripheral tissues. The surface of this ROI was considered as the whole flesh section area. Finally, a second ROI was plotted to remove digestive gland cells. Gonadic cells were detected by adjusting the grey-level threshold specific for this tissue, and the gonadic area was automatically calculated in pixels (Heffernan and Walker, 1989).

2.6. Analysis of MRI images

For each of the 42 oysters, an image was chosen from the MRI scan that was as close as possible to the histological section made in front of the pericardial cavity, clearly visible on the images as a dark mass. This selected image was analysed using ImageJ software. Using the “Threshold” macro and the image of the histological section as a reference all pixels that appeared as part of the oyster flesh were selected. The threshold value was an average of 96 for all oysters. The number of pixels thus selected was then multiplied by the surface

Table 1

Parameters of linear regressions between measurements made on the histological sections (explanatory variable) and on the MRI (explained variable) (***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; n.s.: not significant). These relations are based upon a sample of 42 oysters of different sex (2 undetermined, 26 males and 14 females) and different maturation stages (1 immature, 5 at stage 1, 8 at stage 2 and 28 at stage 3).

Parameters	Value	Standard error	Student's <i>t</i>	<i>p</i> (> <i>t</i>)
<i>Whole-body surface (mm²)</i>				
Y-intercept	93	12	7.4	$5e^{-09***}$
Regression coefficient	0.57	0.05	10.7	$2e^{-13***}$
F Fisher	115***			
<i>Gonad surface (mm²)</i>				
Y-intercept	11	6	1.9	0.06 n.s.
Regression coefficient	0.65	0.04	14.7	$<2e^{-16***}$
F Fisher	216***			
<i>Gonad surface on histological sections (mm²) and gonad volume on MRI (mm³)</i>				
Y-intercept	1345	194	6.9	$2e^{-08***}$
Regression coefficient	14.3	1.6	9.2	$2e^{-11***}$
F Fisher	84***			

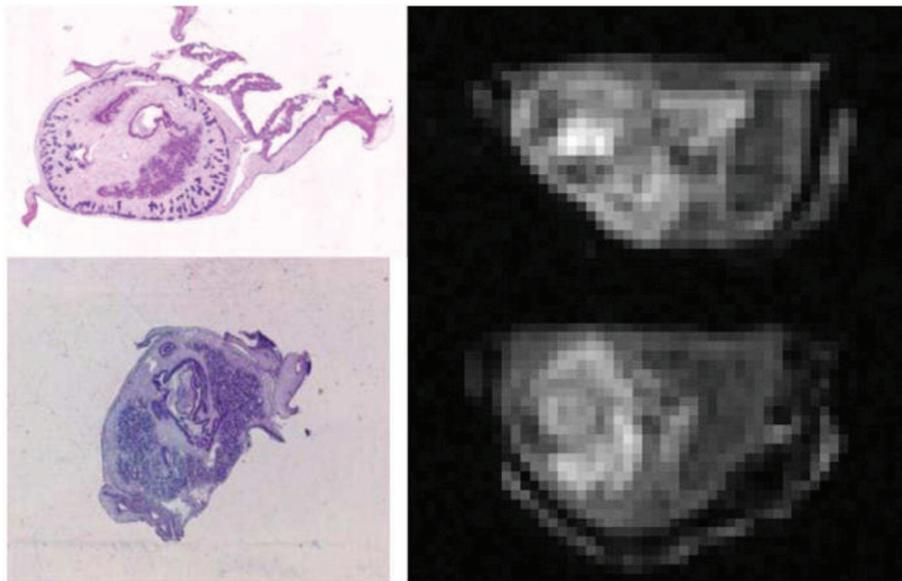


Fig. 1. Histological sections (left) and closest original MR image (right) of an oyster at maturation stage 1 (upper) and an immature oyster (lower).

of the pixel ($0.58 \times 0.58 \text{ mm}^2$). This value was taken as the surface of the oyster flesh on the image.

In the “Threshold” macro, the lower and upper threshold values were adjusted to select pixels that could be considered as part of the gonad by reference to the histological section. However, these pixels were selected according to their grey-level, and some were clearly a part of other organs, mainly gills, gut, and digestive gland. A polygon was drawn around the gonad, once again by making reference to the histological section. The pixels within this polygon were considered as belonging to the gonad, and their number was multiplied by the unit surface of the pixel. Preliminary trials, done using the same method in previous years (Davenel et al., 2006; Hatt et al., 2009), concluded that the grey-level for mature gonads on MRI was between 166 and 510. On the grey-level histograms established on whole oyster body soft

tissues with the methods described in subsection 2.2, all the voxels above 165 were counted as a part of the mature gonads. The volume of the gonad was then computed by multiplying the number of the selected voxels by the voxel unit volume ($0.58 \times 0.58 \times 1.5 \text{ mm}^3$).

2.7. Data analysis

To determine relationships between the measurements made on the MR images and those made on histological sections, linear regressions were tested using the “linear model” function of the R software package (available at <http://www.r-project.org/>). The surface values measured on histological sections were used as explanatory variables, and the values from measurements on the MR images as variables to explain.

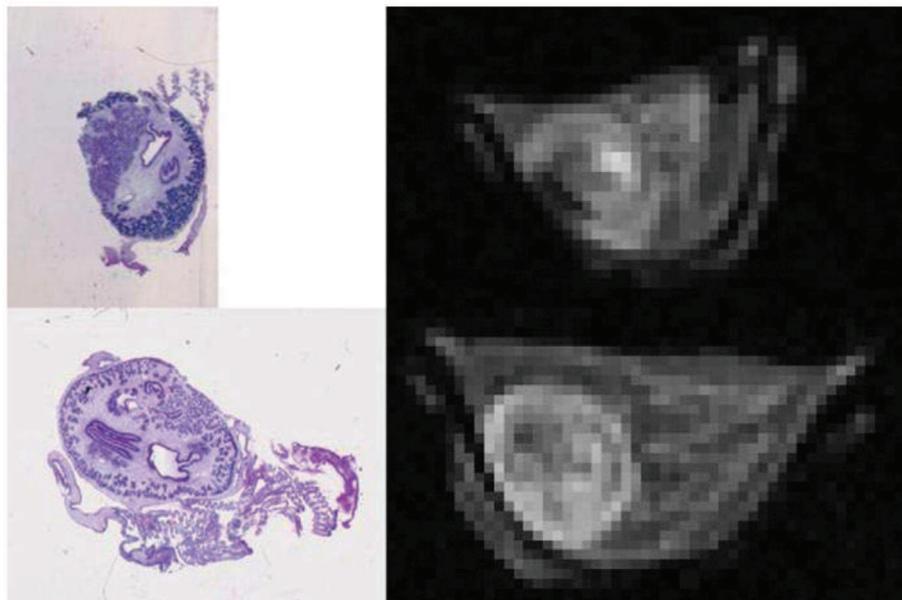


Fig. 2. Histological sections (left) and closest original MR image (right) of oysters at maturation stage 2, male (upper) and female (lower).

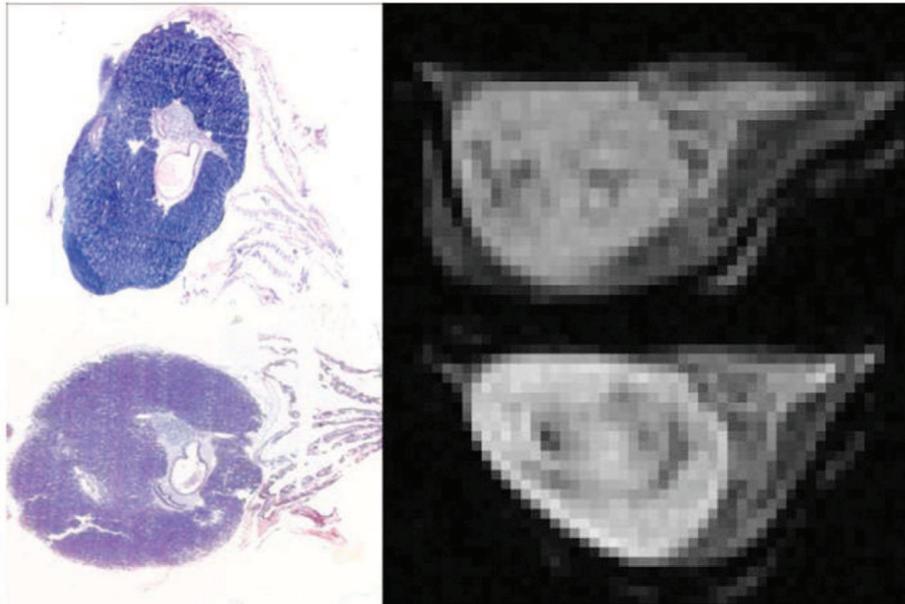


Fig. 3. Histological sections (left) and closest original MR image (right) of oysters at maturation stage 3 (upper), male (upper) and female (lower).

The residual values from the linear relation were analysed with a two-way analysis of variance (ANOVA) using the function “ANOVAs” of the R software package (R Development Core Team, 2011) software. This allowed us to assess the contribution of the residual values of some factors such as the sex of the gametes and the maturation stage of the gonad to the variance.

3. Results

The results of the data analysis are given in Table 1; all relationships were established from measurements made on 42 oysters. The gross weights were 9 to 27 g and the total wet flesh volumes measured on MRI from 2.2 to 9.1 cm³.

Histological sections analysis led to the conclusion that, among the forty two oysters, 26 were males, 14 females and 2 undetermined. A fully mature gonad was observed on 28 oysters (16 males and 12 females), a mid-mature on 8 (6 males and 2 males), an incepting on 5 (4 males and one undetermined), and one showed no gonad.

Figs. 1–3 show selected examples of histological sections and the MR images of oysters for each maturation stage, one without any visible gonad, one stage 1 (undetermined), one male and one female for stage 2 and for stage 3.

The grey-level of the female gonad is higher than that of the male gonad for both maturation stages. On the histological sections, vesicular cells are clearly distinct inside the gamete crown. In the same location on the MRI, the pixels have a grey-level that is higher than that of gamete

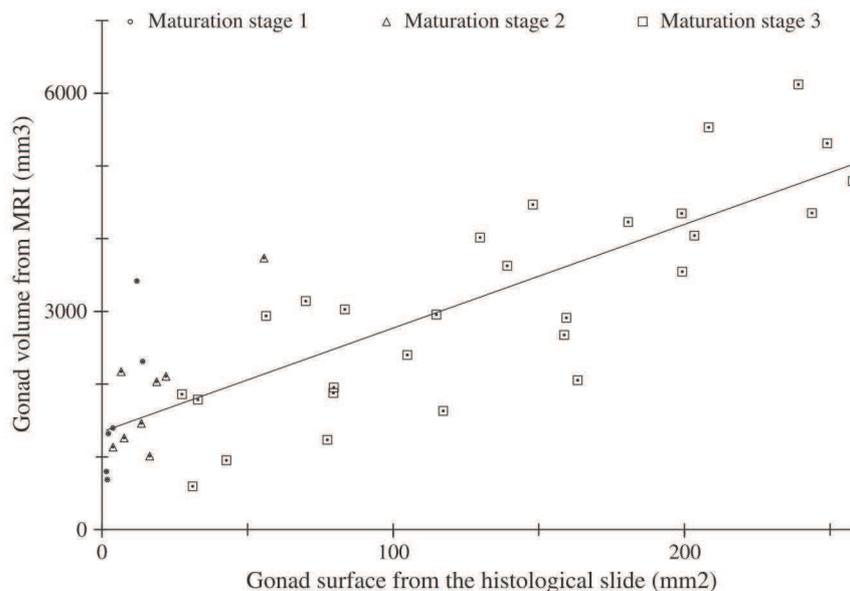


Fig. 4. Relation between the gonad surfaces measured on the histological section and the gonad volume measured on the whole MRI. The different symbols indicate the different gonad maturation stages observed on the histological sections.

pixels. The grey-level of the digestive tract is frequently amongst the highest levels on the MRI. This might be due to the phytoplankton that the oysters ingested when they were stored in phytoplankton-rich seawater before being passed through the scanner.

The whole body is clearly visible on the MR images. As a validation test for the whole body, we first tested the relation between the assessed surface on the histological section and that on the closest MR image. Because this relation was very highly significant, we then tested the relation between the gonad surfaces measured on the histological section and those on the closest MR image. Finally, because this relation was also very highly significant, the relation between the gonad surface measured on the histological section and the gonad volume measured on the whole MRI was then assessed.

The value of the Y-intercept of the last relation is significantly higher than zero. The linear relation between the gonad surface from the histological section and the gonad volume from the MRI is shown in Fig. 4, with a point for each oyster. From this relation, we estimated that there was an uncertainty of 29% for the volume value measured by MRI ($p < 0.05$) on the scope of sampled sizes.

The gonad volume from the whole MRI corresponded to the number of voxels in which the grey-level was above 165. This included other organs, such as the vesicular cells and the digestive tract, observed on the MR image.

The volume of these organs varied among the maturation stages, and the grey-level of the gonad on the MR image was lower for males than it was for females. From these observations, the influence of maturation stage and sex was tested on the above linear relation. Two-way ANOVA on the residual values from this linear relation showed no difference between males and females or among maturation stages.

4. Discussion and conclusions

The surface values obtained from transverse sections examine by the two methods were very highly correlated for both the whole body and the gonad alone. The volume of the gonad measured by MRI was very highly correlated with the surface of the gonad measured on the histological sections but for small oysters in the first stage of gamete maturation, gonad volume measurements by MRI were proportionately higher than for large fully mature oysters; however this is based upon a small sample and needs a larger one for confirmation.

When the gonad was large, and therefore had a greater number of voxels, the contrasts between organs were better and the effects of small volumes added by the partial inclusion of other organs became significantly less important. In addition, the size of a pixel ($0.58 \times 0.58 \text{ mm}^2$) on the MR image was much larger than the size of a pixel on the image of the histological section ($0.042 \times 0.042 \text{ mm}^2$). On the MRI, a pixel could consist of mature gametes and somatic cells; as such, its grey-level was higher than the surrounding pixels consisting of only somatic cells, and the pixel was therefore recorded as “mature gonad”. However, this approach gave an overestimation of the volume of gametes. On the histological section, it was possible to distinguish mature gametes from other cells. On the MRI, the accuracy of the image did not always make it possible to distinguish the mature gonad from other organs, such as vesicular cells or digestive tract, which frequently had a similar grey-level and were adjacent to the mature gonad.

As indicated above, the gonad volume assessed from the MRI was the number of voxels with a grey-level above 165. But the observation on successive transverse cuts led us to conclude that these measurements had included tissues other than the gonad because they had a similar grey-level (e.g., vesicular cells, sometimes gills or digestive tract). In the linear relationship between the gonad volume from the MRI and the gonad surface from the histological section, the Y-intercept was very high, and the average gonad volume was 20 times that of the average gonad surface. It can therefore be hypothesised that the high values observed were related to additional volume from the inclusion of these somatic organs.

Measurement of the surface of the gonad on histological sections is a reference method for assessing reproductive effort and its evolution over time within a population of oysters. The linear relationship established between the value obtained by this method and the value obtained by MRI demonstrates that this last method is appropriate for computing a volume that is proportionate to the actual gonad volume. It is non-destructive (MRI was conducted with shell intact) and therefore makes it possible to assess individual evolution and to compare individuals.

A first estimation of the uncertainty for this volume value was 29% on the scope of sampled sizes. Further measurements will be used to validate this first estimation and to test a possible difference according to maturation stage and/or sex. However, this method could already be very useful for finer analysis of some phenotypic characteristics of oysters within a maturation and spawning period, namely, the effort devoted to reproduction, and the precocity and duration of gonad maturation. This individual examination will also allow the study of gonad development to be put in its genetic context through attempts to link some of these traits to parts of the oyster genome using a quantitative trait loci approach.

Acknowledgements

This work was funded by a grant from the Agence Nationale de la Recherche “Génomique animale” Programme for the GAMETOGENES project (ANR-08-GENM-041). The authors are grateful to all members of staff of the Ifremer hatchery in La Tremblade and of the nursery in Bouin for producing and rearing the oysters and would particularly like to thank Virgile Quillien for his contribution to making and analysing the histological sections.

References

- Bourles, Y., Alunno-Bruscia, M., Pouvreau, S., Tollu, G., Leguay, D., Arnaud, C., Goulletquer, P., Kooijman, S., 2009. Modelling growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: advances in the oyster-DEB model through application to a coastal pond. *Journal of Sea Research* 62 (2–3), 62–71.
- Davenel, A., Quéllec, S., Pouvreau, S., 2006. Noninvasive characterization of gonad maturation and determination of the sex of Pacific oysters by MRI. *Magnetic Resonance Imaging* 24 (8), 1103–1110.
- Dégremont, L., Bedier, E., Boudry, P., 2010. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 299 (1–4), 21–29.
- Deslous-Paoli, J.M., Héral, M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquatic Living Resources* 1, 239–249.
- R Development Core Team, 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 3-900051-07-0. (<http://www.R-project.org/>).
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250 (1–2), 458–470.
- FranceAgriMer, 2011. Les filières pêche et aquaculture en France. Editions Les cahiers de FranceAgriMer. Montreuil-sous-Bois, France.
- Hatt, P.-J., Davenel, A., Eliat, P.-A., Quéllec, S., 2009. Magnetic resonance imaging as a means to assess the body growth and the gonad development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 22, 331–339.
- Heffernan, P.B., Walker, R.L., 1989. Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *Journal of Molluscan Studies* 55, 135–137.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: a trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304, 95–99.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Paris.
- Pouvreau, S., Rambeau, M., Cochard, J.C., Robert, R., 2006a. Investigation of marine bivalve morphology by *in vivo* MR imaging: first anatomical results of a promising technique. *Aquaculture* 259 (1–4), 415–423.
- Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., Alunno-Bruscia, M., 2006b. Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. *Journal of Sea Research* 56 (2), 156.
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., VanWormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Gêret, F., Boutet, I., Boudry, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer

- mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. *Aquaculture* 268, 227–243.
- Segarra, A., Pepin, J.-F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153, 92–99.
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* 35, 325–347.
- Steele, S., Mulcahy, M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70, 673–686.

PARTIE II : CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES FAMILLES AU COURS DE LA GAMETOGENESE

La gamétogenèse de l'huître est un processus biologique complexe (fortes variations individuelles, forte influence des facteurs environnementaux...) qui impacte les autres fonctions physiologiques de l'animal (Soletchnik et al., 1997; Ernande et al., 2003, Enriquez-Diaz, 2004, Enriquez-Diaz et al., 2009), notamment la survie. En effet, une corrélation a été mise en évidence entre la réponse à un épisode de mortalités estivales et l'effort reproducteur : les animaux produisant une gonade volumineuse seraient plus sensibles aux mortalités estivales (Samain et al., 2007; Huvet et al., 2010). Dans le contexte actuel des mortalités estivales qui touchent sévèrement les juvéniles d'huîtres creuses et menacent la production aquacole, il semble important de mieux comprendre les mécanismes de la gamétogenèse ainsi que les processus génétiques sous-jacents qui pourraient expliquer le lien apparent entre ces mortalités et l'effort reproducteur.

L'histologie est une méthode classique d'observation de la gamétogenèse. D'abord qualitative, elle a permis de déterminer le sexe et la maturité des individus par observation microscopique des coupes histologiques (Steele et Mulcahy, 1999). A partir des années 2000, l'histologie quantitative a été utilisée pour estimer l'effort reproducteur, fondée sur l'estimation du Rapport Gonado-Somatique (Enriquez-Diaz, 2004). Bien qu'informatrice, l'histologie ne peut pas être considérée comme représentative de l'effort reproducteur réel. En effet, étant destructive, elle ne permet d'obtenir qu'une estimation de l'effort reproducteur à un moment donné. Cet inconvénient est d'autant plus handicapant lorsqu'il s'agit de comparer l'effort reproducteur des individus : compte tenu des variations individuelles de dynamique de la maturation, l'observation à un instant t de l'ensemble des huîtres n'offre pas la possibilité de comparer tous les animaux à leur maximum de maturité. De ce fait, il semblait important d'utiliser une méthode non-destructive permettant le suivi individuel et temporel des huîtres. L'Imagerie par Résonance Magnétique, déjà fréquemment utilisée pour des invertébrés terrestres ou dulçaquicoles (Jasanoff et Sun, 2002 ; Wecker et al., 2002 ; cités par Pouvreau et al., 2006, mais rarement pour les invertébrés marins (Bock et al., 2001; Bock et al., 2002; Mark et al., 2002 ; Toussaint et al.,

2005; cités par Pouvreau et al., 2006) s'est alors présentée comme un outil prometteur pour l'étude des huîtres (Pouvreau et al., 2006). Non-invasive, l'IRM permet de suivre les mêmes individus et d'observer de nombreux traits impossibles à observer par histologie sans menacer la survie des animaux.

L'IRM était donc un outil adapté à ce travail de thèse : afin de comparer l'effort reproducteur des individus, il était important de pouvoir le caractériser de la façon la plus représentative possible de la réalité et la possibilité de mesurer d'autres caractères simultanément a également permis de rechercher des QTLs pour ces caractères. Toutefois, il était impossible de soumettre nos 3 familles à l'IRM ; c'est pourquoi 2 familles ont été observées par histologie.

1. L'histologie quantitative, une observation ponctuelle et destructive.

L'histologie quantitative avait été prévue pour 300 individus pour 2 familles F2. Pour la famille F2-19, 266 individus ont pu être exploités tandis que, pour la famille F2-21, seuls 135 individus ont pu être exploités : pour les autres, il s'est avéré impossible d'obtenir une coupe utilisable, probablement en raison d'un mauvais enrobage des tissus.

1.1. Méthode

1.1.1. Préparation des lames

Les individus, placés sur estran en octobre 2010, ont été ramenés à l'écloserie de la station de La Tremblade le 6 juin 2011. Nous avons alors procédé à leur ouverture puis à la biopsie des branchies en vue de l'extraction d'ADN pour le génotypage. Ensuite, les animaux ont été enfilés entiers sur du fil de pêche et séparés par un morceau de papier calque numéroté afin de les identifier. Les « colliers » ainsi préparés ont été immédiatement plongés dans du fixateur de Davidson modifié (voir composition en Annexe 7). Cette étape a permis une première fixation des gonades visiblement matures qui auraient pu se vider si la coupe avait été réalisée immédiatement.

Le lendemain, une coupe de quelques millimètres a été réalisée en amont de la région péricardique (Figure 27). Celle-ci a été immédiatement plongée dans du fixateur de

Davidson modifié pendant 48h afin de fixer la totalité des tissus puis conservée en éthanol à 70° jusqu'à l'inclusion en paraffine.

L'inclusion en paraffine a été réalisée à l'aide d'un automate à inclusion. Cette étape consiste en l'enveloppement des tissus dans un bloc de paraffine qui les rend suffisamment durs et homogènes pour pouvoir être coupés en vue de l'observation. La paraffine étant hydrophobe, il est nécessaire de débarrasser les tissus de toute l'eau qu'ils contiennent. Pour cela, ils sont déshydratés progressivement dans des bains d'éthanol de degré croissant (Annexe 7). Ensuite, les tissus sont clarifiés : des bains de xylène permettent de remplacer l'éthanol absolu dans les tissus. Cette étape est indispensable à l'imprégnation des tissus par la paraffine.

Ensuite, les coupes sont enrobées dans de la paraffine liquide pour former, en refroidissant, des blocs, plus faciles à couper au microtome. Le microtome permet de réaliser des coupes de 5 µm d'épaisseur. Celles-ci sont déposées sur de l'eau bidistillée chauffée à 45°C pour éliminer les éventuels plis. Pour finir, on récupère 2 coupes par individu sur une lame d'observation.

Après séchage, les coupes sont colorées à l'hématoxyline/éosine (Annexe 7). Cette méthode de coloration combinée utilise un colorant nucléaire basique, l'hématoxyline, qui colore les noyaux des cellules en bleu, puis un colorant cytoplasmique acide, l'éosine, qui colore les cytoplasmes en rose.

Enfin, on procède au montage des coupes entre lames et lamelles : de la résine est déposée sur la lame puis on recouvre par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air.

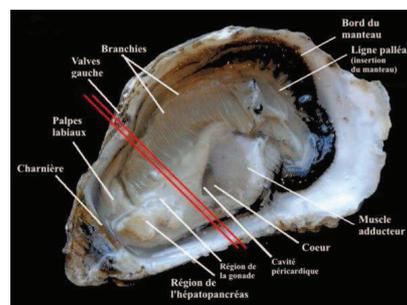


Figure 27. Emplacement de la coupe histologique

1.1.2. Analyse d'images

1.1.2.1. Analyse qualitative

Les lames sont observées en microscopie électronique afin de déterminer le sexe (mâle, femelle, hermaphrodite) et le stade de maturité des gonades (Tableau 6) d'après la classification établie par Normand et al. (2009) à partir de classifications précédentes (Mann, 1979 ; Lango-Reynoso et al., 2000).

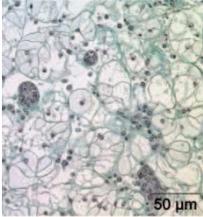
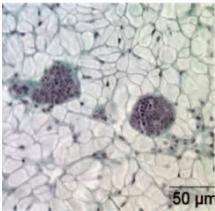
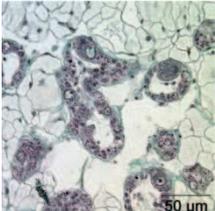
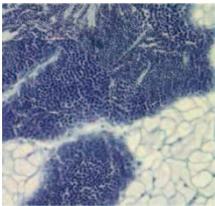
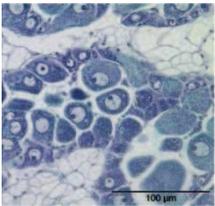
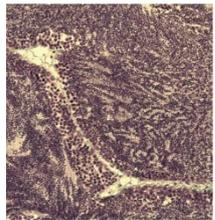
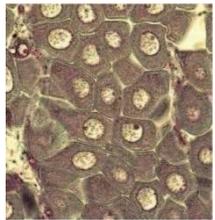
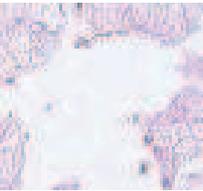
Stade de maturité	Processus de développement	Tubules gonadiques	Tissu conjonctif	Gonade mâle	Gonade femelle
Stade 0	Prolifération des cellules souches	Invisibles	Occupation de l'ensemble de « l'espace gonadique »		
Stade 1	Mitoses goniales	Développement	Prédominance		
Stade 2	Méioses, maturation des cellules germinales	Extension	Régression		
Stade 3	Maturité des cellules germinales	Confluence	Disparition		
Stade 4	Emission des gamètes	Désorganisation	Désorganisation		

Tableau 6. Caractéristiques des stades de maturité de la gonade de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

1.1.2.2. Analyse quantitative

D'un point de vue quantitatif, on cherche à déterminer la part de la gonade par rapport au reste du corps de l'animal : on estime l'indice gonadique ou Rapport Gonado-Somatique (RGS) qui équivaut au rapport de la surface occupée par les cellules gonadiques sur la surface totale de la coupe histologique. Pour cela, les lames d'observation ont été numérisées à l'aide d'un scanner Epson (Figure 28 a). Ensuite, via le logiciel Imaq Vision Builder®, l'image est convertie en niveau de gris (Figure 28 b) puis, on élimine les zones correspondant aux branchies et aux autres tissus périphériques en dessinant une région d'intérêt autour de la masse viscérale (Figure 28 c) afin de ne conserver que les tissus nécessaires au calcul du RGS (Figure 28 d). Dans un premier temps, on estime la surface totale de la masse viscérale en sélectionnant la totalité des pixels de la coupe (Figure 28 e). Puis, on dessine une seconde région d'intérêt afin d'éliminer les cellules digestives (Figure 28 f) et de ne conserver que les cellules gonadiques (Figure 28 g). On peut alors sélectionner uniquement les pixels correspondant au tissu gonadique (Figure 28 h) pour estimer la surface gonadique (Figure 28 i).

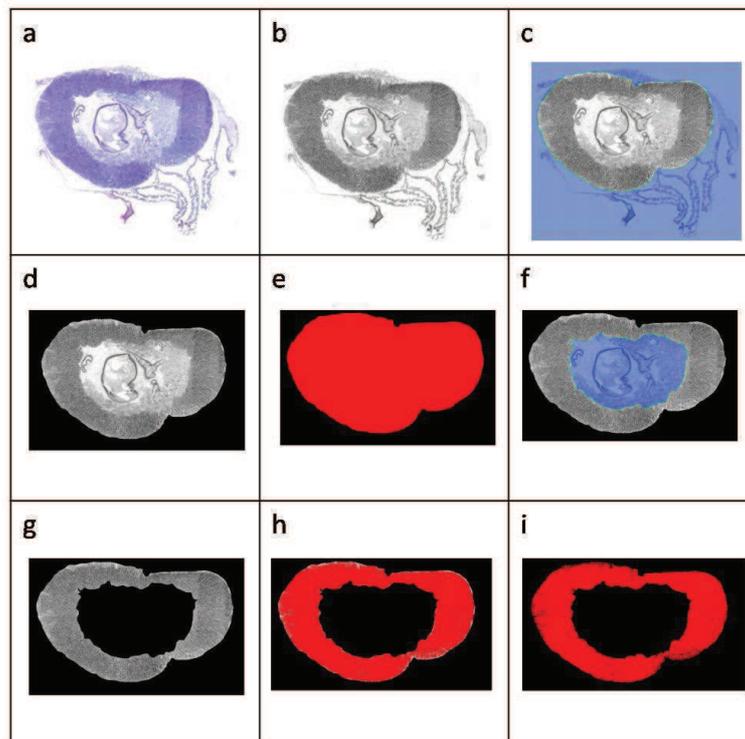


Figure 28. Etapes de traitement d'une coupe histologique numérisée afin d'estimer le rapport gonado-somatique.

1.2. Résultats

1.2.1. Analyse qualitative des lames d'histologie

L'observation microscopique des lames d'histologie a révélé que l'ensemble des individus étudiés présentaient une gonade au stade 3 de maturité, pour chacune des 2 familles. En revanche, au sein de chaque famille, la sex-ratio est différente (Figure 29). En effet, la famille 19 est en grande partie composée de mâles (74% contre 22% de femelles) tandis que la famille 21 possède une sex-ratio plus équilibrée (55% de mâles, 44% de femelles). Des hermaphrodites ont également été identifiés dans une moindre mesure (4% pour la famille 19 ; 1 % pour la famille 21).

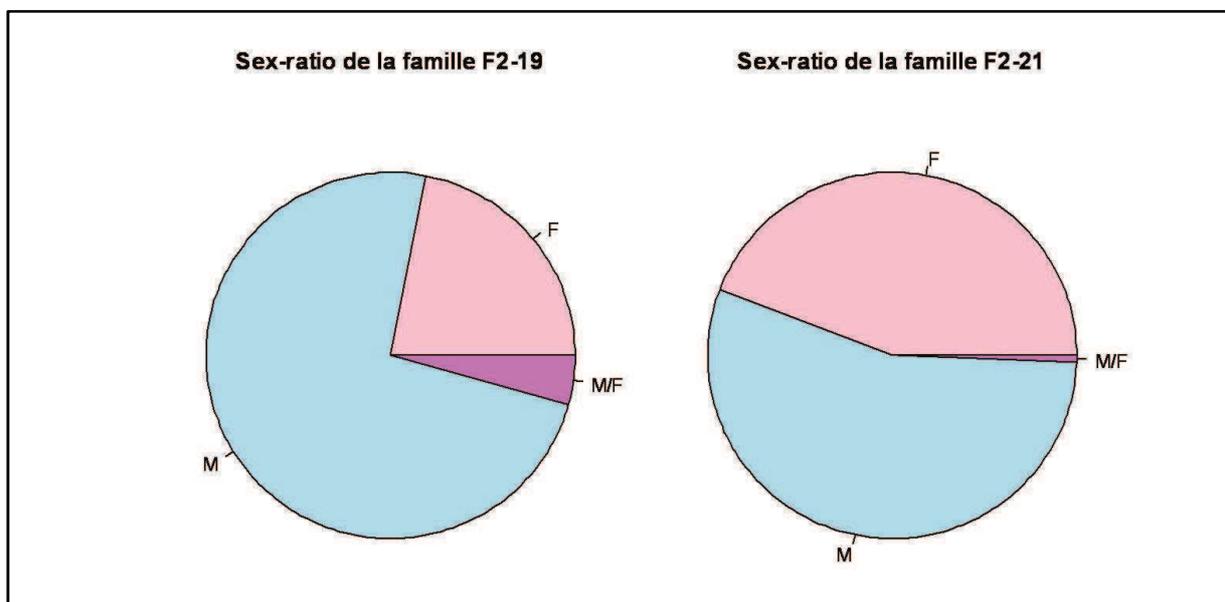


Figure 29. Sex-ratio des familles F2-19 et F2-21

1.2.2. Analyse quantitative des lames d'histologie

La famille F2-19 présente un rapport gonado-somatique plus élevé ($\mu=0,542\pm 0,156$) que la famille F2-21 ($\mu=0,477\pm 0,139$) (Figure 30). De plus, la distribution du rapport gonado-somatique diffère entre les deux familles (Figure 31). Le RGS varie significativement en fonction du sexe des individus ($F=4,45$; $p=0,01$). Par exemple, pour la famille 19, on remarque que le RGS est plus faible pour les hermaphrodites ($\mu=0,419\pm 0,122$) que pour les mâles ($\mu=0,555\pm 0,148$, différence significative : $t= -2,73$; $p=0,02$) ou les femelles ($\mu=0,521\pm 0,177$, différence non-significative) (Figure 32).

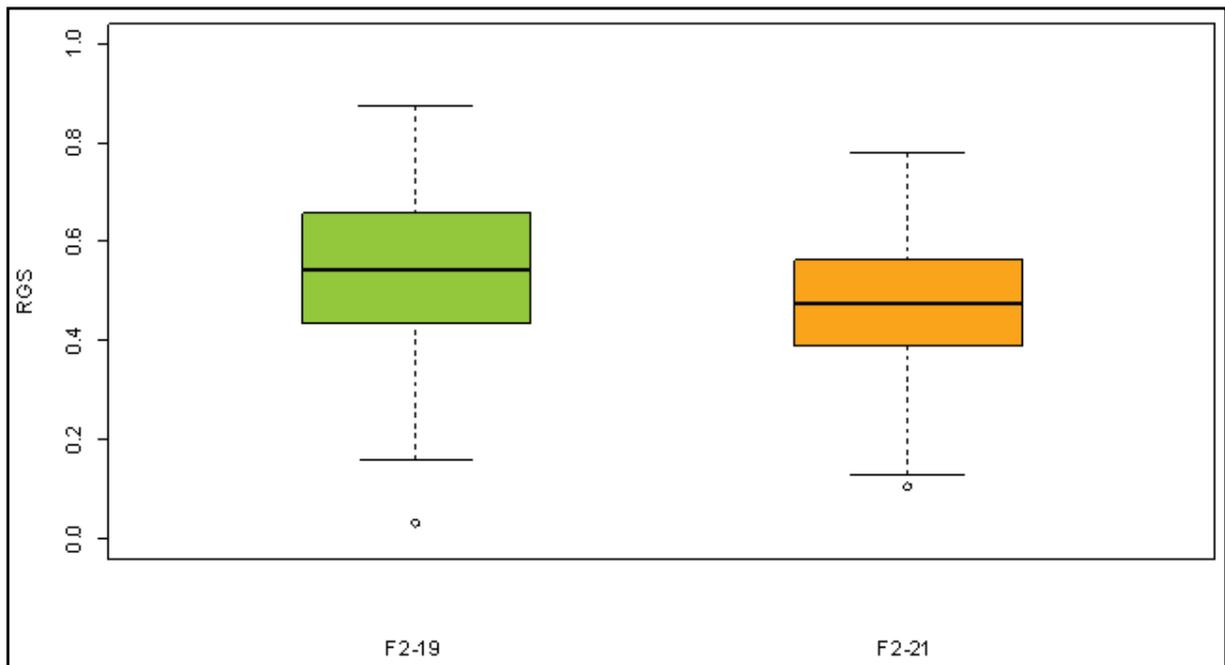


Figure 30. Graphes des moyennes du rapport gonado-somatique pour les familles F2-19 et F2-21.

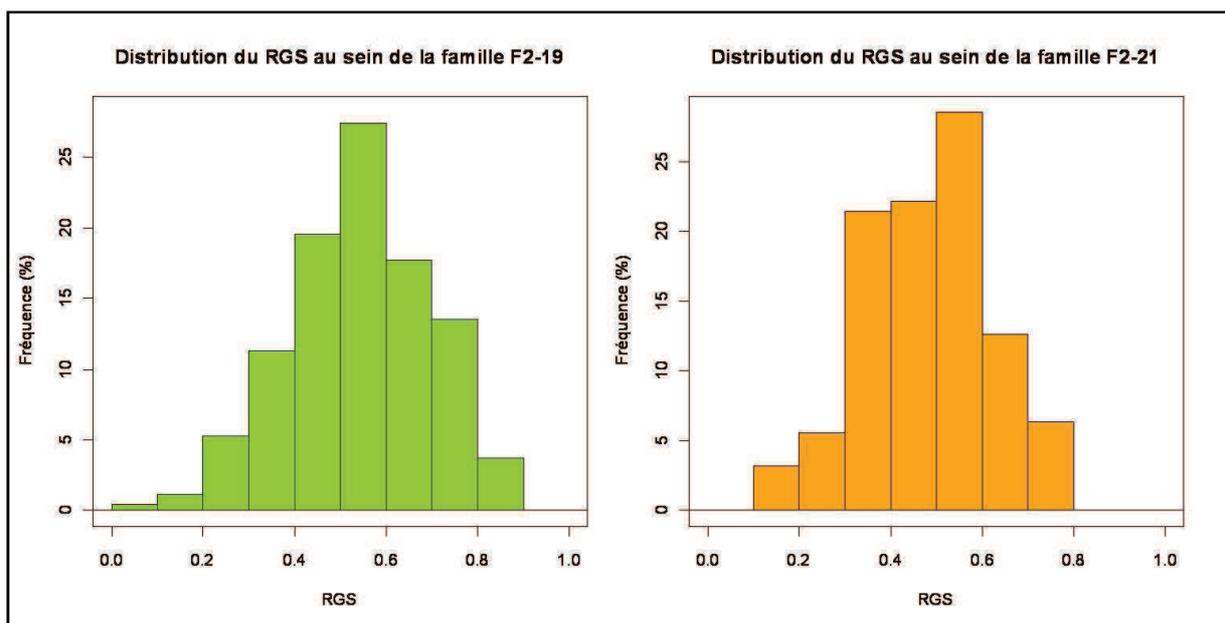


Figure 31. Distributions du rapport gonado-somatique au sein des familles F2-19 et F2-21.

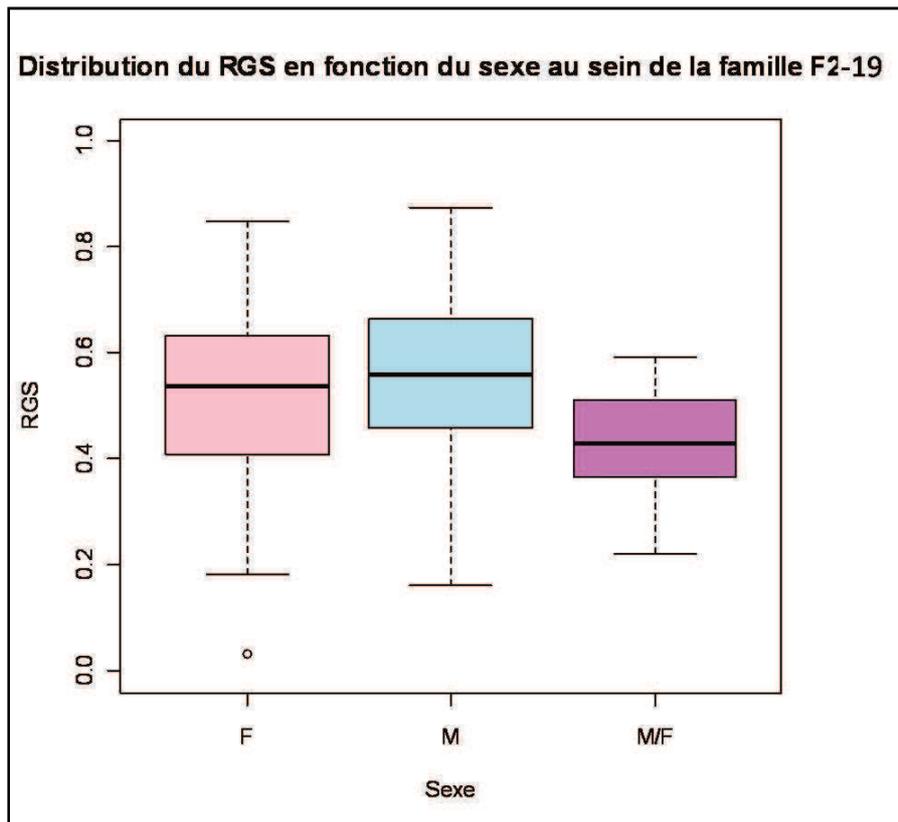


Figure 32. Distribution du rapport gonado-somatique en fonction du sexe au sein de la famille 19.

2. L’Imagerie par Résonance Magnétique, un suivi temporel non destructif.

2.1. Principaux résultats détaillés dans l’article 3

Au cours de cette étude, nous avons pu suivre le développement de la gonade d’un point de vue qualitatif (sexe, changement de sexe, stades de maturation, date de ponte) et d’un point de vue quantitatif (indice gonadique) de 300 individus de la famille F2-18. Afin de s’assurer que notre matériel biologique se comportait de la même façon que des huîtres sauvages, nous avons comparé nos données à celles obtenues par le RESeau d’observations COncylocoles (RESCO-Ifrémer). Nous avons ainsi pu constater un synchronisme de la période de ponte (Figure 35) et du pic de mortalité estivale (Figure 37).

Le sexe pouvant être déterminé sur les images IRM (Article 2), nous avons pu observer des spécificités liées au sexe des individus. En effet, la cinétique de la gamétogenèse varie en fonction du sexe : les mâles sont plus précoces et matures plus longtemps que les femelles. De plus, les femelles semblent plus touchées par les mortalités

estivales que les mâles. Cependant, nous n'avons constaté aucune différence entre les indices gonadiques des mâles et des femelles et le changement de sexe entre les deux années d'observation ne dépend pas du sexe au cours de la 1^{ère} année.

L'IRM étant une méthode non-destructive, nous avons pu suivre les mêmes individus au cours des 8 séances IRM réparties sur deux années (6 séances en 2011 et 2 séances en 2012). Nous avons ainsi pu observer des différences entre la gamétogenèse de 2011 et la gamétogenèse de 2012 : la gamétogenèse a été plus précoce en avril 2012 qu'en avril 2011 mais, en juin, la tendance s'est inversée et l'indice gonadique a été globalement plus élevé en 2011 qu'en 2012. Ces différences sont probablement dues aux conditions environnementales atypiques observées en 2012. En effet, au printemps, un bloom planctonique précoce a pu déclencher une gamétogenèse plus précoce. A partir de mai, des précipitations très importantes et une stagnation des températures peuvent expliquer la tendance inverse observée entre juin 2011 et juin 2012.

2.2. Article 3 : Temporal monitoring of the gametogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, by Magnetic Resonance Imaging (MRI)

« Suivi temporel de la gamétogenèse de l'huître du Pacifique, *Crassostrea gigas*, by Magnetic Resonance Imaging »

Emilie FLAHAUW, Sylvie LAPEGUE, Stéphane QUELLEC, Armel DAVENEL, Virgile QUILLIEN, Caroline FABIoux, Philippe-Jacques HATT– En préparation pour soumission à Journal of Sea Research après correction de l'Anglais.

Pour cette étude, j'ai effectué, seule ou avec l'aide des coauteurs :

- *La production, l'élevage, le conditionnement et le marquage des huîtres,*
- *L'histologie, de la fixation à l'analyse des coupes,*
- *L'analyse des images IRM,*
- *Les analyses statistiques.*

2.2.1. Introduction

Gametogenesis is the process that leads to the formation of gametes of living organisms. In marine molluscs, gametogenesis is known to be an energy consuming function, possibly affecting energy allocation to other physiological functions (Soletchnik et al., 1997; Ernande et al., 2003; Enriquez-Diaz, 2004; Enriquez-Diaz et al., 2009). The reproductive effort is a proxy of the energy devoted to gamete production. In the oyster *Crassostrea gigas*, it has been negatively correlated with spat summer mortalities: individuals with higher reproductive effort would be more susceptible to summer mortalities (Samain et al., 2007; Huvet et al., 2010). Furthermore, since 2008, the detection of a newly described OsHV-1 variant called OsHV-1 μ Var was most of time reported during massive mortality outbreaks among *C. gigas* in several farming areas in Europe (Efsa, 2010; Segarra et al., 2010, Lynch et al., 2012; Peeler et al., 2012; Renault et al., 2012; Roque et al., 2012) (Segarra et al., 2010). These outbreaks affect severely the cupped oysters farming _ up to 85% of mortality in Marennes-Oléron Bay in 2012 according to the RESCO (RESeau d'observation COncylicole, Shellfish Farming National Observatory) _ which represents an important part of the French aquaculture. Indeed, the French production of oysters decreased by 130,000 tons per year in 2009 to 80,000 tons in 2010 and 2011 (CNC, French Shellfish National Committee, <http://www.cnc-france.com>). Characterizing the reproductive effort and relationships underlying these observations is therefore an important issue for the future of aquaculture.

Gametogenesis follows an annual cycle strongly influenced by water temperature and nutrition conditions (Fabioux et al., 2005, Enriquez-Diaz, 2009): in winter, gametogenesis initializes; in spring, active gametogenesis takes place to reach full maturity at the beginning of summer and spawning and, in autumn, unspawned gametes are resorbed. Given the high investment in reproduction, animals are more vulnerable and mortalities occur more frequently in summer (Soletchnik et al., 1997).

The most frequently used method for measuring reproductive effort is to assess the volume of the gonad by semi-quantitative histology (Fabioux et al., 2005). But the size of the gonad varies during gametogenesis and its dimension at a given time may not be

representative of the final reproductive effort. However, this method is destructive. It is therefore not possible to follow individual evolution of gametogenesis.

First morphological investigation of oysters by *in vivo* Magnetic Resonance Imaging (MRI) indicated that MRI is a good non-invasive tool to investigate *in vivo* anatomic traits and physiology in oysters (Pouvreau et al., 2006), including assessment of the volume and the maturation stage of the gonad (Davenel et al., 2006; Hatt et al., 2009). Moreover, in a previous study (Flahauw et al., 2012), highly significant linear relationship between the measure by means of histology and by means of MRI demonstrated that MRI is an appropriate method to assess the volume of the gonad and the proxy is proportionate to the actual gonad volume.

The present study was designed to follow the same individuals over two seasons of reproduction. We were thereby able to assess several qualitative (sex, reproductive stage, maturity of the gonad) and quantitative traits (internal volume, volume of the adductor muscle, volume of the gonad) that allowed confirming information available on the cupped oyster reproduction but also giving new insights on this important physiological process in oysters.

2.2.2. Materials and methods

2.2.2.1. Oysters

The oysters used in this study were all members of a single bi-parental full-sib family (F2 family). Briefly, this family was created using divergent lines for their response to summer mortalities. In F0, two groups were characterized according to survival to summer mortalities of their progenies in field. Then, one « resistant » male was mated with one « sensitive » female to produce a F1 family. Within this F1 family, one male and one female were used to generate the F2 generation in February 2010.

For each cross, to control fertilization, gametes were collected by stripping gonads. Then, larval rearing and micro-nursing were performed at the Ifremer hatchery in La Tremblade (Charente maritime, France). Afterwards, oysters were transferred to the Ifremer nursery in Bouin (Vendée, France) for nursing and keeping away from summer mortalities

from April to October 2010. A total of 300 oysters were individually tagged and divided in two oyster bags, with 150 oysters per bag. They were then transferred to Agnas (Marennes-Oléron Bay, France) where they were reared at 50 cm from the ground.

The individual gross mass range was 5–29g on the beginning of this study (April 4th 2011) and 9–47g on the end (June 6th 2012).

2.2.2.2. Magnetic Resonance Imaging

These oysters were imaged on the PRISM facilities at Irstea (Rennes, Brittany, France) on eight sessions (April 4th, May 5th, June 7th, July 6th, August 3rd, October 12th 2011, April 6th, June 6th 2012). The protocol is described in Flahauw et al. (2012). Briefly, they were transported out of water between La Tremblade and Rennes and, prior to MRI scanning, they were placed in vats containing seawater from the La Tremblade hatchery, for making them to open their valves and expel most of the air bubbles that had become trapped between their valves during transport. The volume of the few remaining bubbles was measured on the MR images and taken into account when making oyster volume measurements. The epibionts were brushed from the shells and then the shells were dried with tissues to limit parasitic signals, without any other modification.

MRI measurements of oysters were performed with a Siemens Avanto imager operating at 1.5 T (63.86 MHz), equipped with a “head” probe, which allowed the simultaneous examination of 15 oysters placed on five levels. A T1-weighted 3D Gradient Echo sequence provided 52 contiguous images, highlighting animal tissues, particularly gonadic tissues.

The main parameters of the MRI protocol were:

- Dimensions of the observed field = $161.9 \times 185 \text{ mm}^2$ (matrix: 280×320)
- Dimensions of the pixel on transverse cuts = $0.58 \times 0.58 \text{ mm}^2$
- Distance between two successive transverse cuts = 1.5 mm, making the dimensions of the voxel $0.58 \times 0.58 \times 1.5 \text{ mm}^3$
- Repetition time = 11 ms; echo time = 3.01 ms; flip angle = 20°

- Number of transverse cuts across the volume = 52
- Filters = correction distortion + standard pre-acquisition + elliptical filter
- Time of acquisition for 52 sections = 12 min 56 s (number of excitations = 6)

An algorithm based on a 3D Object Counter plug-in using the ImageJ software (developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD and available by ftp at [zippy.nimh.nih.gov/](ftp://zippy.nimh.nih.gov/) or <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) was used to extract an image stack of each oyster and calculate its grey-level stack histogram.

2.2.2.3. Reproductive stage assessment

2.2.2.3.1. Maturation stages

Part of the oysters (42 in 2011 and 28 after MRI session of June 2012) was sacrificed for histological sections. For each sample, histological sections were prepared as described in Fabioux et al. (2005). Briefly, 3-mm cross sections of the visceral mass were excised in front of the pericardial cavity and immediately fixed in Davidson's solution (Shaw and Battle, 1957) for 48 h. After dehydration and paraffin wax embedding, 5- μ m sections were cut, mounted on glass sections, and stained with Harris' hematoxylin-Eosin Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967). These 70 sections allowed comparing the traditional method to assess gonad development, histology, to the non-destructive method of MRI (see Flahauw et al., 2012 for more details). In addition to the highly significant correlation between the estimations of surface and volume of gonad by these two methods, this study also enables to identify sex of oysters (with 100 % of success on fully mature gonads) and their maturation stage corresponding to the reproductive scale of Steele and Mulcahy (1999) directly on MRI images.

2.2.2.3.2. Measurement and calculation of reproductive effort indexes

Previous studies (Davenel et al. 2006, Hatt et al. 2009) concluded on:

- a very highly significant linear relation between the weight of the water within the shells plus the flesh and the number of voxels on the MR images, which grey-level is higher than 63,

- a very highly significant linear relation between the weight of the dried flesh and the number of voxels on the MR images, which grey-level is higher than 95.

From another previous study (Flahauw et al., 2012) we concluded that the number of voxels on MR images which grey-level is higher than 165 is a proxy for the gonad volume. The adductor muscle is clearly distinct on the MR images. Its surface was measured on the image where its transverse section was the largest. This measure was considered as a good proxy of the somatic tissues.

As the oysters were of very different sizes, for comparisons among individuals of the gonad volume, the flesh volume and the adductor muscle surface, we used the ratios below:

$$\text{Flesh index} = \frac{\text{Flesh volume}}{\text{Intravalvular volume}}$$

$$\text{Muscle index} = \frac{\text{Adductor muscle surface}}{\text{Intravalvular volume}}$$

$$\text{Gonad index} = \frac{\text{Gonad volume}}{\text{Intravalvular volume}}$$

The variation of the gonad index during the spawning/resorption period which represents the proportion of gametes spawned was used as an indirect measure of the reproduction effort. These variations were compared with the evolutions of the flesh index and the muscle index.

2.2.2.3.3. Comparison with data of RESCO monitoring network

To determine if the F2 family studied behaved like wild oysters during the observation period, we compared their kinetics of reproduction to those of oysters from the RESCO monitoring network. Indeed, for this network, a batch of diploid oysters called “standard oysters” has been maintained with the same procedure every year since 2008 in the same location as our studied oysters. They are 18 months old, naturally collected in June 2009. Their average weight is 11 g mid-April and 23 g at the end of September 2011. Some of them are sampled every two weeks from May to July and every four weeks in April, August, September and October.

On each sample of 30 oysters, are measured the average total weight, the average weight of the fresh flesh, of the shells and of the dried flesh. From those measures, are drawn the total growth, the growth of the flesh and the spawning period.

2.2.2.4. Environmental factors

Close to the Agnas oyster bed in Marennes-Oleron bay, where the oysters were reared, several parameters are measured: the water temperature, salinity and the fluorescence, which is a good proxy of the phytoplankton density. They are measured every 20 minutes by means of *in situ* probes, which are calibrated every month.

2.2.3. Results

2.2.3.1. Gonad development

Based on observations of histological slides, six stages were defined according to the gonad development seen on MRI images (Figure 33). At stage 0, gonad is not distinguishable from other tissues (Figure 33a). Then, at stage 1, some lighter spots appear on the periphery of the body, around the digestive gland and tract (Figure 33b). At stage 2, periphery seems lighter, more or less thick but continuous, around the digestive gland and tract (Figure 33c). At stage 3, whole peripheral body is lighter with dark spots in the middle corresponding to vesicular cells (Figure 33d). For the majority, the gonad went from fully mature (stage 3 on Figure 33) to stage 4 on two successive MRI sessions, but for some oysters partial spawning/resorption (stage 3p on Figure 33) was noticed after stage 3 and before stage 4. The spawning/resorption period was longer, in accordance. So stage 3p is defined when the peripheral surface is reduced of at least 40% in comparison to previous MRI session (Figure 33e). Finally, at stage 4, periphery becomes again darker than for previous MRI session with, sometimes, lighter spots in the middle corresponding to vesicular cells and digestive tract (Figure 33f). Indeed, stage 4 is related to the disappearance of the mature gonad on the MR images: this can be related to the post-spawning period (complete or incomplete). The period of gametes spawning or resorption was defined as period of time preceding the date of the observation of the stage 4.

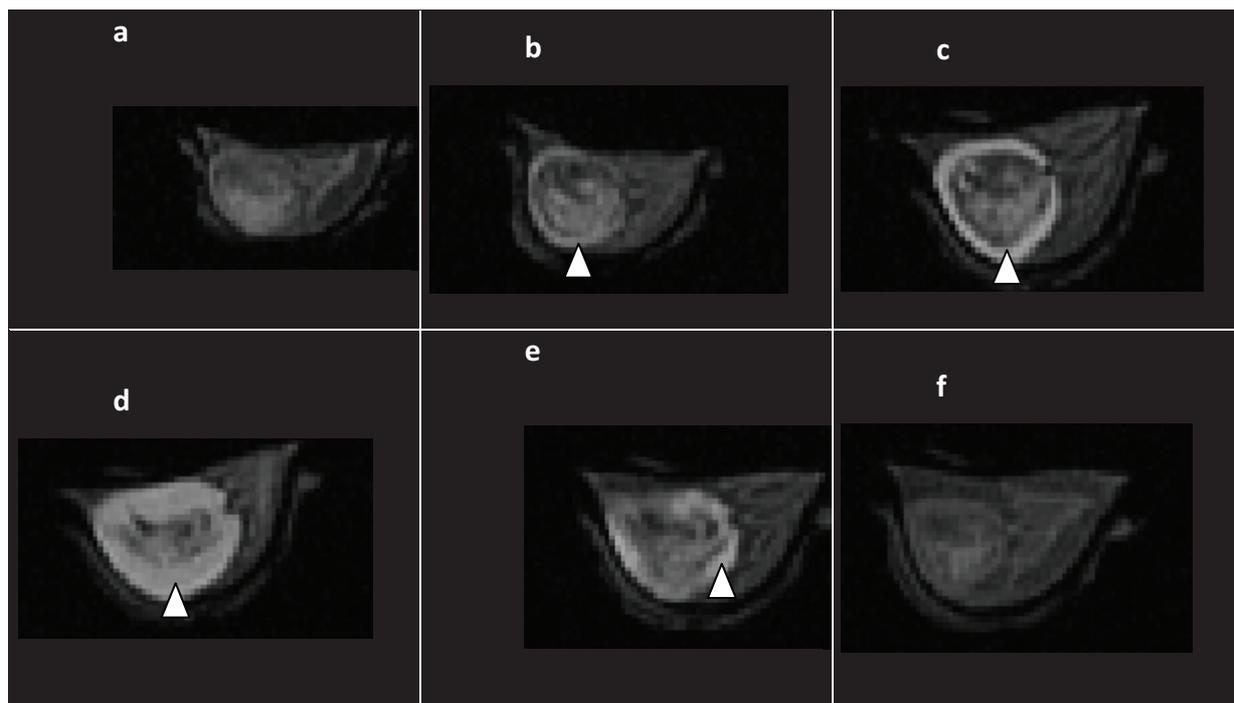


Figure 33. Description of the maturation stages based on MRI images. Here are represented the six stages defined from observations of MRI images. The white arrow shows the gonad.

2.2.3.1.1. Maturation stages

In April 2011, oysters were mainly at stage 1 (87,7%) while in April 2012, oysters were mainly at stage 2 (58,8%). In May 2011, close to 80% of oysters were in stage 2 of gametogenesis. In 2012, observations are limited to April and June but we can notice that distributions of maturation stages are significantly different from April and June 2011 (respectively $\chi^2=143$, $P0<0,0001$; $\chi^2=22$, $P0=0,0002$). Indeed, In June 2012, individuals were surprisingly less mature than in June 2011, despite the 30 oysters sacrificed for histology which were all at stage 3. In June and July 2011, 70-80% of fully mature gonads were observed (Figure 34) and there were no oyster at stage 0 and only 0,5% at stage 1. Conversely, in June 2012, 5,7% were still at stage 0 and 2,1% at stage 1 and only 57,9% at the stage 3.

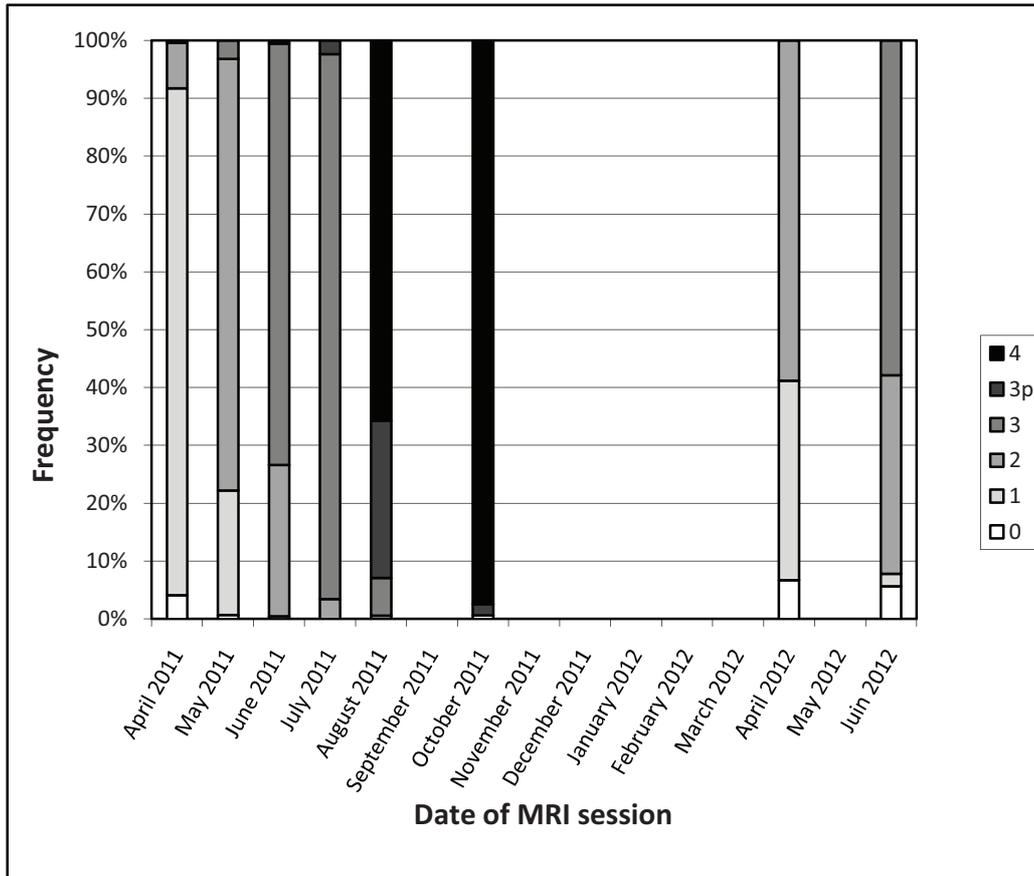


Figure 34. Distribution of maturation stages over time.

2.2.3.1.2. Date of spawning/resorption

Gametogenesis did not start at the same time for all oysters but, despite different patterns of gametogenesis, oysters spawned (completely or partially) mainly between July 6th and August 3rd in 2011 (89%). There also had some earlier individuals (0,6% between May 4th and June 7th; 3% between June 7th and July 6th) and some later individuals (7% between August 3rd and October 12th). Date of spawning showed no significant difference between males and females. However, partial spawning is more common for females (23%) than for males (18%).

The evolution of the average flesh weight of the standard oysters of the RESCO monitoring network (Figure 35) in 2011 indicated two spawning events around mid-July and after mid-September (Velyger, <http://wwz.ifremer.fr/velyger>). These are the same periods of

time that our experimental stock. It has to be noted that, in 2012, the spawning occurred one month later for standard oysters.

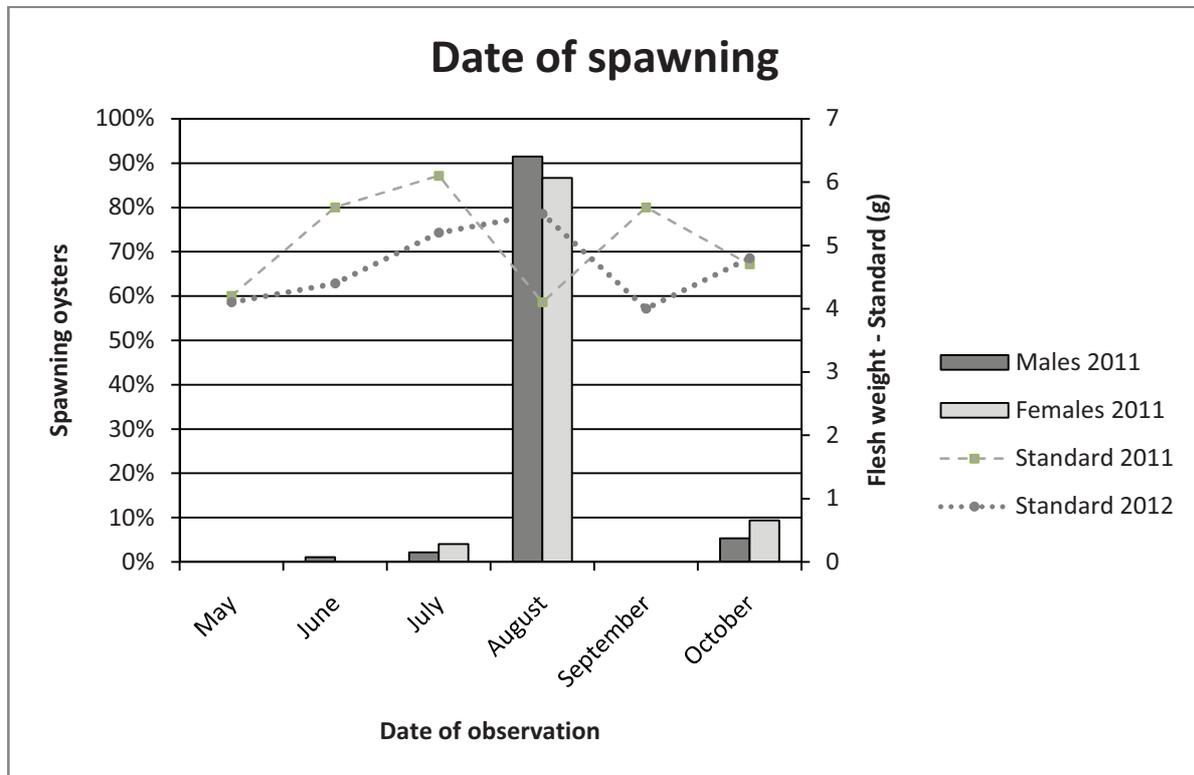


Figure 35. Date of spawning for studied oysters in 2011 compared to date of spawning of standard oysters in 2011 and 2012.

2.2.3.1.3. Gonad index

The average maximal gonad index of the 106 surviving oysters in 2012 ($\mu = 0,36 \pm 0,11$) is lower than their maximal gonad index of 2011 ($\mu = 0,55 \pm 0,11$) but data of the two years are significantly correlated ($t = 2,56$; $p = 0,01$): oysters which had a high gonad index in 2011 had mainly a high gonad index in 2012 and, conversely, oysters which had a low gonad index in 2011 had mainly a low gonad index in 2012

2.2.3.2. Gender-related specificities.

2.2.3.2.1. Sex ratio

Sex ratio was based on observations of fully mature gonads to ensure correct assignation. There is no significant difference between 2011 and 2012 (Table 7), the sex ratio

being around close to 50/50. Some oysters clearly showed a male gonad in april or may then a female gonad in the same year, that were called hermaphrodites.

	Number of oysters		Sex ratio		Stage 2					Stage 3					Mortality	
	2011	2012	2011	2012	April	May	June	July	August	April	May	June	July	August	Between May and June 2011	Between June 2011 and June 2012
Indetermined	43	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44%	24%
Males	125	58	49%	44%	13%	82%	4,80%	0,80%	0	0	6%	80%	13%	0,9%	10%	35%
Females	128	72	50%	55%	5%	85%	10%	0%	0	0	3,3%	60%	36%	1,1%	45%	41%
Hermaphrodites	2	0	0,8%	0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 7. Gender-related specificities

2.2.3.2.2. Sex change

Among the 146 surviving oysters on 6th April 2012, 80 were sexed as males and 66 as females in 2011. In 2012, 18 (14 males and 4 females, in 2011) had not sufficiently matured to determine their sex. Among the 128 other oysters (61 males, 66 females, 1 hermaphrodite), which showed a mature gonad, 33% had a sex different from that expressed in 2011: 24 males in 2011 became females in 2012 and 19 females became males. However most of the oysters kept the same sex during the two years (Figure 36).

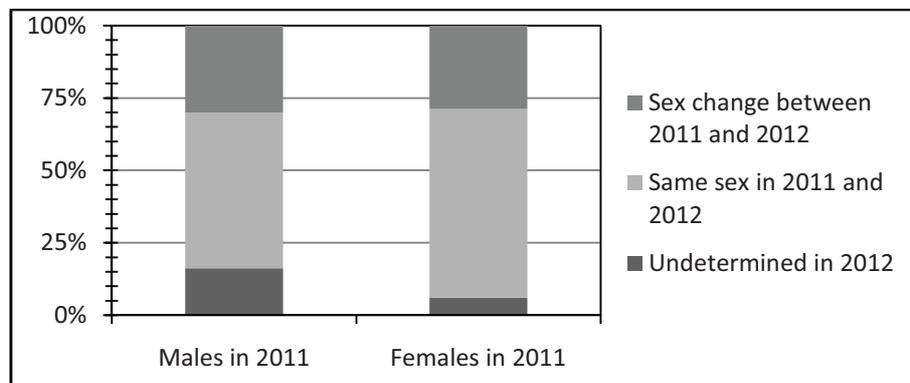


Figure 36. Distribution of sex changes between 2011 and 2012.

2.2.3.2.3. Gametogenesis kinetics

The number of MRI sessions for which gonads were observed at stage 3 is used as a proxy of the full maturity period of times. Males showed a significantly ($\chi^2=16,8$, $P=0,0002$) longer full maturity period of times than female (respectively $\mu=1,7\pm 0,5$; $\mu=1,5\pm 0,6$)(Table 7).

In April 2011, 13% of the oysters were at stage 0 and the other 87% showed a gonad at stage 1. It appears that males were significantly earlier than females to reach the stage 2 ($\chi^2=8,01$; $P<0,04$) and stage 3 ($\chi^2=14,1$, $P=0,003$) of gametogenesis (Table 7).

2.2.3.2.4. Summer mortality

Oysters have shown no summer mortalities during their first year, but they suffered mortalities during our study (Table 7). As observed for standard oysters (Figure 37), mortalities were characterized by a peak between May 4th and June 6th (77 individuals). Among these dead oysters, there is a highly significant majority of females: 35 females against 8 males (and 34 undetermined), while the sex ratio on May 4th was balanced. Regarding a relation between maturation stage and mortality, number of data is sufficient only for the period related to the peak of mortality. On May 4th, the distribution of maturation stages for oysters that would soon die was significantly different from the distribution of maturation stages for oysters that would survive ($\chi^2=11$, $P=0,01$): survivors showed less mature gonads than dead oysters.

34 other oysters died between June 2011 and June 2012, most of them during summer 2011 (41% of females and 35% of males).

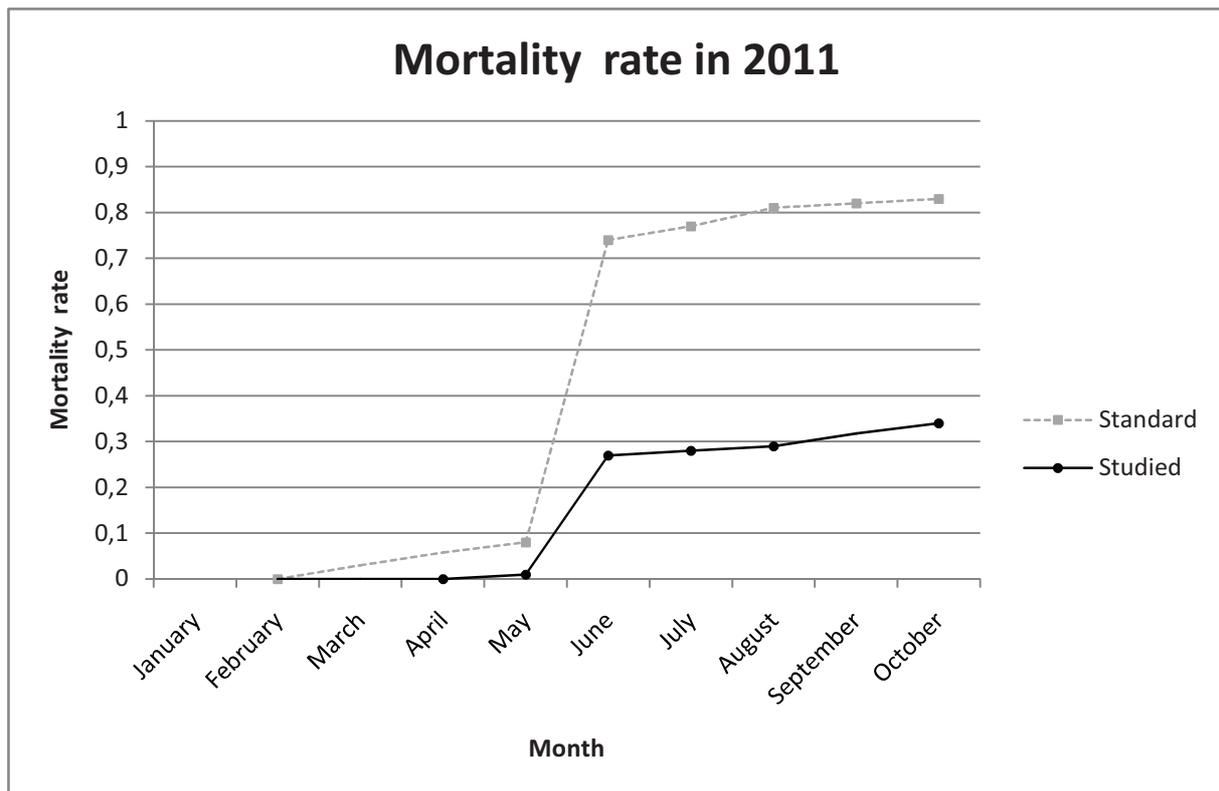


Figure 37. Mortality rate in 2011 for studied and standard oysters.

2.2.3.3. Quantitative monitoring

2.2.3.3.1. Reproductive effort in 2011 and post-spawning growth

Reproductive effort in 2011 was assessed as the variation between maximal gonad index (between April and August 2011) and minimal gonad index (in August or October 2011). The evolution of volume of wet flesh post-spawning corresponds to the variation of flesh index between the date of MRI session after spawning and October 2011. Variation of flesh index post-spawning is significantly correlated to reproductive effort ($t=-3,59$; $p=0,0005$): oysters which showed an important reproductive effort are those which grew the most after spawning. The same relationship exists between reproductive effort in 2011 and variation of muscle index between post-spawning and 6th April 2012 ($t=-3,08$; $p=0,003$). Furthermore, the highest the muscle index was in April 2011, the highest the gonad index was during gametogenesis 2011 ($t=3,63$; $p=0,0003$) and the increasing of muscle index was synchronous to the increasing of gonad index.

2.2.3.3.2. Growth post-spawning and reproductive effort in 2012

Maximal gonad index in 2012 is highly correlated to the growth post-spawning 2011 ($t = 10,9$; $p=3.10^{-20}$): oysters which had the most significant increasing of flesh index and muscle index after spawning 2011 were those which had the highest gonad index in 2012.

2.2.3.4. Temperature, salinity and phytoplankton density

In 2011, the water temperature was slightly above the 15 years average from mid-March till mid-June and from August till October. In 2012, the springtime warming occurred four weeks later (Figure 38). However it also appeared a very important bloom at the beginning of the spring (March 2012) and secondly a decrease of salinity in April-May 2012 and a stagnation of the temperature (REPHY network, S. Guesdon, Pers. Com).



Figure 38. Evolution of seawater temperature in 2011 and 2012.

2.2.4. Discussion and conclusions

Magnetic Resonance Imaging appears as a tool which allows a temporal monitoring of gametogenesis of oysters. Because it is a non-destructive method, it is also possible to compare several periods of gametogenesis for the same individuals, which is closer to reality than when comparisons were based on observations of different sub-samples. It is particularly important when we know the individual variability and plasticity of oysters for numerous traits.

To ensure that studied oysters behaved like wild oysters, we compared our data to data from the national monitoring network RESCO. Even if we observed the peak of mortalities at the same time for studied and standard oysters, the mortality rate was higher

for standard oyster than for our studied oysters. This could be due to the effect of the genetic background, the age/size of oysters or their date of transfer to Agnas.

The observation of maturation stages was consistent with the scales proposed by Mann (1979), Steele and Mulcahy (1999) or Normand et al. (2009). However, individual monitoring revealed individual kinetics of early gametogenesis: each oyster matured at its own speed but were mostly fully mature at the same time. Individual tagging allowed detecting sex changes: independently from gender, 1 oyster on 3 changed sex between 2011 and 2012 while Lango-Reynoso (1999) estimated that 50% of the oysters have the ability to change sex, mainly from male to female. Despite this frequency of sex changes between the two periods of gametogenesis, sex ratio remained stable and balanced contrary to increase of the percentage of females observed by Guo et al. (1998). This could be explained by the higher mortality rate of females during summer 2011 or by environmental factors promoting males in 2012 such as lower water temperature.

Monitoring on two successive seasons of gametogenesis for the same oysters showed an important variability of some traits related to gametogenesis. During this study, we observed that global reproductive effort, represented by the gonad index, was lower in 2012 than in 2011 and that the maturation of gonads was later in 2012 than in 2011. It has to be noted that, to ensure that maximal gonad index measured in June 2012 could be compared with that of 2011, 30 oysters were sacrificed to make histological sections. The analysis of histological slides confirmed that individuals were fully mature and that the maximal gonad index is representative of the reproductive effort in 2012. These global observations could be partly explained by the variations of environmental conditions between the two years: the springtime warming occurred four weeks later in 2012 and it was shown that temperature strongly influences kinetic gametogenesis and nutrient content the reproductive investment (Enriquez-Diaz,, 2009, Fabioux et al. 2005). When focusing and comparing two periods (April and June available for both years), we could try to better understand the kinetic of gametogenesis in relation with environmental parameters. Hence, the very important phytoplanktonic bloom observed in early spring 2012 could explain the precocity of gametogenesis in 2012 compared to 2011. However the low salinity in May

2012 linked to very important rainfall at this period and stagnation of temperatures in May-June 2012 could explain a final delay of gametogenesis in June 2012 compared to 2011. However, reproductive effort seems proportional from one year to another and suggests a genetic origin of reproductive capacity.

Contrary to current empirical observations, Normand et al. (2009) observed by histology a significantly higher gonadic occupation of females compared to males suggesting that males and females mature at different speed, females being earlier because having a more developed gonad at a given time. Gender and maturation stages being differentiated on MRI images, it is also feasible to establish gender-related specificities. As Ernande et al. (2004), we observed no difference between gonad index of males and females but month by month monitoring revealed differences in kinetics between male and female gametogenesis _ males were earlier and longer matures than females _ but the spawning date is not significantly different by gender. This seems consistent with the biology of the species: external fertilization in a moving environment requires synchronized spawning to promote meeting between male gametes and female gametes. Moreover, the spawning occurred at the same time for other oysters reared in Marennes-Oléron Bay. We also observed that females are more susceptible to summer mortalities. However, it is known that female gametogenesis is more costly in energy than the male gametogenesis. Females are thus more vulnerable when summer mortalities occur. It appears also that partial spawning is more common for females.

According to a previous study conducted in an experimental environment (Hatt et al., 2009), growth post-spawning is positively correlated to reproductive effort: oysters which had a significant reproductive effort are those which had the most significant growth after spawning. In our study, monitoring on two successive years also allows to conclude that growth post-spawning is positively correlated to reproductive effort of the next year: individuals which grew the most during autumn and winter 2011 are those which had the most significant reproductive effort in 2012. Although, we are not able to differentiate gametes resorption from reserves accumulation, if an oyster doesn't need to reabsorb

gametes, reserves accumulation can start earlier. So, an oyster which had totally spawned early in year n , has more time to accumulate reserves for the gametogenesis of year $n+1$.

MRI thus appears as a suitable tool to investigate the gametogenesis of *Crassostrea gigas* because it confirms some previous knowledge about reproductive traits observed by classical or destructive methods and non-destructive monitoring also brings new insights on individual path of gametogenesis such as sex change or correlation of gonad index for two successive years. However, it would be interesting to repeat this experiment on several families or wild populations during more years. These data will be used to try to detect some regions of the genome, QTL (Quantitative Trait Loci), involved in gametogenesis. The finer characterization of such traits linked to gametogenesis should allow a better characterization of the genetic bases of those traits. Furthermore, the development of high throughput genotyping techniques will take advantage of this finer phenotyping for a finer mapping of the areas of interest in the genome.

2.2.5. Acknowledgements

This work was supported by Ifremer and was partially funded by a grant from the Agence National de la Recherche « Génomique animale » Programme (GAMETOGENEs project - ANR-08-GENM-041). The authors are grateful to all members of staff of the Ifremer hatchery in La Tremblade and of the nursery in Bouin for producing and rearing the oysters and would particularly like to thank Patrick Soletchnik for providing the environmental data.

2.2.6. References

- Davenel, A., Quéllec, S., Pouvreau, S., 2006. Noninvasive characterization of gonad maturation and determination of the sex of Pacific oysters by MRI. *Magn. Reson. Imaging*. 24 (8), 1103-1110.
- EFSA, 2010. Scientific opinion of the panel on animal health and welfare on a request from the European Commission on the increased mortality events in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *EFSA J.* 8, 1894–1953.
- Enriquez-Diaz, M., 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*. *Océanologie Biologique*. Brest, Université de Bretagne Occidentale. PhD. 216p.

- Enriquez-Diaz, M.-R., Pouvreau, S., Chavez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquacult. Int.* 17(5), 491-506.
- Ernande, B., Clobert, J., McCombie, H., Boudry, P., 2003. Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): A quantitative genetics study. *J. Evol. Biol.* 16, 399-411.
- Ernande, B., Boudry, P., Clobert, J., Haure, J., 2004. Plasticity in resource allocation based life history traits in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Spatial variation in food abundance. *J. Evol. Biol.* 17, 342-356.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*. 250, 458-470.
- Flahauw, E., Quéllec, S., Davenel, A., Dégremont, L., Lapègue, S., Hatt, P.-J., 2012. Gonad volume assessment in the oyster *Crassostrea gigas*: Comparison between a histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method. *Aquaculture*. 370-371, 84-89.
- Galstoff, P.S., 1964. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. US Fish Wildl. Serv. Fish. Bull. 64, 1-480.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution*. 52 (2), 394-402.
- Hedrick, P.W., Hedgecock, D., 2010. Sex determination: genetic models for oysters. *J. Hered.* 101 (5), 602-611.
- Hatt, P.-J., Davenel, A., Eliat, P.-A., Quéllec, S., 2009. Magnetic resonance imaging as a mean to assess the body growth and the gonad development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 22, 331-339.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: a trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture*. 304, 95-99.
- Lango-Reynoso, F., 1999. Détermination de la sexualité chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). PhD Thesis, Institut Universitaire Européen de la Mer, 178pp.
- Lango-Reynoso, F., Devauchelle, N., Le Pennec, M., Hatt, P.-J., 1999. Elements of reproductive strategy in oysters, *Crassostrea gigas*, from the "Rade de Brest", France. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 36 (1-3), 141-144.

- Le Dantec, J., 1968. Ecologie et reproduction de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata*, Lamarck) dans le Bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. Rev. Trav. Inst.Pech. Marit. 32 (3) : 237-362.
- Lynch, S. A., Carlsson, J., Reilly, A. O., Cotter, E., Culloty, S. C., 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. Parasitology, 139 (12), 1526-1532.
- Mann, R., 1979. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 59, 95–110.
- Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., Boudry, P., 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. Aquatic Biol. 7, 229–241.
- Peeler, E.J., Reese, R.A., Cheslett, D.L., Geoghegan, F., Power, A., Thrush, M.A., 2012. Investigation of mortality in Pacific oysters associated with *Ostreid herpesvirus-1* μ Var in the Republic of Ireland in 2009. Prev. Vet. Med., 105 (1-2), 136-143.
- Pouvreau, S., Rambeau, M., Cochard, J.C., Robert, R., 2006. Investigation of marine bivalve morphology by in vivo MR imaging: first anatomical results of a promising technique. Aquaculture, 259 (1–4), 415–423.
- Renault, T., Moreau, P., Faury, N., Pepin, J.-F., Segarra, A., Webb, S., 2012. Analysis of clinical *Ostreid Herpesvirus 1* (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. J. Virol., 86 (10), 5942-5947.
- Roque, A., Carrasco, N., Andree, K.B., Lacuesta, B., Elandaloussi, L., Gairin, I., Rodgers, C. J., Furones, M. D., 2012. First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. Aquaculture, 324, 303-306.
- Samain, J.-F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., VanWormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Géret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. Aquaculture. 268, 227–243.
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. Virus Res., 153, 92–99.

- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P., 1997. Ecophysiology of maturation and spawning in oyster *Crassostrea gigas*: metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquat. Living Resour.* 10, 177–185.
- Steele, S., Mulcahy, M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 79, 673-686.

PARTIE III : CARACTERISATION GENETIQUE DE L'EFFORT REPRODUCTEUR

1. Préambule

Cette partie est rédigée en Français mais sous la forme d'un article qui sera prochainement traduit en Anglais pour être soumis à Aquaculture.

2. Article 4 : Détection de QTL de l'effort reproducteur chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

Emilie FLAHAUW, Serge HEURTEBISE, Christophe BOURY, Philippe-Jacques HATT, Sylvie LAPEGUE

Cette étude étant un travail d'équipe, il est important de préciser les tâches que j'ai effectuées, seule ou accompagnée par les coauteurs :

- *La production, l'élevage, le conditionnement et le marquage des huîtres,*
- *L'histologie, de la fixation à l'analyse des coupes,*
- *L'analyse des images IRM,*
- *Détection des marqueurs SNPs in silico,*
- *L'extraction et la préparation de l'ADN en vue du génotypage,*
- *L'analyse des données de génotypage,*
- *La cartographie génétique,*
- *La détection de QTLs.*

2.1. Introduction

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est une espèce d'intérêt économique au niveau mondial. En 2011, 4,4 millions de tonnes ont été produites (FAO, 2013). Cependant, sur les côtes françaises, les juvéniles d'huîtres creuses subissent d'importantes mortalités estivales depuis 2008 (Pernet et al., 2010) et les conséquences sur la production nationale sont d'ores et déjà perceptibles : jusqu'en 2009, la France produisait environ 130 000 tonnes d'huîtres par an tandis qu'en 2010 et 2011, la production n'a pas dépassé les 80 000 tonnes (Comité National de la Conchyliculture, <http://www.cnc-france.com>).

Le phénomène des mortalités estivales d'huîtres creuses est connu depuis 1945 sur les côtes japonaises (Koganezawa, 1974), depuis 1980 sur les côtes françaises (Maurer et al. 1986; Bodoy et al. 1990; Soletchnik et al. 1999) et a été particulièrement étudié durant le

projet MOREST (Samain et McCombie, 2008). Une forte héritabilité de la réponse aux mortalités estivales a notamment été mise en évidence (Dégremont et al., 2007) et a servi de base à la sélection de lignées « résistantes » (R) et de lignées « sensibles » (S) aux mortalités estivales (Dégremont et al., 2009). Des régions du génome, Quantitative Trait Loci, impliquées dans la réponse aux mortalités estivales ont d'ailleurs été détectées (Sauvage et al., 2010).

Parallèlement, Samain et al. (2007) et Huvet et al. (2010) ont mis en évidence une forte corrélation entre la réponse aux mortalités estivales et l'investissement dans la reproduction : la reproduction est ainsi suspectée de représenter un coût énergétique élevé chez les huîtres S (supérieur à celui des R) à l'origine de leur fragilité physiologique. De plus, un ensemble de gènes candidats ont été détectés dans une analyse transcriptomique (Fleury et al., 2010) comme différentiellement exprimés entre des individus R et S tout au long d'un suivi in situ. Certains sont des candidats à privilégier au regard des hypothèses énoncées à l'origine des mortalités estivales telles que le déséquilibre énergétique lié à la reproduction ou la capacité de réponse au stress (Samain et al. 2007). Ce sont notamment des gènes codant pour un facteur de croissance gonadique, un récepteur type neuropeptide Y, une SuperOxide Dismutase, ou une catalase.

Cependant, si les mécanismes de la gamétogenèse de l'huître creuse et l'influence de l'environnement sont bien décrits dans la littérature (Enriquez-Diaz, 2004 ; Fabioux et al., 2005 ; Normand et al., 2009), la part génétique du contrôle de caractères liés au sexe, sa mise en place et son développement est encore mal connue. Par exemple, le déterminisme sexuel n'a, à ce jour, pas encore été élucidé bien que des modèles à un locus (Guo et al., 1998 ; Hedrick et Hedgecock, 2010) ou trois loci (Haley, 1977) aient été proposés. Ainsi, connaître l'architecture génétique de l'effort reproducteur de l'huître creuse pourrait être une clé de la compréhension du lien entre la reproduction et le phénomène des mortalités estivales. L'objectif de cette étude est donc de détecter non seulement des régions du génome impliquées dans l'effort reproducteur de l'huître creuse, mais plus largement dans la dynamique de la reproduction afin de donner des clés de compréhension des mécanismes

complexes sous-jacents. Des zones candidates à privilégier pour des études génomiques et fonctionnelles plus poussées pourront être proposées.

2.2. Matériel et Méthodes

2.2.1. Matériel biologique

Les huîtres utilisées dans cette étude appartiennent à trois familles bi-parentales de type F2, nommées F2-18, F2-19 et F2-21 (Figure 39). Ces familles ont été choisies en fonction des taux de mortalité au cours de l'épisode de mortalité estivale d'août 2010 (voir partie IV pour plus de détails). Pour produire ces familles, des individus aux performances contrastées en termes de survie aux mortalités estivales issus de la sélection menée au cours du programme MOREST (Dégremont et al, 2009) ont été utilisés comme génération F0. Une femelle F0 « sensible » a été croisée avec un mâle F0 « résistant » pour produire une famille F1 au sein de laquelle 2 mâles et 2 femelles ont été choisis pour obtenir les familles F2-18 et F2-19. De la même façon, une femelle F0 « résistante » a été croisée avec un mâle F0 « sensible » pour produire une famille F1 au sein de laquelle 1 mâle et 1 femelle ont été choisis pour obtenir la famille F2-21.

Pour chaque croisement et afin de contrôler les fécondations, les gamètes ont été récupérés par scarification des gonades. L'élevage larvaire et le micro-nursage ont été effectués à l'écloserie Ifremer de La Tremblade (Charente maritime, France). Puis, les huîtres ont été transférées à la nurserie Ifremer de Bouin (Vendée, France) pour le nursage et la protection vis-à-vis des mortalités estivales entre avril et octobre 2010. Pour chaque famille F2, 300 huîtres ont été réparties en 2 poches de 150 et placés sur des tables ostréicoles sur l'estran à Agnas (Bassin de Marennes-Oléron, Charente maritime, France)

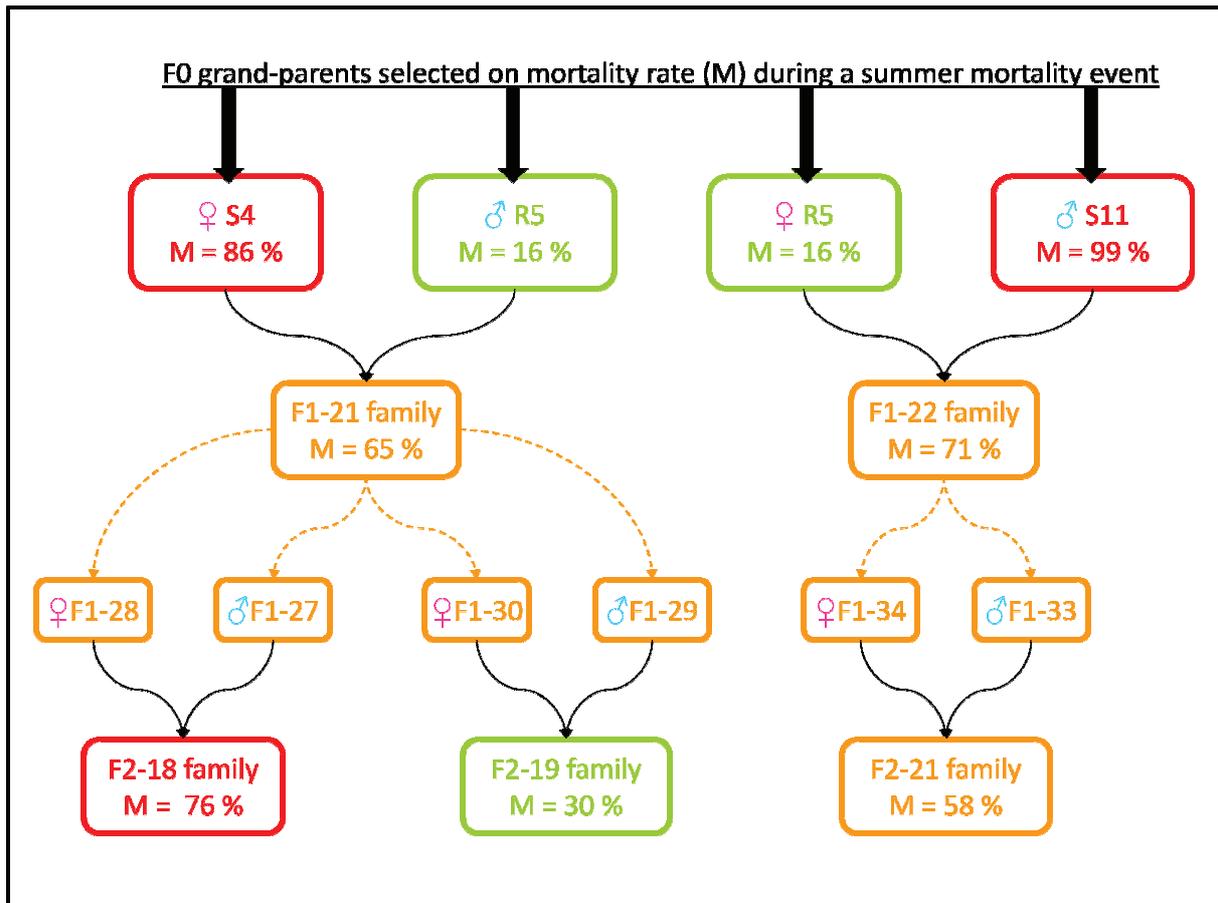


Figure 39. Production des familles expérimentales. Les grands-parents F0 proviennent de lots sélectionnés pour leur réponse aux mortalités estivales. Le lot R5 présente un taux de mortalité (M) faible tandis que les lots S4 et S11 présentent des taux de mortalité élevés. Les familles F1 produites à partir de ces lots présentent des taux de mortalité intermédiaires. Les familles F2 ont été obtenues par des croisements biparentaux de frères et sœurs F1 et présentent des taux de mortalités faible (F2-19), moyen (F2-21) et élevé (F2-18).

2.2.2. Suivi de la gamétogenèse par Imagerie par Résonance Magnétique

Les huîtres de la famille F2-18 ont fait l'objet d'un suivi individuel de la gamétogenèse par IRM. Pour cela, les 300 individus ont été numérotés directement sur leur coquille avant leur transfert sur estran. Les huîtres ont été amenées à la plateforme PRISM de l'IRSTEA (Rennes, Bretagne, France) pour être soumises à 6 sessions IRM en 2011 (4 avril, 5 mai, 7 juin, 6 juillet, 3 août et 12 octobre) et 2 sessions en 2012 (6 avril et 6 juin). Le protocole a été décrit dans Flahauw et al. (2012). En résumé, les huîtres ont été transportées à sec entre La Tremblade et Rennes puis immergées dans de l'eau de mer afin d'ouvrir leurs valves pour expulser les bulles d'air éventuellement formées pendant le transport. Les coquilles ont été

débarrassées de leurs épibiontes et séchées pour réduire les signaux-parasites qui pourraient être émis.

Les mesures IRM ont été effectuées par un scanner Siemens Avanto à 1,5T (63,86 MHz) au moyen d'une antenne-tête accueillant 15 huîtres à la fois, réparties sur 5 plateaux superposés. Une séquence de gradient d'écho à pondération T1 a fourni 52 images éclaircissant les tissus des huîtres et, plus particulièrement, les tissus gonadiques.

Les principaux paramètres du protocole IRM étaient :

- *Dimensions du champ observé = $161,9 \times 185 \text{ mm}^2$ (matrice: 280×320)*
- *Dimensions du pixel des coupes transversales = $0,58 \times 0,58 \text{ mm}^2$*
- *Distance entre deux coupes successives = 1,5 mm, impliquant les dimensions des voxels $0,58 \times 0,58 \times 1,5 \text{ mm}^3$*
- *Temps de répétition = 11 ms; temps d'écho = 3,01 ms; angle d'impulsion = 20°*
- *Nombre de coupes transversales par animal = 52*
- *Filtres = correction de distorsion + pré-acquisition standard + filtre elliptique*
- *Temps d'acquisition pour 52 sections = 12 min 56 s (nombre d'excitations = 6)*

Un algorithme fondé sur un plug-in 3D Object Counter utilisant le logiciel ImageJ (développé par Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD et disponible par ftp sur zippy.nimh.nih.gov/ ou <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) a été utilisé pour extraire une compilation d'images pour chaque huître et calculer l'histogramme de niveaux de gris de cette compilation.

2.2.3. Analyse des images IRM

A partir des histogrammes de niveaux de gris individuels, de nombreux traits en rapport avec la gamétogenèse ont été mesurés. Les méthodes et résultats de mesure de ces différents traits sont détaillés dans l'article 3. En bref, les stades de maturation gonadique ont été définis à partir de l'échelle de Steele et Mulcahy (1999). La précocité a été considérée comme la date d'arrivée au stade 2 et au stade 3. La durée de pleine maturité a été définie comme le nombre de séances d'IRM pour lesquelles le stade 3 était observé. La

date de ponte correspond au mois précédent l'observation du stade 4. Les sexes ont pu être différenciés par le niveau de gris plus clair des femelles par rapport aux mâles. Un changement de ce niveau de gris pour un même individu a permis de supposer un changement de sexe. L'indice gonadique correspond au rapport entre le volume de la gonade et le volume intravalvaire. Enfin, la reprise de la croissance après ponte a été estimée par la variation de l'indice de chair (rapport entre le volume de chair et le volume intravalvaire) suite à la ponte.

2.2.4. Observation de la gamétogenèse par histologie

La gamétogenèse des huîtres des familles F2-19 et F2-21 a été étudiée par histologie. Pour cela, les 7 et 8 juin 2011 les 300 individus de chaque famille ont été décoquillés, identifiés et fixés entiers dans du fixateur de Davidson (Shaw and Battle, 1957) pendant 24h. Puis, les 8 et 9 juin 2011, les coupes histologiques ont été préparées comme décrit par Fabioux et al. (2005). En résumé, des coupes de 3 mm de masse viscérale ont été prélevées en amont de la cavité péricardique et immédiatement fixées dans du fixateur de Davidson (Shaw and Battle, 1957) pendant 48h. Après déshydratation et enrobage dans de la paraffine, des coupes de 5 μ m ont été réalisées, montées sur lames d'observation et colorées à l'hématoxyline de Harris - éosine Y (Martoja and Martoja-Pierson, 1967).

Le sexe et le stade de maturité des gonades ont été déterminés au microscope selon l'échelle décrite par Normand et al. (2009). Les coupes histologiques ont également été numérisées à l'aide d'un scanner (Epson Perfection 4870 Photo) et les images ont été sauvegardées au format JPEG. Les surfaces de tissus ont été mesurées à l'aide du logiciel d'analyse d'images IMAQ Vision Builder (National Instruments Corp, Austin, Texas, USA). Dans un premier temps, chaque image a été convertie en niveaux de gris. Puis, une première région d'intérêt (ROI) a été dessinée à l'aide d'une tablette graphique (Wacom Bamboo Pen and Touch, Wacom, Tokyo, Japan) pour éliminer les branchies et les autres tissus périphériques. La surface de cette première ROI a été considérée comme la surface totale de la masse viscérale. Enfin, une seconde ROI a été dessinée pour éliminer les cellules de la glande digestive. Les cellules gonadiques ont alors été sélectionnées par ajustement du seuil

de niveau de gris et la surface gonadique a été automatiquement calculée en pixels (Heffernan and Walker, 1989).

2.2.5. Marqueurs moléculaires et génotypage

Les grands-parents F0, les parents F1 ainsi que les 900 descendants F2 ont été génotypés pour 384 marqueurs SNPs (Annexe 8). Parmi ces marqueurs, 206 d'entre eux ont été développés chez *Crassostrea gigas* dans l'Article 1. Parmi ces 206 marqueurs, 35 sont des SNPs détectés in vitro dans des gènes exprimés dans la gonade lors d'expérimentations réalisées au Laboratoire de Physiologie des Mollusques à Brest afin d'identifier des marqueurs impliqués dans les mortalités estivales de naissain ; 1 a été détecté par assemblage d'EST fournis par GenBank (Bai et al., 2009) ; 170 SNPs ont été détectés in silico à partir du 6^{ème} assemblage de la base de données d'EST de *Crassostrea gigas* (http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html) (voir Article 1). Les 178 autres SNPs ont été choisis dans le 8^{ème} assemblage de la même base de données pour remplacer les SNPs qui avaient posé problème au cours du génotypage décrit dans l'Article 1. Ils ont été génotypés à l'aide de la technique GoldenGate d'Illumina sur la plateforme de génotypage de Bordeaux. Les données de génotypage ont été analysées via le module Génotypage du logiciel GenomeStudio développé par Illumina.

2.2.6. Cartographie génétique

Les génotypes ont été analysés à l'aide de la fonction de cartographie de régression du logiciel JoinMap 4.0 (Van Ooijen, 2006). Le type de population utilisé est le type CP (Cross Pollination). Un test χ^2 effectué par JoinMap a permis d'écarter les loci déviant significativement des lois mendéliennes ($\alpha \leq 0,0001$). Le LOD d'indépendance minimum a été fixé à 3.0 et les autres paramètres ont été laissés aux valeurs par défaut proposées par le logiciel. La longueur des cartes a été calculée selon la fonction de cartographie de Haldane.

2.2.7. Détection de QTL

La normalité des traits étudiés a été vérifiée statistiquement par un test de normalité de Shapiro-Wilk grâce au package RCommander (Fox, 2005) développé pour le programme R (R Development Core Team, 2005). Afin de prendre en compte le suivi temporel de l'indice

gonadique, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée à l'aide du package FactoMineR (Husson et al., 2008) développé pour le programme R (R Development Core Team, 2005). Les indices gonadiques de chaque mois ont été désignés comme variables actives tandis que les données de survie, le sexe, le volume intravalvaire, les indices de chair mensuels et les indices musculaires mensuels ont été désignés comme variables supplémentaires. La composante principale de l'ACP a été utilisée comme un phénotype pour la détection de QTLs. Le logiciel MapQTL 5.0 (Van Ooijen, 2004) a été utilisé pour détecter des régions du génome impliquées dans la gamétogenèse via le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis et la cartographie par intervalles. La part de variance expliquée par chaque QTL est calculée automatiquement par le logiciel selon la formule suivante : $100 * (H0_var - var) / \text{variance de la population}$ où $H0_var$ est la variance résiduelle. Les bornes de l'intervalle de confiance ont été définies par la valeur maximale du LOD à laquelle on soustrait 1 unité.

2.3. Résultats

2.3.1. Suivi de la gamétogenèse par IRM

Le phénotypage de la famille F2-18 au moyen de l'IRM a été décrit dans l'article 3. Les moyennes, écart-type, valeur minimale et maximale des traits sont résumés dans le Tableau 8.

Les tests de Shapiro-Wilk ont mis en évidence que seuls les indices gonadiques de mai 2011 (p-value = 0,59) et juin 2012 (p-value = 0,06) suivaient une distribution normale. Aux autres dates, la distribution ne suit pas une loi normale et la transformation en log₁₀ ne change rien.

Les coefficients de corrélation de Pearson ont révélé une forte corrélation entre le sexe des individus et le changement ou non de sexe (P = 0,96). L'indice gonadique à un instant t est également fortement corrélé à l'indice de chair à l'instant t : de 0,83 en octobre 2011 à 0,91 en juin 2011 (Tableau 8). De plus, l'indice gonadique maximal en 2011 est fortement corrélé à l'indice de chair en octobre 2011 (P = 0,83) et l'indice gonadique maximal en 2012 est fortement corrélé à l'indice de chair en avril 2012 (P = 0,86). En

revanche, l'indice gonadique n'est pas corrélé au sexe ($P < 0,20$) ni à l'indice musculaire ($P < 0,20$).

L'ACP a révélé que la composante principale expliquait 31,92% de la variation des indices gonadiques mensuels.

		Indice de chair								Statistiques descriptives			
		Avril 2011	Mai 2011	Juin 2011	Juillet 2011	Août 2011	Octobre 2011	Avril 2012	Juin 2012	Min.	Max.	μ	Ecart-Type
Indice gonadique	Avril 2011	0,85	0,39	0,19	0,33	0,13	0,14	0,06	0,07	0	64	30,6	11,2
	Mai 2011	0,29	0,87	0,24	0,36	0,25	0,13	0,13	0,08	0	66	36,9	12,2
	Juin 2011	0,18	0,31	0,91	0,61	0,17	0,03	0,05	-0,11	4	77	53,4	12,9
	Juillet 2011	0,26	0,29	0,42	0,86	0,3	0,25	0,05	-0,04	0	82	37,5	13,8
	Août 2011	0,19	0,21	0,17	0,22	0,84	0,29	0,18	0,06	0	43	14,3	7,6
	Octobre 2011	0,17	0,05	0,01	0,2	0,43	0,83	0,45	0,29	0	28	12,4	7,2
	Avril 2012	0,14	0,12	0,12	0,12	0,25	0,39	0,86	0,45	0	60	30,6	14,6
	Juin 2012	0,14	0,09	-0,08	0,02	0,04	0,23	0,43	0,88	0	54	21,8	12,0
	Maximal 2011	0,17	0,05	0	0,19	0,43	0,83	0,45	0,29	0	28	12,4	7,2
	Maximal 2012	0,14	0,12	0,12	0,12	0,25	0,39	0,86	0,45	0	60	30,6	14,6

Tableau 8. Coefficients de corrélation de Pearson entre l'indice de chair et l'indice gonadique estimés par IRM sur la famille F218 et statistiques descriptives de l'indice gonadique.

2.3.2. Suivi de la gamétogenèse par histologie

Seul le stade 3 (Normand et al., 2009) a été observé : les gonades étaient toutes à pleine maturité au 7 juin 2011. Les sex-ratio des familles F2-19 (77% de mâles, 22% de femelles) et F2-21 (55% de mâles, 44% de femelles) sont significativement différents ($\chi^2 = 10$; $p = 0,001$). La famille F2-19 présente un rapport gonado-somatique plus élevé ($\mu = 0,542 \pm 0,156$) que la famille F2-21 ($\mu = 0,477 \pm 0,139$).

Les tests de Shapiro-Wilk ont confirmé que les distributions des rapports gonado-somatiques des familles F2-19 et F2-21 suivaient une loi normale (respectivement p -value = 0,17 et p -value = 0,68).

2.3.3. Marqueurs moléculaires et génotypage

Sur les 384 marqueurs, certains ont été rejetés lors de l'observation graphique des profils fournis par GenomeStudio : 99 pour la famille F2-18, 97 pour la famille F2-19, 89 pour la famille F2-21. Le taux de succès de génotypage (nombre de marqueurs génotypés avec succès / nombre total de marqueurs) s'élève donc à 74,2% pour la famille F2-18, 74,7% pour la famille F2-19 et 76,8% pour la famille F2-21.

Ensuite, les SNPs monomorphes ont été écartés pour chaque famille : 190 pour la famille F2-18, 174 pour la famille F2-19, 176 pour la famille F2-21. En dépit du nombre de marqueurs de départ, seuls 95 SNPs ont été retenus pour la cartographie de la famille F2-18, 113 pour la famille F2-19 et 119 pour la famille F2-21. Le taux de conversion, défini par le nombre de marqueurs polymorphes / nombre total de marqueurs (Fan et al., 2003) s'élève donc à 24,7% pour la famille F2-18, 29,4% pour la famille F2-19 et 30,9% pour la famille F2-21.

2.3.4. Cartographie génétique

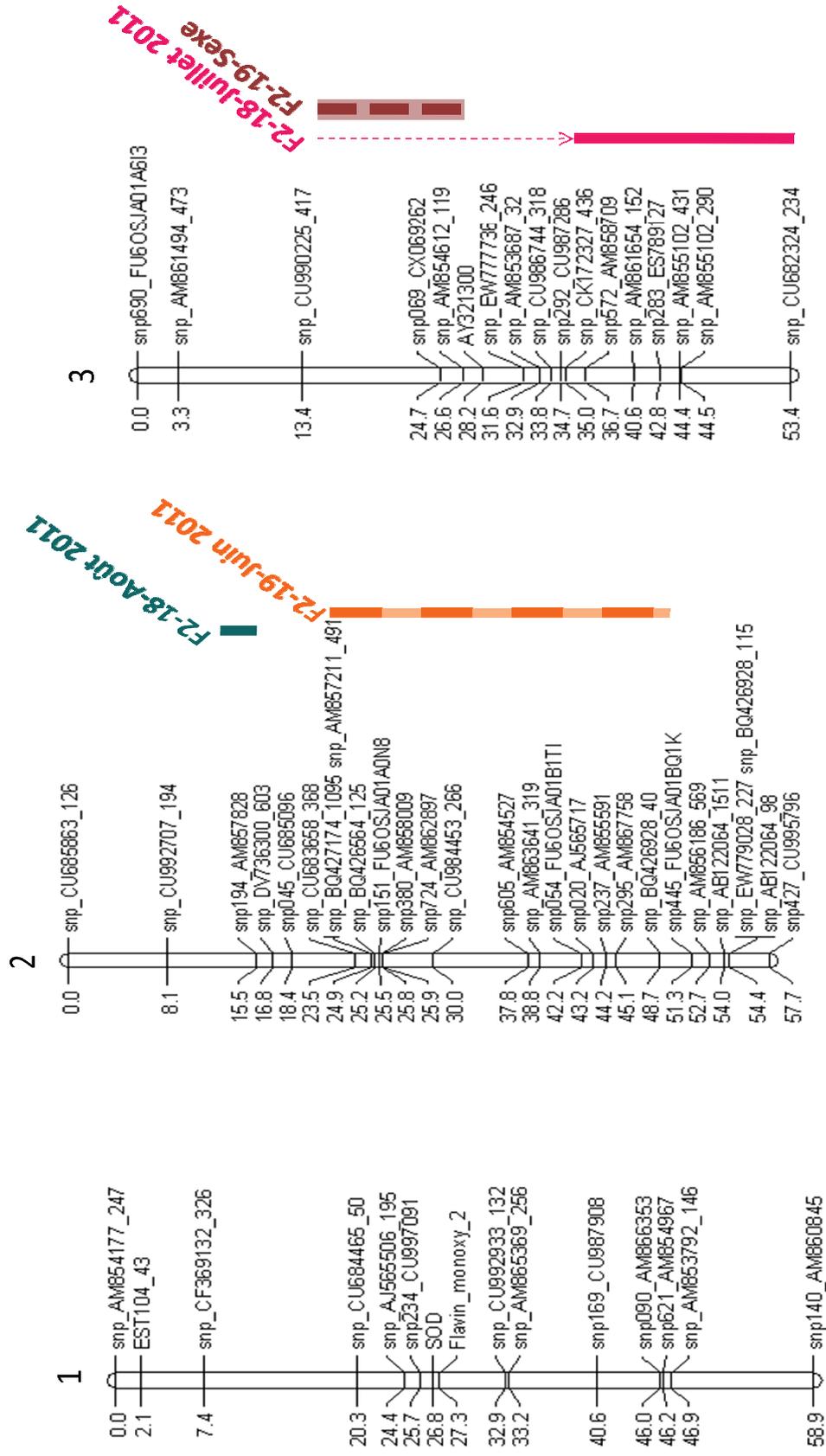
Parmi les 95 SNPs retenus pour la cartographie génétique de la famille F2-18, 2 ont été rejetés en raison de la distorsion de ségrégation. La carte génétique de la famille F2-18 est donc composée de 93 marqueurs et sa longueur totale est de 376,76 cM (Tableau 9 b). Parmi les 113 SNPs retenus pour la cartographie génétique de la famille F2-19, 5 ont été rejetés en raison de la distorsion de ségrégation. La carte génétique de la famille F2-19 est donc composée de 108 marqueurs et sa longueur totale est de 351,45 cM (Tableau 9 c). Parmi les 119 SNPs retenus pour la cartographie génétique de la famille F2-21, 10 ont été rejetés en raison de la distorsion de ségrégation. La carte génétique de la famille F2-21 est donc composée de 109 marqueurs et sa longueur totale est de 350,16 cM (Tableau 9 d). Pour la carte combinée des 3 familles F2, 189 SNPs ont été cartographiés sur 10 groupes de liaison dont la longueur totale est de 447,23 cM (Tableau 9a et Figure 40).

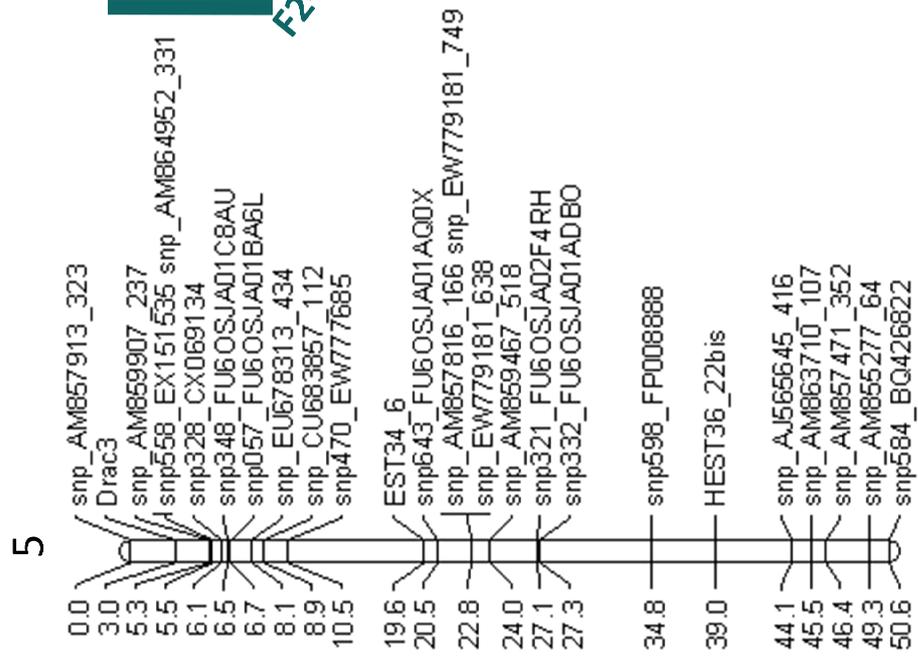
Pour les 4 cartes, les groupes de liaison ont été numérotés en fonction de leur longueur, du plus long au plus court.

	Groupe de liaison	Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Espaceur moyen entre les marqueurs (cM)	Groupe correspondant			
					F2-18	F2-19	F2-21	*
a	1a	15	58,92	4,21	7b	7c	1d	VI et VIII
	2a	27	57,67	2,22	3b	1c	8d	I et X
	3a	17	53,37	3,34	1b	2c	2d	IV
	4a	8	51,07	7,30	9b	8c	5d	VII
	5a	26	50,60	2,02	8b	3c	4d	II
	6a	35	50,39	1,48	5b	4c	6d	V
	7a	19	48,93	2,72	2b	6c	7d	VI
	8a	13	41,89	3,49	6b	9c	10d	III
	9a	26	33,27	1,33	4b	5c	3d	IX
	10a	3	1,14	0,57	10b	10c	9d	-
	Moyenne	18,9	44,72	2,87	-	-	-	-
	Total	189	447,23	-	-	-	-	-
b		Groupe de liaison	Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Espaceur moyen entre les marqueurs (cM)			
		1b	11	71,04	7,10			
		2b	11	62,06	6,21			
		3b	13	47,35	3,95			
		4b	8	46,29	6,61			
		5b	19	46,16	2,56			
		6b	8	41,93	5,99			
		7b	7	23,32	3,89			
		8b	7	19,00	3,17			
		9b	6	18,47	3,69			
	10b	3	1,14	0,57				
	Moyenne	9,3	37,68	4,37				
	Total	93	376,76	-				
c		Groupe de liaison	Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Espaceur moyen entre les marqueurs (cM)			
		1c	20	69,33	3,65			
		2c	9	56,63	7,08			
		3c	15	43,48	3,11			
		4c	21	43,45	2,17			
		5c	14	40,29	3,10			
		6c	9	33,09	4,14			
		7c	7	32,34	5,39			
		8c	6	23,49	4,70			
		9c	5	8,97	2,24			
	10c	2	0,38	0,38				
	Moyenne	10,8	35,14	3,60				
	Total	108	351,45	-				
d		Groupe de liaison	Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Espaceur moyen entre les marqueurs (cM)			
		1d	8	61,84	8,83			
		2d	14	53,18	4,09			
		3d	20	48,74	2,57			
		4d	17	48,60	3,04			
		5d	7	46,35	7,73			
		6d	20	37,81	1,99			
		7d	9	29,26	3,66			
		8d	7	12,10	2,02			
		9d	3	6,24	3,12			
	10d	4	6,04	2,01				
	Moyenne	10,9	35,02	3,90				
	Total	109	350,16	-				

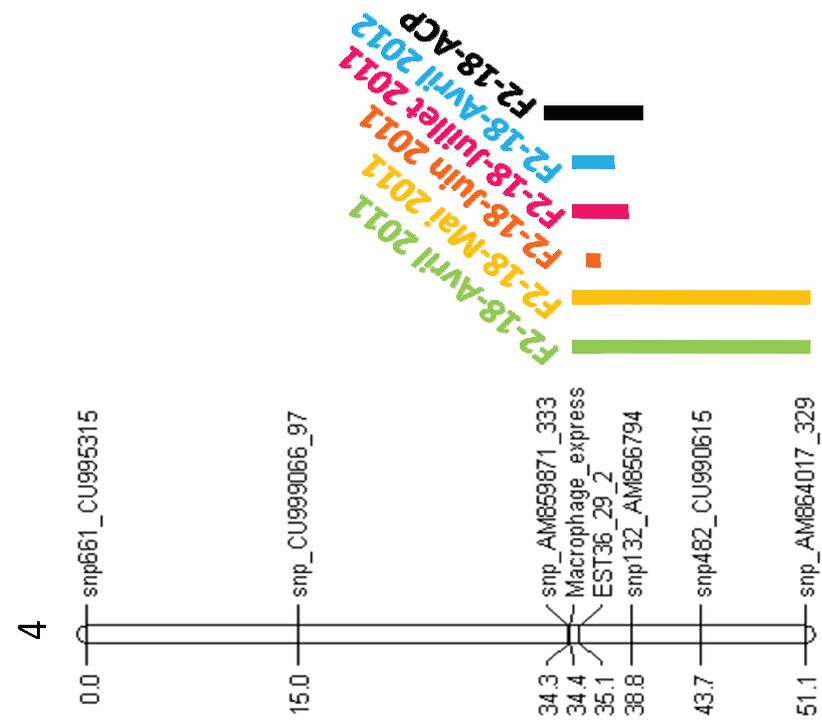
Tableau 9. Caractéristiques des cartes génétiques combinée (a) et des familles F2-18 (b), F2-19 (c) et F2-21 (d). Les groupes de liaison de la carte combinée sont reliés aux groupes correspondants sur les cartes de chaque famille et aux groupes correspondants sur les cartes précédemment publiées* (Hubert et Hedgecock, 2004 ; Sauvage et al., 2010) via les marqueurs communs. Les longueurs et les distances sont données en centiMorgans (cM).

Figure 40. Carte génétique combinée de *Crassostrea gigas*. Les QTLs détectés apparaissent sur la carte avec une couleur différente par trait et un motif par famille (F2-18 en trait plein, F2-19 en tirets et F2-21 en pointillés). Les distances sont exprimées en centiMorgans (cM).



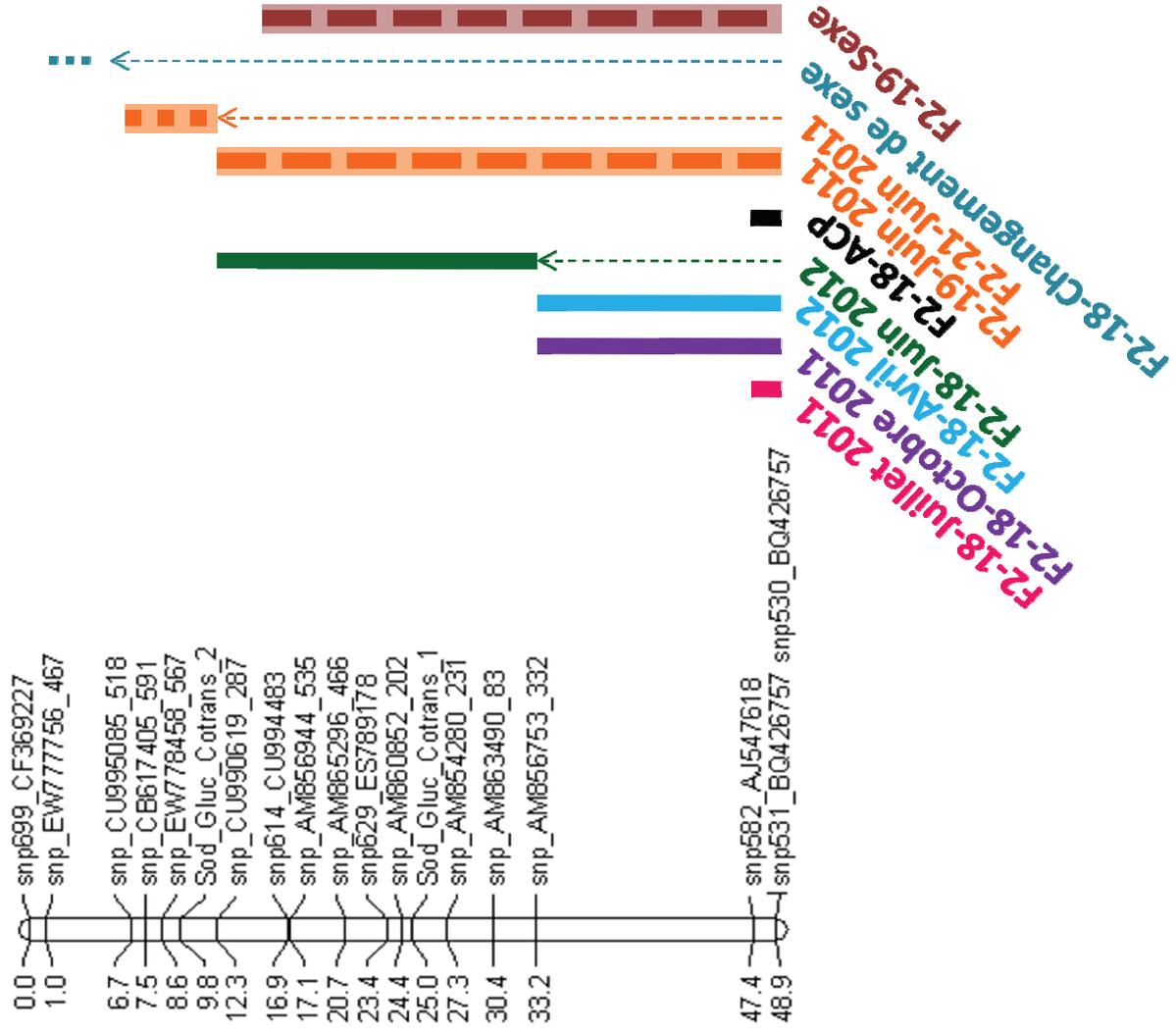


||| F2-18-Changement de sexe
 F2-18-Août 2011

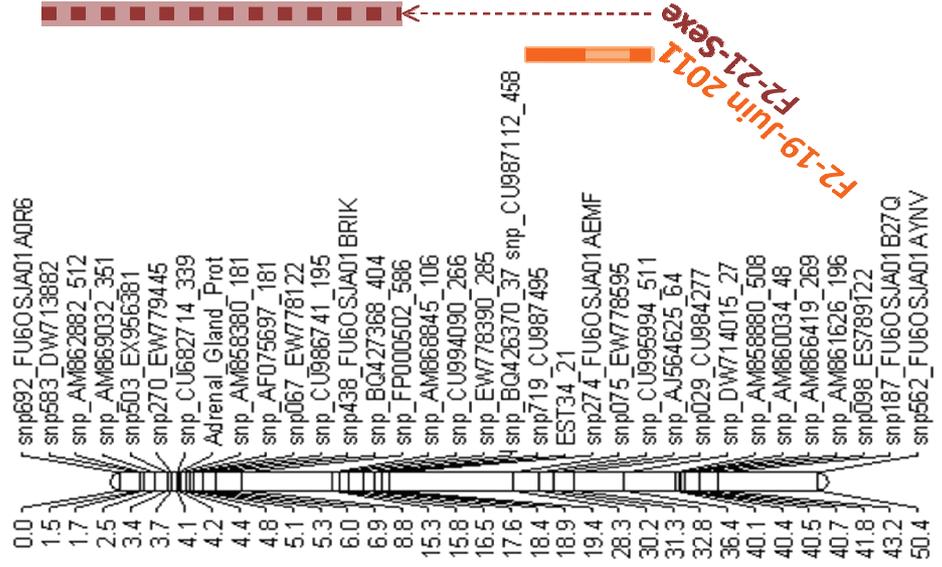


F2-18-Avril 2011
 F2-18-Mai 2011
 F2-18-Juin 2011
 F2-18-Juillet 2011
 F2-18-Avril 2012
 F2-18-ACP

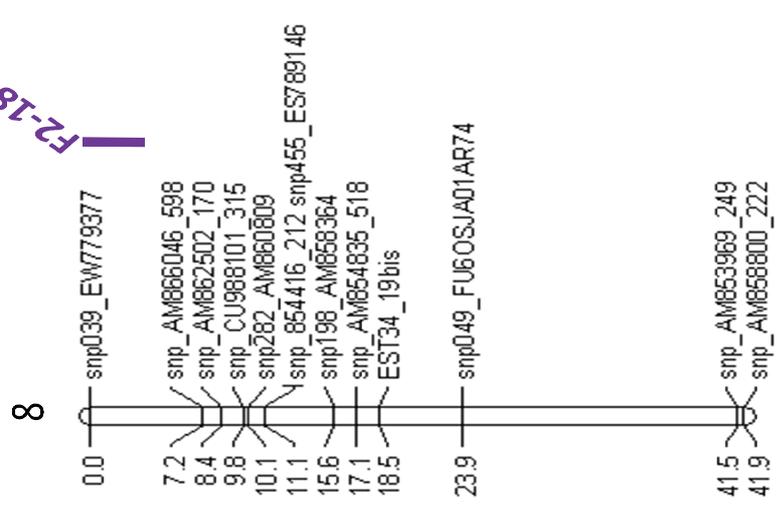
7



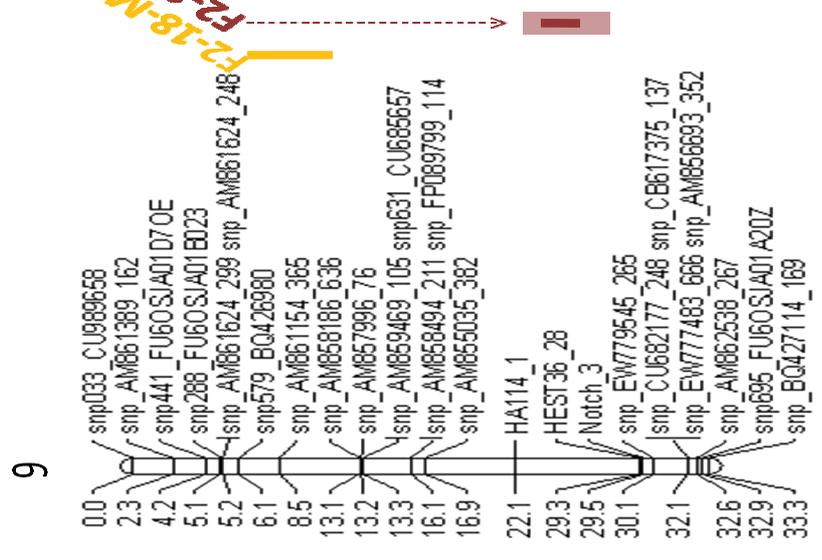
6



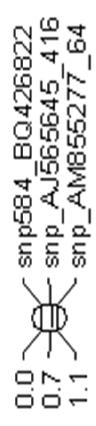
F2-18-Octobre 2011



F2-18-Mai 2011
F2-19-Sele



10



2.3.5. Détection de QTL

Les caractéristiques des QTLs détectés sont résumées dans le Tableau 10 et les QTLs sont localisés sur la carte génétique (Figure 40)

2.3.5.1. Indice gonadique

Pour les 3 familles, des QTLs ont été détectés pour l'indice gonadique en juin 2011. Un QTL a été détecté pour la famille F2-18 sur le GL 9b (Tableau 9b). Il explique 5,7% de la variance observée et a été confirmé par la présence d'un marqueur significatif au test de Kruskal-Wallis (EST_36_29_2 ; $P = 0,005$). Quatre QTLs ont également été détectés chez la famille F2-19 sur les GL1c (2 QTLs), GL4c et GL6c (Tableau 9c). Ils expliquent de 5,2 à 9,2% de la variance observée et ont tous été confirmés par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($0,05 < P < 0,0005$). Un QTL a été détecté chez la famille F2-21 sur le GL7d (Tableau 9d). Il explique 11,6% de la variance observée et le test de Kruskal-Wallis a mis en évidence des marqueurs significatifs ($P = 0,0005$).

Sur le GL2b (Tableau 9b), un QTL a été détecté pour l'indice gonadique en juillet et octobre 2011 ainsi qu'en avril et juin 2012. Il explique, selon les mois, de 11% en juillet 2011 à 23,2% en juin 2012 de la variance observée et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($0,005 < P < 0,0001$). Un QTL a également été détecté sur ce groupe de liaison pour la composante principale de l'ACP. Il explique 8,1% de la variance et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,0001$). Le GL2b ayant été associé aux GL6c et GL7d pour former le GL7a de la carte combinée (Tableau 9a), il existe un QTL commun aux 3 familles pour l'indice gonadique.

Sur le GL3b (Tableau 9b), un QTL a été détecté pour l'indice gonadique en août 2011. Il explique 10% de la variabilité observée et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,005$). Le GL3b (Tableau 9b) ayant été associé au GL1c pour former le GL2a sur la carte combinée (Tableau 9a), il existe un QTL commun aux familles F2-18 et F2-19 pour l'indice gonadique.

Sur le GL9b (Tableau 9b), un QTL a été détecté pour l'indice gonadique en avril, mai, juin et juillet 2011 ainsi qu'en avril 2012. Il explique, selon les mois de 5,7% en juin 2011 à 12,6% en mai 2011 de la variance observée et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($0,05 < P < 0,0001$). Un QTL a également été détecté sur ce groupe de liaison pour la composante principale de l'ACP. Il explique 11,2% de la variance et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,0001$).

Pour la famille F2-18, d'autres QTLs ont été détectés pour l'indice gonadique mais uniquement à une seule date :

- sur le GL4b en mai 2011 (variance expliquée = 10,8% ; $P = 0,005$),
- sur le GL1b en juillet 2011 (variance expliquée = 10,9% ; $P = 0,0005$),
- sur le GL8b en août 2011 (variance expliquée = 14,8% ; $P = 0,05$),
- sur le GL6b en octobre 2011 (variance expliquée = 10% ; $P = 0,01$).

2.3.5.2. Déterminisme du sexe

Pour la famille F2-18, aucun QTL n'a été détecté par la cartographie par intervalle malgré quelques marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis.

Pour la famille F2-19, trois QTLs ont été détectés pour le déterminisme du sexe. Sur le GL2c (Tableau 9c), un QTL explique 4,7% de la variance observée et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,01$). Sur le GL5c (Tableau 9c), un QTL explique 5,6% de la variance observée et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,005$). Sur le GL6c (Tableau 9c), un QTL explique 7,5% de la variance observée et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,0001$).

Pour la famille F2-21, des QTLs ont été détectés sur 2 groupes de liaison pour le déterminisme du sexe. Un LOD supérieur au LOD-seuil du groupe de liaison est observé sur tout le GL3d (Tableau 9d). Une cartographie MQM (Multiple-QTL Model) a révélé l'existence de 2 QTLs distincts expliquant respectivement 40,5% et 9,8% de variance sur ce groupe de liaison (Tableau 10). Sur le GL6d (Tableau 9d), un QTL expliquant 8,7% de la variance

observée a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis (P = 0,005).

2.3.5.3. Changement de sexe

Pour la famille F2-18, deux QTLs ont été détectés pour le changement de sexe. L'un est localisé sur le GL2b (Tableau 9b), explique 86,1% de la variance observée et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis (P = 0,005). L'autre est localisé sur le GL8b (Tableau 9b), explique 25,8% de la variance observée et a été confirmé par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis (P = 0,005).

Tableau 10. Résultats des recherches de QTLs impliqués dans la gamétogenèse de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les groupes de liaison (GL) des cartes des familles F2-18 (b), F2-19 (c) et F2-21 (d). Le LOD-seuil de chaque GL a été estimé par un test de permutations (1000 permutations, $\alpha = 0,05$), la position, le LOD maximal du QTL et la variance expliquée par le QTL ont été estimés par cartographie par intervalle et la significativité par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis (K et p-Value : ** = 0,05 ; *** = 0,01 ; **** = 0,005 ; ***** = 0,0005 ; ***** = 0,0001 ; ***** = 0,0001).

Trait	Famille	GL	LOD-seuil du GL	Position du QTL (cM)	Intervalle de confiance (cM)	Marqueurs flanquants	Marqueurs inclus	LOD maximal du QTL	Variance expliquée (%)	K	p-Value					
Indice gonadique avril 2011	F2-18	9b	2,1	0,000 - 18,471	3,000 - 18,471	snp_AM864017_329	snp482_CU990615, snp132_AM856794, EST36_29_2, snp_AM859871_333, Macrophage_express	4,47	7,3	20,01	*****					
							snp033_CU989658 - Notch_3					snp579_BQ426980, snp_AM858186_636	3,35	10,8	7,89	****
							snp482_CU990615					snp_AM864017_329				
Indice gonadique juin 2011					Voir page suivante											
Indice gonadique juillet 2011	F2-18	2b	2,5	0,000 - 6,765	0,000 - 4,765	snp_AM856753_332	snp531_BQ426757, snp582_AJ547618	3,85	11,0	15,82	*****					
							snp132_AM856794, EST36_29_2, snp_AM859871_333, Macrophage_express					3,09	8,3	9,79	****	
							snp_CU682324_234, snp_AM855102_290, snp_AM861654_152, snp572_AM858709, snp_CK172327_436									3,86
1b	2,8	0,000 - 14,863	0,000 - 14,863	snp292_CU987286												

Trait	Famille	GL	LOD-seuil du GL	Position du QTL (cM)	Intervalle de confiance (cM)	Marqueurs flanquants	Marqueurs inclus	LOD maximal du QTL	Variance expliquée (%)	K	p-Value	
Indice gonadique juin 2011	F2-18	9b	2,1	13,716 - 18,471	13,716 - 18,471	snp132_AM856794 -	EST36_29_2, snp_AM859871_333, Macrophage_express	2,27	5,7	9,24	****	
	F2-19	1c	2,5	26,435 - 58,401	31,405 - 57,246	snp_CU683658_368 - snp_AM856186_569	snp_AM857211_491, snp380_AM858009, snp151_FU60SJA01A0N8, snp605_AM854527, snp054_FU60SJA01B1TI, snp445_FU60SJA01BQ1K	4,23	9,1	13,59	*****	
							snp_AB122064_1511 - snp_CU995994_511 - snp719_CU987495	snp427_CU995796	2,67	5,2	9,42	****
	F2-21	6c	2,4	0,000 - 12,480	0,000 - 12,480	snp629_ES789178	snp_AM860852_202, snp_AM856944_535, snp614_CU994483, Sod_Gluc_Cotrans_1	2,92	7,9	7,47	**	
								snp_BQ426928_40 - snp699_CF369227	snp_CU990619_287, snp_CB617405_591, snp_CU995085_518, snp_EW778458_567, Sod_Gluc_Cotrans_2	2,74	6,1	10,64
	Indice gonadique août 2011	F2-18	3b	2,5	0,000 - 7,444	0,000 - 6,444	snp380_AM858009	snp_DV736300_603, snp194_AM857828	3,69	10,0	13,50	****
			8b	2,2	1,364 - 19,002	1,364 - 19,002	Drac3-	snp_AM859907_237, snp_AM864952_331, snp328_CX069134, snp348_FU60SJA01C8AU, snp_EU678313_434	2,82	14,8	4,359	**

Trait	Famille	GL	LOD-seuil du GL	Position du QTL (cM)	Intervalle de confiance (cM)	Marqueurs flanquants	Marqueurs inclus	LOD maximal du QTL	Variance expliquée (%)	K	p-Value
Indice gonadique octobre 2011	F2-18	2b	2,6	0,000 - 14,765	0,000 - 12,765	snp_AM856753_332	snp531_BQ426757, snp582_AJ547618	4,09	12,5	19,17	*****
		6b	2,3	39,694 - 41,932	39,694 - 41,932	snp_AM866046_598 -	snp039_EW779377	2,40	10,0	6,71	***
Indice gonadique avril 2012	F2-18	2b	2,7	0,000 - 13,765	1,000 - 12,765	snp531_BQ426757 - snp_AM856753_332	snp582_AJ547618	3,80	15,4	14,28	*****
		9b	2,3	17,061 - 18,471	17,061 - 18,471	EST36_29_2	snp_AM859871_333, Macrophage_express	2,41	7,9	7,25	**
Indice gonadique juin 2012	F2-18	2b	2,5	5,765 - 18,903	5,765 - 18,903	snp582_AJ547618 - snp_CU990619_287	snp_AM856753_332	3,02	23,2	10,82	****
		2b	2,5	0,000 - 13,765	0,000 - 8,765	snp_AM856753_332	snp531_BQ426757, snp582_AJ547618	4,72	8,1	20,85	*****
ACP	F2-18	9b	2,2	0,000 - 18,471	9,329 - 18,471	snp482_CU990615 -	snp132_AM856794, EST36_29_2, snp_AM859871_333, Macrophage_express	6,97	11,2	27,71	*****

Trait	Famille	GL	LOD-seuil du GL	Position du QTL (cM)	Intervalle de confiance (cM)	Marqueurs flanquants	Marqueurs inclus	LOD maximal du QTL	Variance expliquée (%)	K	p-Value
Changement de sexe	F2-18	2b	11,7	56,272 - 62,056	57,272 - 62,056	Sod_Gluc_Cotrans_1	snp_EW777756_467	13,12	75,2	10,79	****
		8b	2,1	0,000 - 19,002	0,000 - 15,364	snp_AM859907_237	snp_AM857913_323, Drac3	4,53	24,8	12,60	****
		2c	2,4	29,992 - 31,829	29,992 - 31,829	snp_CU990225_417 - snp_AM853687_32	snp_AM854612_119	2,45	4,7	10,50	***
		5c	2,3	28,201 - 39,667	28,201 - 39,667	snp_FP089799_114 - snp_AM856693_352	Notch3, HEST 36-28	3,03	5,6	11,93	****
		6c	2,3	0,000 - 33,092	0,000 - 33,092	-	snp_AM860852_202, snp_AM856944_535, snp614_CU994483, Sod_Gluc_Cotrans_1, snp629_ES789178, - snp_AM856753_332, snp582_AJ547618, snp531_BQ426757, snp530_BQ426757	3,49	7,5	15,73	*****
Sexe	F2-21	3d	2,5	0,000 - 61,838	16,000 - 24,000	-	snp_AM853792_146, snp_AM854177_247, EST104_43, snp_CF369132_326, - snp_CU684465_50, snp_AJ565506_195, SOD, Flavin_monoxy_2	92,77	97,8	10,56	***
		3d MQM	2,5	8,000 - 33,000	19,000 - 23,000	snp_AM853792_146 - snp_AM854177_247	-	71,82	40,5	10,56	***
		3d MQM	2,5	54,888 - 57,928	54,888 - 56,928	snp_CF369132_326 - snp_AJ565506_195	snp_CU684465_50	4,01	9,8	35,07	*****
		6d	2,5	31,565 - 34,070	31,565 - 34,070	snp_BQ427368_404 - snp_CU682714_339	snp_CU986741_195, snp_FP000502_586, snp503_EX956381, snp270_EW779445, snp583_DW713882, snp_AM869032_351, snp438_FU60SJA01BRIK	3,05	8	10,10	****

2.4. Discussion

Cette étude a permis de génotyper un grand nombre de nouveaux marqueurs SNPs. Le remplacement des SNPs dont le génotypage n'avait pas été satisfaisant lors de notre première expérience (Article 1) par de nouveaux SNPs a permis d'améliorer le succès de génotypage moyen à 75,2% (70,3% dans l'Article 1). Cependant, malgré les 384 SNPs génotypés, peu d'entre eux ont pu être cartographiés. En effet, beaucoup de marqueurs étaient monomorphes au sein des 3 familles étudiées et le taux de conversion moyen des marqueurs ne s'est élevé qu'à 28,3%. Néanmoins, sachant que les marqueurs n'ont pas été choisis pour leur polymorphisme connu chez les parents de nos familles, ce taux de conversion est supérieur aux 12,5 à 19,5% estimés chez des familles F2 de pin maritime or (Chancerel et al., 2011) ou aux 12,3 à 18,4% estimés chez le pin à sucre (Jermstad et al., 2011). Choisir uniquement des marqueurs polymorphes chez les parents a permis d'atteindre un taux de conversion de 86% chez la courge, *Cucurbita pepo* (Esteras et al., 2012). D'autres marqueurs s'écartaient fortement des lois mendéliennes. Cette importante distorsion de ségrégation est bien connue chez *Crassostrea gigas* (Launey et Hedgecock, 2001) et peut être expliquée par les fortes mortalités qui peuvent entraîner la perte de 98% des individus au stade larvaire (Plough et Hedgecock, 2011). Les pratiques d'écloserie, notamment le tamisage sélectif qui vise à éliminer les larves dont la croissance est moins rapide, est également une explication possible de la faible diversité génétique rencontrée au sein de nos familles (Taris, 2005). Néanmoins, la densité de la carte génétique de l'huître creuse a pu être améliorée : au cours de cette étude, nous avons établi une carte génétique composée de 189 marqueurs SNPs tandis que Sauvage et al. (2010) avaient publié une carte génétique composée de 80 marqueurs dont 51 marqueurs microsatellites et 21 marqueurs SNPs. Grâce à ce nombre de marqueurs, la carte génétique couvre désormais 88,63% de la longueur théorique du génome contre 76,43% précédemment. Elle est composée de 10 groupes de liaison, ce qui est en accord avec le nombre de chromosomes haploïdes ($n=10$). Plus récemment, une carte génétique a été établie à partir de 426 marqueurs dont 64 g-SSRs, 42 EST-SSRs et 320 AFLPs (Guo et al., 2012). L'utilisation des techniques de la Nouvelle Génération de Séquençage permettra prochainement d'améliorer davantage la densité de la carte génétique présentée par l'ajout de marqueurs de type RAD (Restriction site Associated

DNA). Le séquençage récent du génome complet de l'huître creuse (Zhang et al., 2012) permettra d'accroître encore le nombre de marqueurs disponibles et de combiner des cartes physiques aux cartes génétiques.

Au cours de cette étude, des QTLs ont été mis en évidence pour l'ensemble des traits étudiés. Pour l'indice gonadique en juin 2011 et pour le sexe, des QTLs communs à plusieurs familles ont été détectés. Des QTLs ont également été détectés pour les indices gonadiques de plusieurs mois. Cela peut s'expliquer par la corrélation existant entre l'indice gonadique à un instant t et l'indice gonadique à l'instant $t-1$. Pour les autres traits, les QTLs n'ont pu être détectés que pour une famille et seraient donc à confirmer avec du matériel biologique différent. Parmi les 35 SNPs détectés *in vitro* dans des gènes exprimés dans la gonade, 10 ont été associés significativement à la variation des traits étudiés (Figure 40). Il serait intéressant d'étudier plus finement les régions où ces marqueurs sont localisés.

L'une des familles étudiées par Sauvage et al., 2010 ayant été génotypées pour certains des marqueurs SNPs utilisés dans cette étude, nous avons pu comparer les groupes de liaison de leur carte avec la nôtre (Tableau 9a). Il est alors apparu que les QTLs détectés pour l'effort reproducteur au cours de notre étude se trouvaient sur les groupes de liaison homologues à ceux sur lesquels Sauvage et al. (2010) avaient détecté des QTLs impliqués dans la survie aux mortalités estivales. La corrélation phénotypique entre effort reproducteur et réponse aux mortalités estivales (Samain et al., 2007 ; Huvet et al., 2010) se retrouve donc au niveau génétique. Cependant, il n'est pas à ce jour pas possible de conclure à une association génétique réelle et il serait intéressant de comparer la localisation des QTLs détectés au cours de cette étude à la localisation des gènes candidats différenciellement exprimés dans la gonade des individus dits « résistants » et des individus dits « sensibles » (Fleury et al., 2010).

Enfin, une exploration fonctionnelle des gènes candidats permettrait de démontrer l'implication de ces gènes dans le processus de la gamétogenèse. L'une des méthodes les plus efficaces est la création de lignées d'individus pour lesquelles le gène d'intérêt est inhibé. L'absence de lignées mutantes pour l'huître creuse ne permettant pas ce type

d'étude, la technique d'interférence par ARN est une alternative puissante (Fabioux et al., 2009).

2.5. Remerciements

Ce travail a été soutenu par Ifremer et financé partiellement par l'Agence National de la Recherche « Génomique animale » Programme (GAMETOGENEs project - ANR-08-GENM-041). Les auteurs remercient l'ensemble des membres de l'écloserie Ifremer de La Tremblade et de la nurserie de Bouin pour la production et l'élevage des huîtres, Christophe Klopp et Cédric Cabau pour les données d'assemblage d'ESTs ainsi qu'Armel Davenel et Stéphane Quellec pour l'exploitation des données IRM.

2.6. Références

- Bai, J., Li, Q., Kong, L.F., Li, R.H., 2009. Characterization of 20 single nucleotide polymorphism markers in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics*, 40, 1001-1005.
- Bodoy A, Garnier, J., Razet, D., Geairon, P., 1990. Mass mortalities of oysters (*Crassostrea gigas*) during spring 1988 in the bay of Marennes-Oléron, related to environmental conditions. *Conseil International pour l'Exploration de la mer*.
- Chancerel, E., Lepoittevin, C., Le Provost, G. et al., 2011. Development and implementation of a highly-multiplexed SNP array for genetic mapping in maritime pine and comparative mapping with loblolly pine. *BMC Genomics*, 12, 368.
- Enriquez-Diaz, M., 2004. Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Océanologie Biologique*. Brest, Université de Bretagne Occidentale. PhD. 216p.
- Esteras, C., Gomez, P., Monforte, A.J. et al. , 2012. High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait loci mapping. *BMC Genomics*, 13, 80.
- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E., Boudry, P., 2007. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture*, 262, 41-53.
- Dégremont, L., Bédier, E., Boudry, P., 2009. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture*, 299 (1-4), 21-29.

- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250, 458-470.
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., Huvet, A., 2009. In vivo RNA interference in oyster: vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, 276, 2566–2573.
- Fan, J.B., Oliphant, A., Shen, R. et al., 2003. Highly parallel genotyping. *Cold Spring Harbor symposia on Quantitative Biology*, 68, 69-78.
- FAO, 2013. Aquaculture production: quantities and values 1950–2011. Published electronically on the internet, available directly from <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>
- Flahauw, E., Quellec, S., Davenel, A., Dégremont, L., Lapègue, S., Hatt, P.-J., 2012. Gonad volume assessment in the oyster *Crassostrea gigas*: Comparison between a histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method. *Aquaculture*. 370–371, 84–89.
- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., Huvet, A. (2010). Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific Oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Mar. Biotechnol.*, 12, 326-339.
- Fox, J., 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*, 14(9): 1-42.
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolution*. 52 (2), 394-402.
- Guo, X., Li, Q., Wang, Q.Z., Kong, L.F. , 2012. Genetic Mapping and QTL Analysis of Growth-Related Traits in the Pacific Oyster. *Marine Biotechnology*, 14, 218–226.
- Haley, L.E., 1977. Sex determination in the American oyster. *J. Hered.*, 68, 114-116.
- Hedrick, P.W., Hedgecock, D., 2010. Sex determination: genetic models for oysters. *J. Hered.* 101 (5), 602–611.
- Heffernan, P.B., Walker, R.L., 1989. Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *Journal of Molluscan Studies* 55, 135-137.
- Husson, F., Josse, J., Lê, S., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18.

- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: a trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture*, 304, 95–99.
- Jermstad, K.D., Eckert, A.J., Wegrzyn, J.L. et al., 2011. Comparative mapping in pinus: sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.) and loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and Genomes*, 7, 457-468.
- Koganezawa, A., 1974. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. Third United States – Japan Meeting on Aquaculture Journal, 29–34.
- Launey, S., Hedgecock, D., 2001. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 159, 255–265.
- Maurer, D., Comps, M., His, E., 1986. Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis*, 15, 309-317.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Paris.
- Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., Boudry, P., 2009. Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquatic Biol.* 7, 229–241.
- Pernet, F., Barret, J., Marty, C., Moal, J., Le Gall, P., Boudry, P., 2010. Environmental anomalies, energetic reserves and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 401, 129–146.
- Plough, L.V., Hedgecock, D., 2011. Quantitative Trait Locus Analysis of Stage-Specific Inbreeding Depression in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 189, 1473–1486.
- R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
- Samain, J.-F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., VanWormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Géret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. *Aquaculture*. 268, 227–243.

- Samain, J.F., McCombie, H., 2008. Summer mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. The MOREST Project, Quae Editions, Versailles, 379p.
- 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, 390-399.
- Shaw, B.L., Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* 35, 325–347.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P., 1999. Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Etude de la variabilité spatiale, de son environnement et de sa biologie par un système d'information géographique (SIG). *Aquatic Living Resources*, 12, 131–43.
- Steele, S., Mulcahy, M.F., 1999. Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*, 79, 673-686.
- Taris, N., 2005. Conséquences génétiques de la production intensive de larves d'huîtres en éclosure: Etude des processus de dérive et de sélection liés aux pratiques d'élevage. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, 205 pp.
- Van Ooijen, J.W., 2006. JoinMap®4: Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps in Experimental Populations. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands.
- Van Ooijen, J.W., 2004. MapQTL®5: Software for the Mapping of Quantitative Trait Loci in Experimental Populations of Diploid Species. Kyazma B.V., Wageningen.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Los, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P. M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y, Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C. E. W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490 (7418), 49-54.

PARTIE IV : CONTRIBUTIONS DE CETTE ETUDE A LA CARACTERISATION GENETIQUE DE LA REPOSE AUX MORTALITES ESTIVALES

1. Préambule

Cette partie est rédigée en Français mais sous la forme d'un article. Elle sera intégrée à un article concernant la caractérisation génétique de la réponse aux mortalités estivales via une méthode récente de cartographie fine par RAD (Restriction site Associated DNA) sequencing qui a été utilisée pour les familles F2-19 et F2-21. En conséquence, chaque partie sera complétée ultérieurement. Ce travail contribuera en particulier à faire le lien entre les différentes cartes génétiques avec une confiance importante car de nombreux individus ont été génotypés dans le cadre de ce travail, contrairement au génotypage avec la technique RAD sequencing qui a du être restreint à un nombre moins important d'individus.

2. Article 5 : Détection de QTL de réponse aux mortalités estivales chez l'huître creuse, Crassostrea gigas.

P.-A. Gagnaire, E. Flahauw, L. Dégremont, S. Heurtebise, F. Cornette, B. Pontreau, C. Donnadiou, F. Martins, N. Bierne, S. Lapègue

Cette étude étant un travail d'équipe, il est important de préciser les tâches que j'ai effectuées, seule ou accompagnée par les coauteurs :

- *La production, l'élevage, le conditionnement des huîtres,*
- *Le suivi de mortalité,*
- *La détection des marqueurs SNPs in silico,*
- *Les prélèvements et pesées de tissus en vue de l'extraction d'ADN,*
- *L'extraction et la préparation de l'ADN en vue du génotypage,*
- *Le génotypage des marqueurs microsatellites en multiplexe,*
- *L'analyse des données de génotypage,*
- *La cartographie génétique,*
- *La détection de QTLs.*

2.1. Introduction

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est une espèce d'intérêt économique au niveau mondial. En 2011, 4,4 millions de tonnes ont été produites (FAO, 2013). Cependant, sur les côtes françaises, les juvéniles d'huîtres creuses subissent d'importantes mortalités estivales

depuis 2008 (Pernet et al., 2010) et les conséquences sur la production nationale sont d'ores et déjà perceptibles : jusqu'en 2009, la France produisait environ 130 000 tonnes d'huîtres par an tandis qu'en 2010 et 2011, la production n'a pas dépassé les 80 000 tonnes (Comité National de la Conchyliculture, <http://www.cnc-france.com>). Le phénomène des mortalités estivales d'huîtres creuses est connu depuis 1945 sur les côtes japonaises (Koganezawa, 1974), depuis 1980 sur les côtes françaises (Maurer et al. 1986; Bodoy et al. 1990; Soletchnik et al. 1999) et a été particulièrement étudié durant le projet MOREST (Samain et McCombie, 2008). Une forte héritabilité de la réponse aux mortalités estivales a notamment été mise en évidence (Dégrement et al., 2007) et a servi de base à la sélection de lignées « résistantes » (R) et de lignées « sensibles » (S) aux mortalités estivales (Dégrement et al, 2009).

La caractérisation génétique de traits complexes tels que la résistance aux maladies représente un intérêt pour le domaine de la recherche mais également pour la filière aquacole. La détection de QTLs peut servir de base à la sélection d'allèles de résistance aux maladies (Elsen, 2011). Cette approche est utilisée pour détecter des régions du génome impliquées dans la résistance aux maladies qui perturbent la production aquacole de nombreuses espèces aquacoles telles que la Truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* (Verrier et al., 2013) , le Saumon Atlantique, *Salmo salar* (Moen et al, 2009) ou l'huître creuse *Crassostrea virginica* (Yu et Guo, 2006). Des QTLs impliqués dans la réponse aux mortalités estivales et la charge virale en Ostreid Herpes Virus 1 (OshV-1), un pathogène associé aux mortalités estivales d'huîtres creuses (Dégrement, 2011; Garcia et al., 2011), ont également été détectées par Sauvage et al. (2010).

L'objectif de cette étude était de vérifier si les régions détectées par Sauvage et al. (2010) étaient également détectées sur un matériel biologique différent et dans le contexte des mortalités massives subies par *Crassostrea gigas* depuis 2008. Pour cela, nous avons augmenté la densité de la carte génétique via l'utilisation de nouveaux marqueurs SNPs afin de détecter plus finement des QTLs impliqués dans la réponse aux mortalités estivales et la charge virale en OshV-1.

2.2. Matériel et Méthodes

2.2.1. Matériel biologique

Les huîtres utilisées pour le suivi de la mortalité appartiennent à 21 familles biparentales de type F2, parmi lesquelles trois familles, nommées F2-18, F2-19 et F2-21, ont été choisies pour détecter les QTLs. Pour produire ces familles, des individus aux performances contrastées en termes de survie aux mortalités estivales issus de la sélection menée au cours du programme MOREST (Dégremont et al, 2009) ont été utilisés comme génération F0. Une femelle F0 « sensible » a été croisée avec un mâle F0 « résistant » pour produire une famille F1 au sein de laquelle 2 mâles et 2 femelle ont été choisis pour obtenir les familles F2-18 et F2-19. De la même façon, une femelle F0 « résistante » a été croisée avec un mâle F0 « sensible » pour produire une famille F1 au sein de laquelle 1 mâle et 1 femelle ont été choisis pour obtenir la famille F2-21 (Figure 39).

Pour chaque croisement et afin de contrôler les fécondations, les gamètes ont été récupérés par scarification des gonades. L'élevage larvaire et le micro-nursage ont été effectués à l'écloserie Ifremer de La Tremblade (Charente maritime, France). Puis, les huîtres ont été transférées à la nurserie Ifremer de Bouin (Vendée, France) pour le nursage jusqu'au 28 juillet 2010. Pour chacune des 21 familles F2, 450 huîtres ont été réparties en 3 poches de 150 et placées sur des tables ostréicoles sur l'estran à Agnas (Bassin de Marennes-Oléron, Charente maritime, France) le 29 juillet 2010. Parallèlement, pour 12 familles choisies sur leurs performances aux tests de survie menés préalablement (voir Partie I), 1000 individus ont été répartis en 2 poches de 500 et placés dans un bassin de la station Ifremer de La Tremblade (Charente maritime, France) afin d'y avoir accès quotidiennement. Ce bassin était alimenté en eau de mer brute (non traitée, non chauffée, sans ajout de phytoplancton) afin de s'approcher au plus près des conditions extérieures.

2.2.2. Suivi de la mortalité au cours d'un épisode de mortalité estivale

2.2.2.1. Suivi ponctuel en milieu naturel

Le 26 août, les poches placées sur estran ont été ramenées à la station de La Tremblade pour procéder au comptage des individus morts et survivants à l'épisode de mortalité.

2.2.2.2. Suivi quotidien en bassin expérimental

Chaque jour, les poches placées dans le bassin expérimental ont fait l'objet d'une observation minutieuse permettant de détecter les individus morts ou moribonds. En effet, la suite du travail s'effectuant sur l'ADN, il était impératif que les tissus ne soient pas trop dégradés. Les huîtres mortes ou moribondes ont donc été stockées à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN. Le 23 août 2010, l'épisode de mortalité semblant terminé, nous avons procédé au comptage des individus ayant survécu ; lorsque c'était possible, 200 d'entre eux ont également été stockés à -20°C en attendant l'extraction d'ADN à l'aide du kit d'extraction QiaAMP DNA MiniKit de Qiagen (voir protocole détaillé en annexe 1).

2.2.3. Mesure de la charge virale par PCR quantitative

La détection et la quantification du virus OsHV-1 a été réalisée par la méthode de PCR en temps réel développée par Pépin et al. (2008). En résumé, $5\mu\text{L}$ d'ADN dilué à $5\text{ ng}/\mu\text{L}$ pour les individus morts et $0,5\text{ ng}/\mu\text{L}$ pour les individus survivants ont été ajoutés au mélange réactionnel composé de $10\mu\text{L}$ de Mastermix 2X du kit Brilliant III Ultra fast avec SYBR Green, $2\mu\text{L}$ de chaque amorce C9 et C10 (Renault et al., 2012) diluées à 2mM et $1\mu\text{L}$ d'eau bi-distillée. Une gamme de 10 à 100000 copies d'OsHV-1 a été déposée sur chaque plaque pour quantifier le nombre de copies d'ADN viral présent dans chaque échantillon. Pour chaque individu, 2 répliquats ont été quantifiés. La PCR a consisté en un cycle de dénaturation à 95°C , pendant 3 minutes puis quarante cycles d'hybridation/élongation alternant une phase à 95°C pendant 5 secondes et une phase à 60°C pendant 20 secondes et, pour terminer, un cycle composé d'une phase d'1 minute à 95°C , une phase de 30 secondes à 60°C et une phase de 30 secondes à 95°C .

2.2.4. Marqueurs moléculaires et génotypage sélectif

Les grands-parents F0, les parents F1 ainsi que 900 descendants F2 ont été génotypés pour les 384 marqueurs SNPs développés chez *Crassostrea gigas* (Article 1). Ces 900 descendants ont fait l'objet d'une stratégie de génotypage sélectif : pour chacune des 3 familles F2, 300 individus ont été génotypés dont 150 morts au cours de l'épisode de mortalité estivale et 150 survivants à la fin de cet épisode. Parmi les 384 marqueurs, 72 sont

des SNPs détectés in vitro dans des gènes exprimés dans la gonade par le Laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade ; 5 ont été détectés par assemblage d'EST fournis par GenBank (Bai et al., 2009) ; 307 SNPs ont été détectés in silico à partir du 6^{ème} assemblage de la base de données d'EST de *Crassostrea gigas* (http://public-contigbrowser.sigenae.org:9090/Crassostrea_gigas/index.html). Ils ont été génotypés à l'aide de la technique GoldenGate d'Illumina sur la plateforme de génotypage de Bordeaux. Les données de génotypage ont été analysées via le module Génotypage du logiciel GenomeStudio développé par Illumina.

Afin d'augmenter la densité de la carte génétique et de pouvoir la comparer avec les cartes génétiques précédemment publiées par Hubert et Hedgecock (2004) et Sauvage et al. (2010), les individus ont également été génotypés pour 42 marqueurs microsatellites dont 27 ont été génotypés en simplexe (Li et al., 2003 ; Yamtich et al., 2005 ; Sauvage et al. 2010, Partie I Tableau 5) et 15 en multiplexes de 3 marqueurs (Li et al., 2010 ; Taris et al., 2005, Partie I Tableau 4).

2.2.5. Cartographie génétique

Les génotypes ont été analysés à l'aide de la fonction de cartographie de régression du logiciel JoinMap 4.0 (Van Ooijen, 2006). Le type de population utilisé est le type CP (Cross Pollination). Un test χ^2 effectué par JoinMap a permis d'écarter les loci déviant significativement des lois mendéliennes ($\alpha \leq 0,0001$). Le LOD d'indépendance minimum a été fixé à 3.0 et les autres paramètres ont été laissés aux valeurs par défaut proposées par le logiciel. La longueur des cartes a été calculée selon la fonction de cartographie de Haldane.

2.2.6. Détection de QTL

La normalité des traits étudiés a été vérifiée statistiquement par un test de normalité de Shapiro-Wilk grâce au package RCommander (Fox, 2005) développé pour le programme R (R Development Core Team, 2005). Le logiciel MapQTL 5.0 (Van Ooijen, 2004) a été utilisé pour détecter des régions du génome impliquées dans la réponse aux mortalités estivales via le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis et la cartographie par intervalles. La part de variance expliquée par chaque QTL est calculée automatiquement par le logiciel selon la

formule suivante : $100 * (H0_var - var) / \text{variance de la population}$ où H0 var est la variance résiduelle.

2.3. Résultats

2.3.1. Suivi de la mortalité

2.3.1.1. En bassin expérimental

Les mortalités ont commencé le 3 août 2010, soit 5 jours après la mise en bassin expérimental. Le nombre d'individus morts a augmenté lentement pendant les 3 jours qui ont suivi. Puis, le 8 août, la plupart des 12 familles ont connu un pic de mortalité (Figure 41). Au 23 août 2010, le comptage des individus survivants s'est ajouté au comptage quotidien des individus morts ou moribonds afin de déterminer le taux de mortalité de chaque famille F2. Celui-ci s'est avéré très variable d'une famille F2 à l'autre. En effet, celui-ci était compris entre 26% pour la famille 15 et 95% pour la famille 20 (Figure 42). Pour la suite des analyses génétiques (génotypage des marqueurs moléculaires et recherche de QTLs), seules les familles F2-18, F2-19 et F2-21 ont été retenues en raison de leurs taux de mortalités différents (respectivement 76%, 30% et 58%).

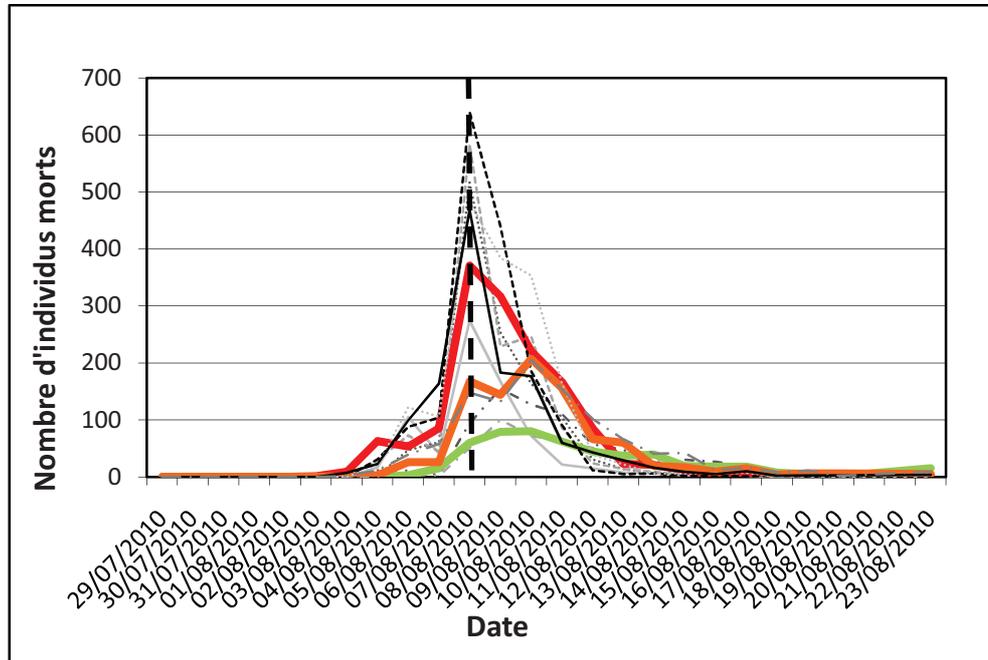


Figure 41. Cinétique de mortalité du naissain de 12 familles F2 au cours d'un épisode de mortalité estivale en août 2010. Les familles F2 étudiées apparaissent en rouge (F2-18), vert (F2-19) et orange (F2-21). La ligne verticale indique le pic de mortalité du 8 août 2010.

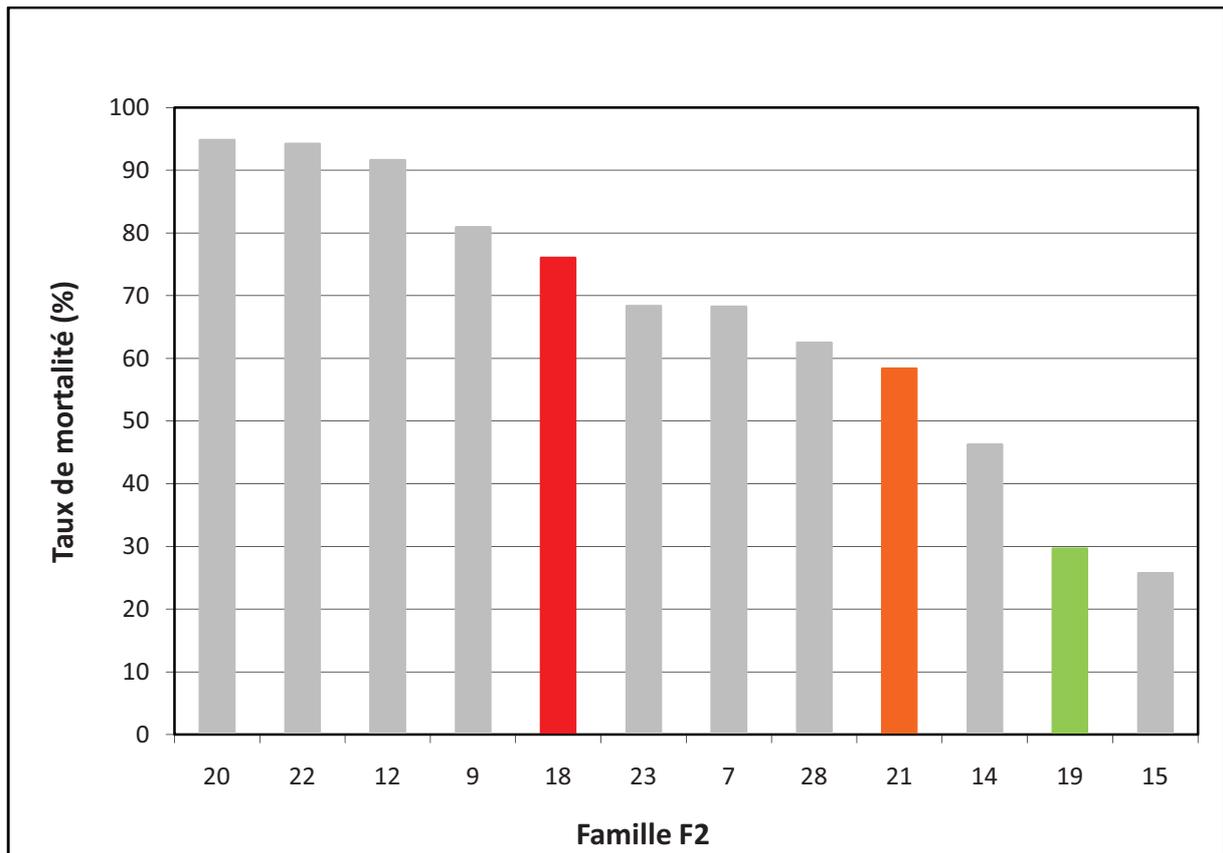


Figure 42. Taux de mortalité de 12 familles F2 au cours d'un épisode de mortalité estivale survenu en août 2010 dans un bassin expérimental. Les familles F2 étudiées apparaissent en rouge (F2-18), vert (F2-19) et orange (F2-21).

2.3.1.2. Sur estran

Pour des raisons pratiques, la date précise du début des mortalités n'est pas connue. Cependant, quelques individus morts ont été observés le 9 août, laissant supposer un début d'épisode de mortalité décalé par rapport à celui connu par les individus en bassin expérimental. Au 26 août 2010, un comptage des individus morts et des individus ayant survécu à l'épisode de mortalité a révélé un taux de mortalité tout aussi variable que pour les familles placées en bassin expérimental. En effet, celui-ci était compris entre 18% pour la famille 19 et 98% pour la famille 22 (Figure 43). De plus, une forte corrélation ($r_{\text{Pearson}} = 0,85$) entre les taux de mortalité sur estran et en bassin expérimental a été mise en évidence (Figure 44).

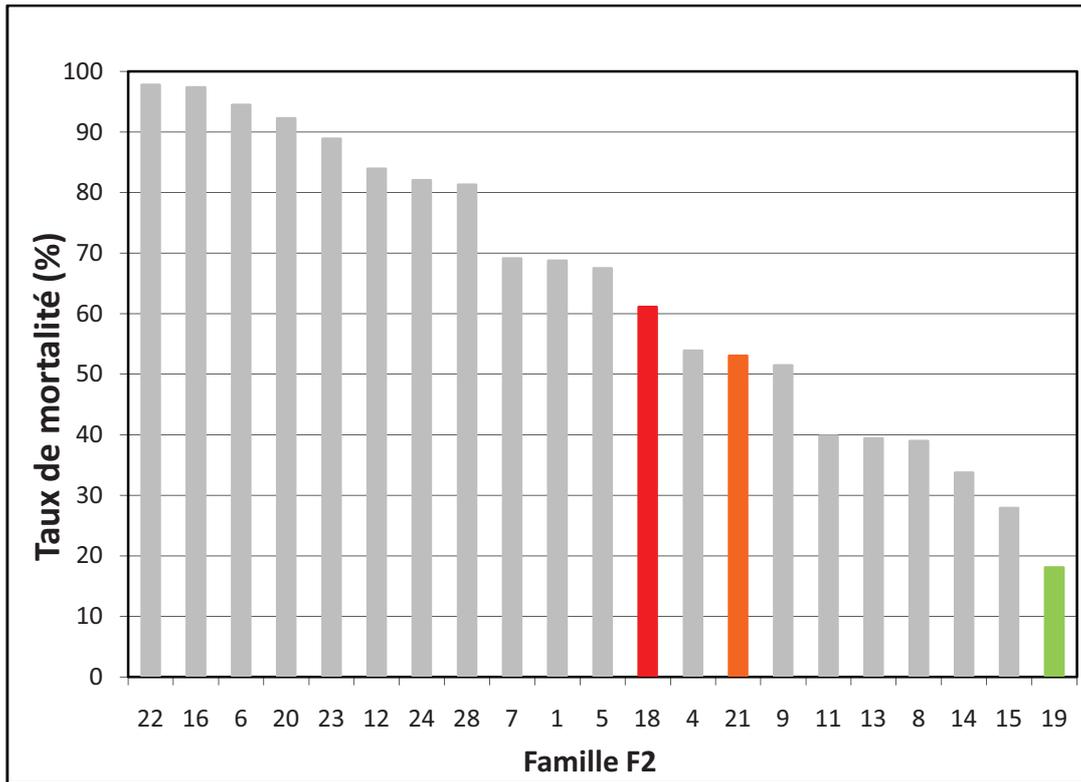


Figure 43. Taux de mortalité de 21 familles F2 au cours d'un épisode de mortalité estivale survenu en août 2010 sur estran. Les familles F2 étudiées apparaissent en rouge (F2-18), vert (F2-19) et orange (F2-21).

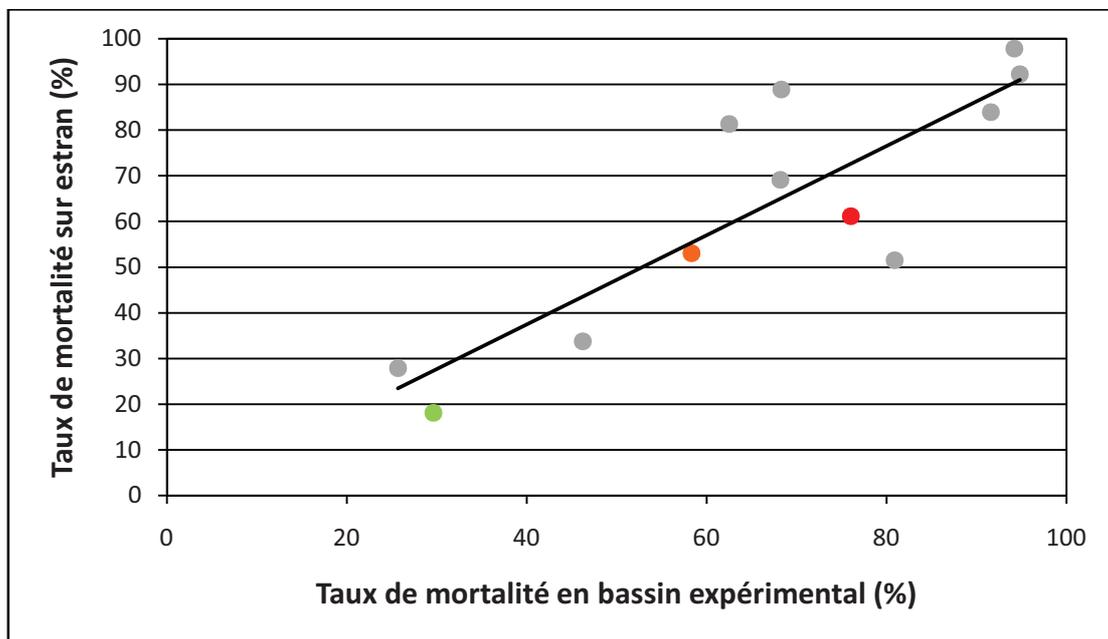


Figure 44. Corrélation entre le taux de mortalité obtenu sur estran et le taux de mortalité obtenu en bassin expérimental au cours d'un épisode de mortalité estivale survenu en août 2010. Les familles F2 étudiées apparaissent en rouge (F2-18), vert (F2-19) et orange (F2-21).

2.3.2. Mesure de la charge virale

La charge virale est exprimée en nombre de copies d'ADN viral par milligramme de tissu frais (Tableau 11). Elle est significativement différente entre les individus morts ($\mu = 1,52.10^8 \pm 2,16.10^8$) et les individus vivants ($\mu = 1,12.10^4 \pm 3,04.10^4$; $F = 276,8$; $p < 2,2.10^{-16}$). Elle est également significativement différente entre les familles ($F = 37,7$; $p < 2,2.10^{-16}$) et est comprise entre $9,46.10^7$ copies d'ADN viral/mg de tissu frais pour la famille F2-19 et $2,86.10^8$ copies d'ADN viral/mg de tissu frais pour la famille F2-18.

Famille	Taux de mortalité (%)	Etat	Charge virale minimale	Charge virale maximale	Charge virale moyenne	Ecart-type
18	78	Mort	1,57E+05	1,20E+09	2,86E+08	2,94E+08
		Vivant	0,00E+00	1,73E+05	1,40E+04	2,93E+04
19	30	Mort	2,02E+03	9,26E+08	9,46E+07	1,57E+08
		Vivant	0,00E+00	9,18E+04	2,92E+03	1,17E+04
20	58	Mort	9,08E+03	7,93E+08	9,97E+07	1,26E+08
		Vivant	0,00E+00	2,77E+05	1,68E+04	4,10E+04

Tableau 11. Statistiques descriptives de la charge virale pour les 3 familles F2 étudiées. La charge virale est exprimée en nombre de copies d'ADN viral/mg de tissu frais.

2.3.3. Marqueurs moléculaires et génotypage

Sur les 384 marqueurs SNPs, certains ont été rejetés lors de l'observation graphique des profils fournis par GenomeStudio : 105 pour la famille F2-18, 102 pour la famille F2-19, 108 pour la famille F2-21. Ensuite, les SNPs monomorphes ont été écartés pour chaque famille : 191 pour la famille F2-18, 180 pour la famille F2-19, 169 pour la famille F2-21. En dépit du nombre de marqueurs de départ, seuls 88 SNPs ont été retenus pour la cartographie de la famille F2-18, 102 pour la famille F2-19 et 107 pour la famille F2-21.

Sur les 42 marqueurs microsatellites génotypés, certains se sont avérés monomorphes et ont donc été rejetés. Ainsi, 30 microsatellites ont été retenus pour les familles F2-18 et F2-21 tandis que 31 ont été retenus pour la famille F2-19.

2.3.4. Cartographie génétique

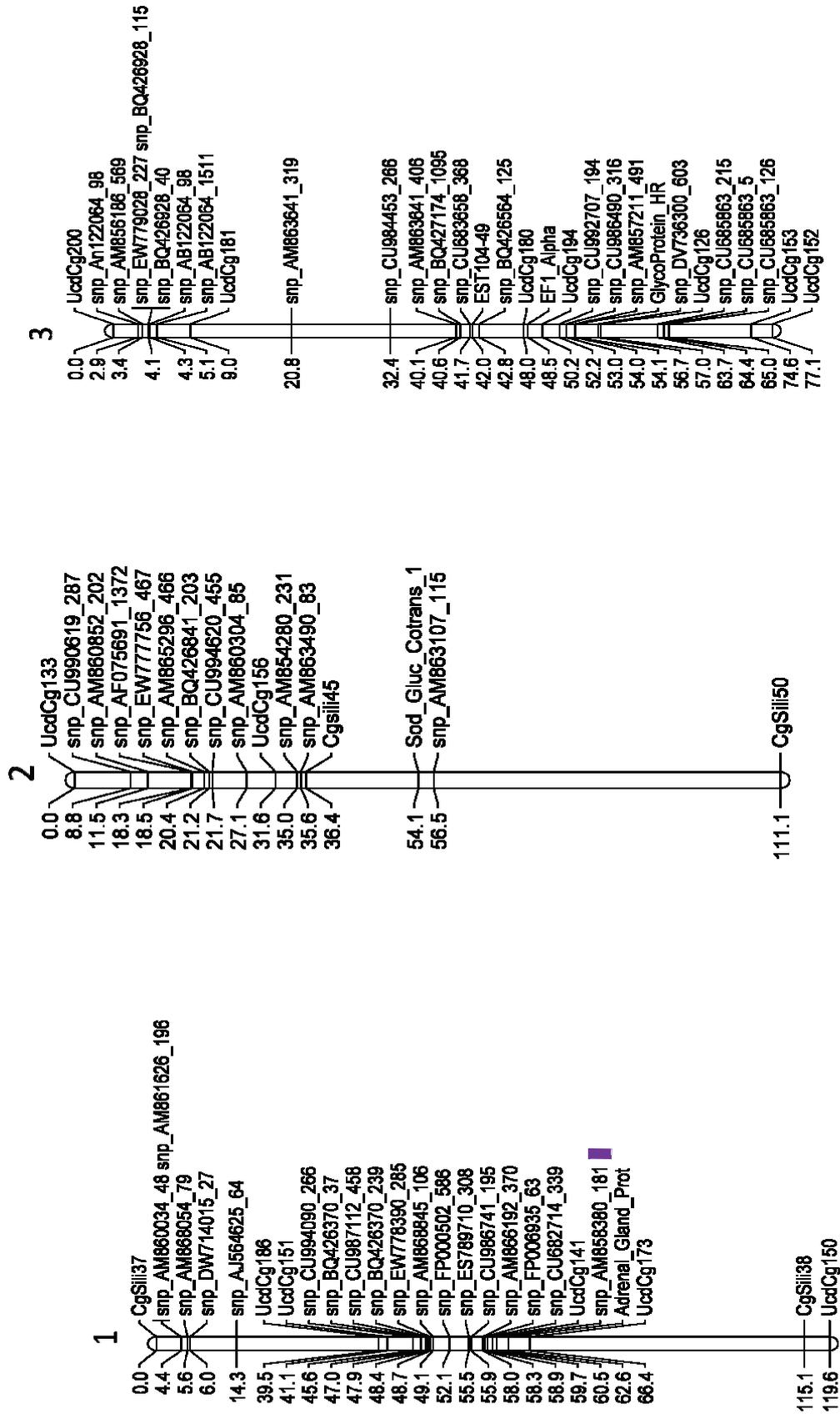
Parmi les 118 marqueurs retenus pour la cartographie génétique de la famille F2-18, 3 SNPs ont été rejetés en raison de la distorsion de ségrégation. La carte génétique de la famille F2-18 est donc composée de 115 marqueurs et sa longueur totale est de 451,18 cM (Tableau 12 b). Parmi les 133 marqueurs retenus pour la cartographie génétique de la famille F2-19, 27 SNPs ont été rejetés en raison de la distorsion de ségrégation. La carte génétique de la famille F2-19 est donc composée de 106 marqueurs et sa longueur totale est de 576,46 cM (Tableau 12 c). Parmi les 137 marqueurs retenus pour la cartographie génétique de la famille F2-21, 14 SNPs ont été rejetés en raison de la distorsion de ségrégation. La carte génétique de la famille F2-21 est donc composée de 123 marqueurs et sa longueur totale est de 539,68 cM (Tableau 12 d). Pour la carte combinée des 3 familles F2, 169 marqueurs (129 SNPs et 40 microsatellites) ont été cartographiés sur 9 groupes de liaison dont la longueur totale est de 656,87 cM (Tableau 12a et Figure 45).

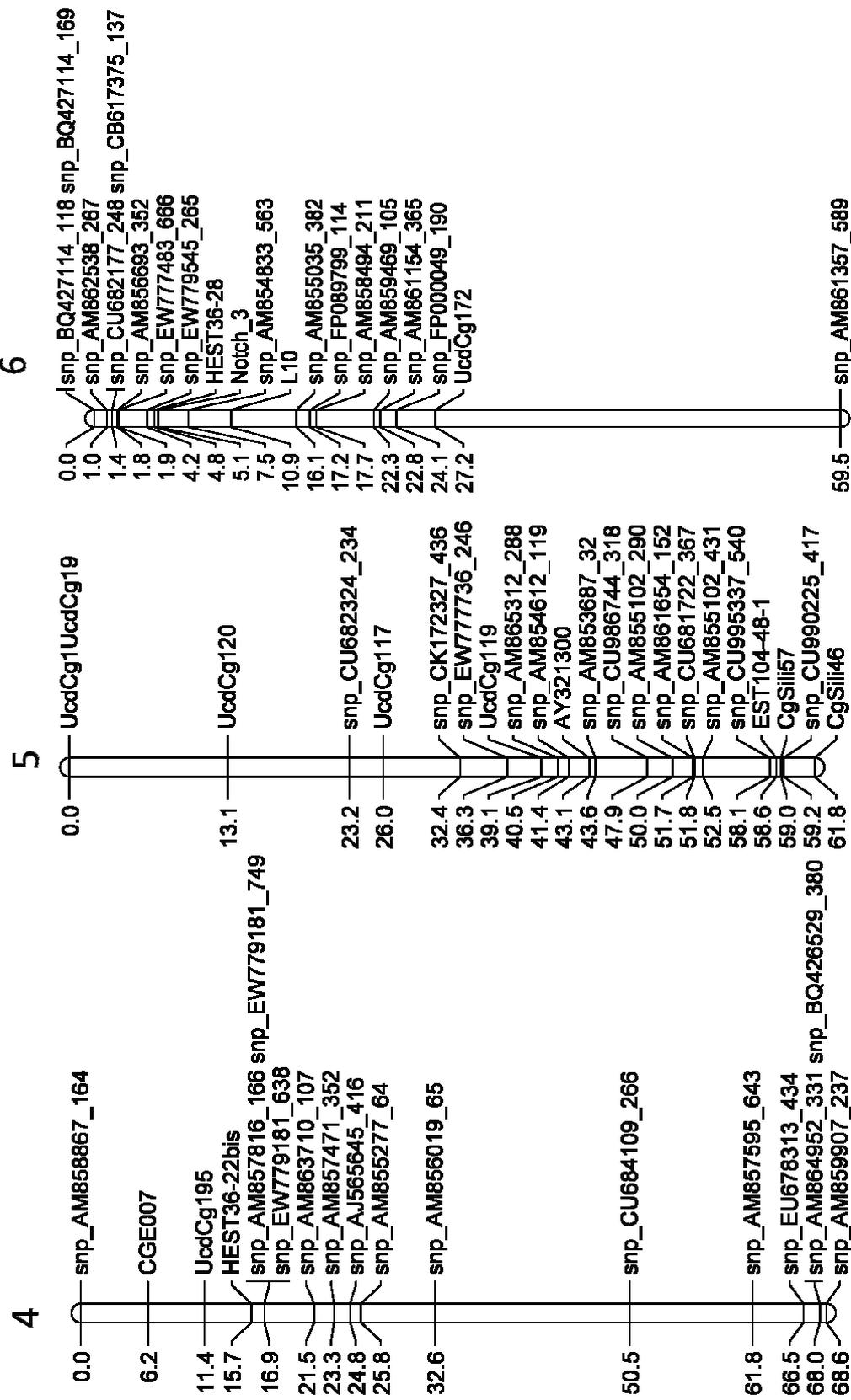
Pour les 4 cartes, les groupes de liaison ont été numérotés en fonction de leur longueur, du plus long au plus court. Les marqueurs microsatellites communs ont permis de comparer ces cartes génétiques aux cartes précédemment publiées par Hubert et Hedgecock (2004) et Sauvage et al. (2010) (Tableau 12a).

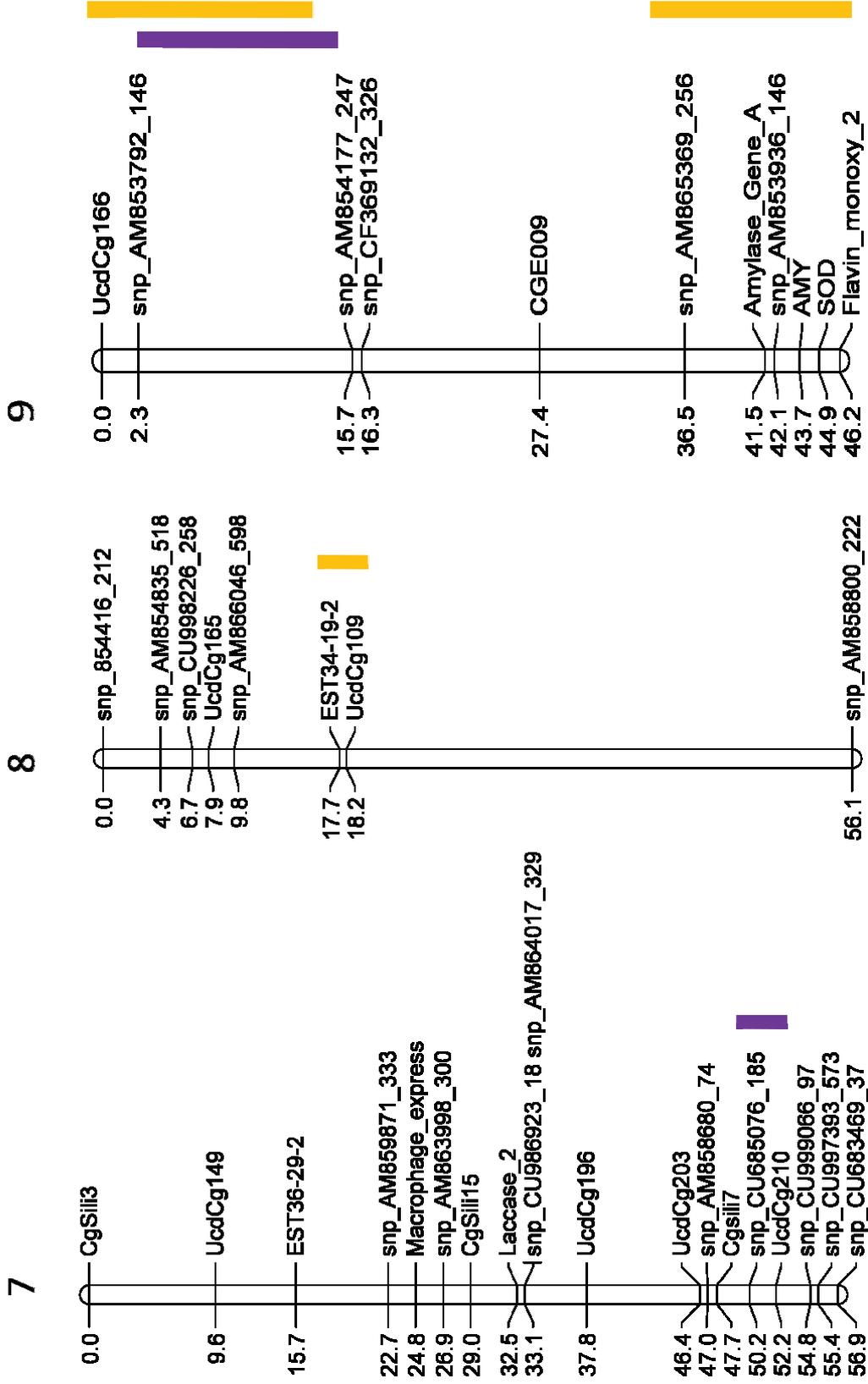
	Groupe de liaison	Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Espacement moyen entre les marqueurs (cM)	Groupe correspondant			
					F2-18	F2-19	F2-21	*
a	1a	26	119,65	4,79	1b	3c	7d	V
	2a	16	111,14	7,41	7b	1c	9d	VI
	3a	30	77,11	2,66	3b	2c	3d	I et X
	4a	18	68,56	4,03	5b	7c	6d	II
	5a	21	61,75	3,09	8b	4c	8d	IV
	6a	20	59,49	3,13	4b	6c	2d + 10d	IX
	7a	19	56,86	3,16	9b	8c	5d	VII
	8a	8	56,11	8,02	6b	9c	1d	III
	9a	11	46,21	4,62	2b	5c	4d	VI et VIII
		Moyenne	18,78	72,99	4,55	-	-	-
	Total	169	656,87	-	-	-	-	-
Groupe de liaison		Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Espacement moyen entre les marqueurs (cM)				
b	1b	22	62,84	2,99				
	2b	8	52,49	7,50				
	3b	12	51,74	4,70				
	4b	13	51,71	4,31				
	5b	12	50,11	4,56				
	6b	12	47,46	4,31				
	7b	12	45,91	4,17				
	8b	14	45,50	3,50				
	9b	10	43,42	4,82				
		Moyenne	12,78	50,13	4,54			
	Total	115	451,18	-				
Groupe de liaison		Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Espacement moyen entre les marqueurs (cM)				
c	1c	16	121,59	8,11				
	2c	14	76,20	5,86				
	3c	14	64,97	5,00				
	4c	9	64,04	8,00				
	5c	11	58,43	5,84				
	6c	10	57,37	6,37				
	7c	12	55,83	5,08				
	8c	12	42,90	3,90				
	9c	8	35,12	5,02				
		Moyenne	11,78	64,05	5,91			
	Total	106	576,46	-				
Groupe de liaison		Nombre de marqueurs	Longueur (cM)	Espacement moyen entre les marqueurs (cM)				
d	1d	8	78,79	11,26				
	2d	21	77,01	3,85				
	3d	10	68,13	7,57				
	4d	12	60,37	5,49				
	5d	11	58,53	5,85				
	6d	14	57,76	4,44				
	7d	18	53,43	3,14				
	8d	11	43,21	4,32				
	9d	16	41,17	2,74				
	10d	2	1,29	1,29				
	Moyenne	12,30	53,97	4,99				
	Total	123	539,68	-				

Tableau 12. Caractéristiques des cartes génétiques combinée (a) et des familles F2-18 (b), F2-19 (c) et F2-21 (d). Les groupes de liaison de la carte combinée sont reliés aux groupes correspondants sur les cartes de chaque famille et aux groupes correspondants sur les cartes précédemment publiées* (Hubert et Hedgecock, 2004 ; Sauvage et al., 2010) via les marqueurs communs. Les longueurs et les distances sont données en centiMorgans (cM).

Figure 45. Carte génétique combinée de *Crassostrea gigas*. Les distances sont exprimées en centiMorgans (cM). Les QTLs détectés apparaissent sur la carte en violet pour la réponse aux mortalités estivales et en jaune pour la charge virale.







2.3.5. Détection de QTLs

Les caractéristiques des QTLs détectés sont résumées dans le Tableau 13 et les QTLs sont localisés sur la carte génétique (Figure 45).

2.3.5.1. Réponse aux mortalités estivales

Pour les 3 familles, des QTLs ont été détectés pour la réponse aux mortalités estivales. Deux QTLs ont été détectés pour la famille F2-18 sur les GL 1b et 4b (Tableau 12b). Ils expliquent 13,1% et 7,5% de la variance observée et ont été confirmés par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,0001$), notamment le SNP nommé « Notch 3 » détecté sur le gène homologue de Notch 3 (EF999949). Un QTL a également été détecté chez la famille F2-19 sur le GL 5c (Tableau 12c). Il explique 29,7% de la variance observée a été confirmés par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,0001$). Deux QTLs ont été détectés chez la famille F2-21 sur les GL 4d et 5d (Tableau 12d). Ils expliquent respectivement 54,3% et 4,1% de la variance observée et le test de Kruskal-Wallis a mis en évidence des marqueurs significatifs ($P = 0,0001$ et $P = 0,05$). Sur la carte génétique combinée, ces cinq régions QTLs sont localisées sur 4 groupes de liaison différents (Tableau 12a, Figure 45).

2.3.5.2. Charge virale

Un QTL a été détecté pour la charge virale chez chacune des 3 familles. Pour la famille F2-18, il est localisé sur le GL 6b (Tableau 12b) et explique 28,5% de la variance observée. Pour la famille F2-19, il est localisé sur le GL 5c (Tableau 12c) et explique 76,3% de la variance observée. Pour la famille F2-21, il est localisé sur le GL 4d (Tableau 12d) et explique 15,6% de la variance observée. Ces trois QTLs ont été confirmés par la présence de marqueurs significatifs au test de Kruskal-Wallis ($P = 0,0001$), notamment les SNPs nommés « EST-34-19-bis » (Code GenBank : CU682072), « Flavin_monoxy_2 » détecté sur le gène Fmo-2 Flavin-containing monooxygenase 2 (Code GenBank : AJ585074) et « SOD » détecté dans le gène de SuperOxide Dismutase (Code GenBank : EF694097). Bien que le GL 5C (Tableau 12c) ait été associé au GL4d (Tableau 12d) pour former le GL9a sur la carte combinée (Tableau 12a), il n'existe pas de QTL commun aux familles F2-19 et F2-21 pour la

charge virale (Figure 45) car les marqueurs significatifs ne sont pas les mêmes pour les 2 QTLs détectés.

Trait	Famille	GL	LOD-seuil du GL	Position du QTL (cM)	Intervalle de confiance (cM)	Marqueurs flanquants	Marqueurs inclus	LOD maximal du QTL	Variance expliquée (%)	K	p-Value
Survie	F2-18	1b	2,8	42,688 - 62,041	48,893 - 54,886	snp_AM868845_106 snp_AM853758_293	snp_AF075697_181	6,87	13,1	19,04	*****
		4b	2,6	43,587 - 51,713	47,486 - 51,713	L10	Notch_3 snp_AM862538_267	4,64	7,5	20,41	*****
	F2-19	5c	2,6	1,568 - 58,432	26,675 - 39,278	CGE009 UcdCg166	snp_AM854177_247	13,93	29,7	51,855	*****
	F2-21	4d	2,7	28,945 - 60,374	28,945 - 29,945	snp_AM853792_146 snp_AM854177_247	-	29,62	54,3	72,438	*****
		5d	2,4	5,126 - 6,411	5,126 - 6,411	snp_CU999066_97 snp_AM858680_74	UcdCg210 snp_CU685076_185	2,43	4,1	8,519	**
Charge virale	F2-18	6b	2,6	0,000 - 47,460	13,260 - 16,287	snp_CU988101_315 EST-34-19-2	UcdCg109 EST34-19Bis	19,35	28,5	169,688	*****
		5c	45,0	41,278 - 55,278	47,278 - 51,278	snp_AM854177_247 UcdCg166	-	55,71	76,3	60,051	*****
	F2-21	4d	2,7	11,945 - 60,374	50,866 - 60,374	snp_CU684465_50	snp_AM865369_256 Flavin_monoxy_2 SOD AMY snp_AM853936_146	8,78	15,6	111,83	*****

Tableau 13. Résultats des recherches de QTLs impliqués dans la réponse aux mortalités estivales de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les groupes de liaison (GL) des cartes des familles F2-18 (b), F2-19 (c) et F2-21 (d). Le LOD-seuil de chaque GL a été estimé par un test de permutations (1000 permutations, $\alpha = 0,05$), la position, le LOD maximal du QTL et la variance expliquée par le QTL ont été estimés par cartographie par intervalle et la significativité par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis (K et p-Value : ** = 0,05 ; *** = 0,01 ; **** = 0,005 ; ***** = 0,001 ; ***** = 0,0005 ; ***** = 0,0001).

2.4. Discussion

Cette étude fait suite aux travaux de détection de QTLs impliqués dans la survie aux mortalités estivales et la charge virale en OsHV-1 menés par Sauvage et al. (2010). De la même façon qu'au cours de l'étude précédente, nous avons observé une différence significative de la charge virale entre les familles mais également entre les individus morts et les individus survivants d'une même famille. Nous n'avons pas jugé nécessaire d'utiliser une PCR permettant d'identifier précisément OsHV-1 μ var. En effet, détecté à partir de 2008 en association avec OsHV-1, il est le principal pathogène détecté lors des épisodes de mortalité depuis 2009 (Segarra et al., 2010 ; Renault et al., 2012). On ne sait cependant pas s'il s'agit d'un nouveau variant apparu suite à une mutation, si des conditions favorables ont induit son émergence ou s'il a été introduit accidentellement sur les côtes françaises. Le suivi quotidien de la mortalité en bassin expérimental a également mis en évidence une importante variabilité interfamiliale. Celle-ci a été confirmée par une forte corrélation entre la réponse aux mortalités estivales en bassin expérimental et sur estran pour chaque famille (Figure 44). Cette corrélation a permis de vérifier que les observations menées en bassin expérimental pour des raisons pratiques reflétaient les performances de chaque famille dans le milieu naturel. Nous pouvons donc supposer que les conditions expérimentales n'ont pas biaisé la détection de QTLs et que les QTLs détectés reflètent bien les zones du génome impliquées dans la survie aux mortalités estivales se produisant sur le terrain.

Les nouveaux marqueurs SNPs développés dans l'Article 1 ont permis d'améliorer les cartes génétiques précédemment publiées (Hubert et Hedgecock, 2004 ; Sauvage et al., 2010). En effet, la carte que nous présentons ici comporte 169 marqueurs dont 129 SNPs et 40 microsatellites répartis sur 9 groupes de liaison. Sa longueur totale est de 656,87cM et l'espacement moyen entre les marqueurs est de 4,55 cM (Tableau 12a). L'utilisation de marqueurs cartographiés par Sauvage et al. (2010) a permis de comparer cette carte génétique à celle précédemment publiée. Nous avons alors constaté que la plupart des marqueurs liés sur l'une l'étaient également sur l'autre. Il fut donc facile de déterminer des groupes de liaison homologues. Nous avons ainsi constaté que les QTLs que nous avons détectés étaient localisés sur des groupes homologues à ceux sur lesquels avaient été détectés les QTLs publiés. Pour deux d'entre eux, des marqueurs communs ont d'ailleurs été

significativement associés et la part de variance expliquée s'élève à environ 29% alors qu'elle avoisinait les 9% pour l'étude précédente. Celle-ci est certainement surestimée en raison du génotypage sélectif mené au cours des deux études. Par ailleurs, les différents QTLs trouvés ne ségrègent pas dans toutes les familles. Cela peut être dû à la différence d'informativité des marqueurs et/ou des QTLs pour chacune des familles. En effet, les lignées dont sont issus les grands-parents F0 ne sont pas fixées mais simplement divergentes pour le caractère « survie ». Dans ces conditions, il est important de multiplier le nombre de familles avant de mener des analyses plus précises des régions d'intérêt. Par exemple, il pourrait désormais être intéressant d'explorer les gènes candidats potentiellement sous-jacents, en particulier pour les deux QTLs co-localisés pour du matériel biologique différent et dans le contexte des mortalités massives apparues en 2008 et, par conséquent, entre les deux études. En effet, pour les marqueurs « in vitro » (Article 1), il est possible d'étudier la fonction des gènes au sein desquels ceux-ci ont été identifiés (Fleury et al., 2010). Le séquençage récent du génome de *Crassostrea gigas* (Zhang et al., 2012) a peut-être également permis d'annoter des gènes dans lesquels se trouvent les SNPs « in silico » (Article 1) identifiés à l'intérieur de séquences alors anonymes. Il faudra donc envisager de confronter ces séquences aux bases de données génétiques existantes telles que BLAST (Basic Local Alignment Search Tool ; Altschul et al., 1990). L'identification de gènes candidats serait un pas supplémentaire vers une sélection génique pour la résistance aux mortalités estivales.

2.5. Remerciements

Ce travail a été soutenu par Ifremer et financé partiellement par l'Agence Nationale de la Recherche « Génomique animale » Programme (GAMETOGENEs project - ANR-08-GENM-041). Les auteurs remercient l'ensemble des membres de l'écloserie Ifremer de La Tremblade et de la nurserie de Bouin pour la production et l'élevage des huîtres, Christophe Klopp et Cédric Cabau pour les données d'assemblage d'ESTs ainsi que Delphine Tourbiez pour la formation à la PCR quantitative.

2.6. Références

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.

- Bodoy A, J. Garnier, D. Razet & P. Geairon, 1990. Mass mortalities of oysters (*Crassostrea gigas*) during spring 1988 in the bay of Marennes-Oléron, related to environmental conditions. Conseil International pour l'Exploration de la mer.
- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E., Boudry, P., 2007. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. Aquaculture, **262**, 41-53.
- Dégremont, L., Bédier, E., Boudry, P., 2009. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. Aquaculture, **299** (1-4), 21-29.
- Dégremont, L., 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. Aquaculture, **317** (1-4), 94-98.
- Elsen, J.-M., 2011. Sélection sur gènes et sélection assistée par marqueurs. INRA- Productions animales, **24** (4), 357-362.
- FAO, 2013. Aquaculture production: quantities and values 1950–2011. Published electronically on the internet, available directly from <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>
- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., Huvet, A. (2010). Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. Marine Biotechnology, **12**, 326-339.
- Fox, J., 2005. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. Journal of Statistical Software, **14**(9): 1-42.
- Garcia, C., Thébault, A., Dégremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., François, C., Joly, J.-P., Ferrand, S., Kerdudou, N., Renault, T. (2011). Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. Veterinary Research, **42**, 73.
- Hubert, S., Hedgecock D., 2004. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Genetics, **168**, 351–62.
- Koganezawa, A., 1974. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. Third United States – Japan Meeting on Aquaculture Journal, 29–34.
- Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V., Hedgecock, D., 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Molecular Ecology Notes, **3**, 228-232.

- Li, R., Li, Q., Cornette, F., Dégremont, L., Lapègue, S., 2010. Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment. *Aquaculture*, **310**, 234-239.
- Maurer, D., Comps, M., His, E., 1986. Caractéristiques des mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. *Haliotis*, **15**, 309-317.
- Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A. K., Kjøglum, S. (2009). Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC Genomics*, **10**, 368.
- Pépin, J.-F., Riou, A., Renault, T., 2008. Rapid and sensitive detection of Ostreid Herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, **149**, 269–276.
- Pernet, F., Barret, J., Marty, C., Moal, J., Le Gall, P., Boudry, P., 2010. Environmental anomalies, energetic reserves and fatty acid modifications in oysters coincide with an exceptional mortality event. *Marine Ecology Progress Series*, **401**, 129–146.
- R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
- Renault, T., Moreau, P., Faury, N., Pépin, J.-F., Segarra, A., Webb, S., 2012. Analysis of clinical Ostreid Herpesvirus 1 (*Malacoherpesviridae*) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *Journal of Virology*, **86** (10), 5942-5947.
- Samain, J.F., McCombie, H., 2008. Summer mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. The MOREST Project, *Quae Editions, Versailles*, 379p.
- 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**, 390-399.
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T. (2010). Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, **153**, 92–99.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P., 1999. Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Etude de la variabilité spatiale, de son environnement et de sa biologie par un système d'information géographique (SIG). *Aquatic Living Resources*, **12**, 131–43.
- Taris, N., Baron, S., Sharbel, T.F., Sauvage, C., Boudry, P. (2005). A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high throughput parentage

- analyses in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture Research*, **36** (5), 516–518.
- Van Ooijen, J.W., 2004. MapQTL[®]5: Software for the Mapping of Quantitative Trait Loci in Experimental Populations of Diploid Species. Kyazma B.V., Wageningen.
- Van Ooijen, J.W., 2006. JoinMap[®]4: Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps in Experimental Populations. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands.
- Verrier, E. R., Dorson, M., Mauger, S., Torhy, C., Ciobotaru, C., Hervet, C., Dechamp, N., Genet, C., Boudinot, P., Quillet, E. (2013). Resistance to a Rhabdovirus (VHSV) in Rainbow Trout: identification of a major QTL related to innate mechanisms. *PLoS ONE*, **8**(2), e55302. doi:10.1371/journal.pone.0055302.
- Yamtich, J., Voigt, M. L., Li, G., Hedgecock, D., 2005. Eight microsatellite loci for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Animal Genetics*, **36**(6), 524-526.
- Yu, Z., Guo, X. (2006). Identification and mapping of disease resistance QTLs in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture*, **254**, 160–170.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Los, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P. M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y, Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C. E. W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, **490** (7418), 49-54.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était de détecter, par une approche QTL, les relations qui existent entre la survie aux mortalités estivales, l'effort de gamétogenèse et certaines portions du génome de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Afin d'optimiser la détection de ces QTLs (Massault, 2010), un matériel biologique particulier, les familles F2, a été produit. Dès le premier été, des individus appartenant à ces familles ont été suivis au cours d'un épisode de mortalité estivale qui a révélé une forte variabilité inter-famille de la réponse à ce phénomène. Au cours de leur deuxième année, la gamétogenèse d'individus préservés des mortalités estivales a été observée. Le suivi temporel d'une partie de ce matériel biologique par IRM a apporté de nouvelles connaissances de la gamétogenèse de l'huître creuse. Afin de valider l'utilisation de cette méthode, certains individus ont été sacrifiés pour observer la gamétogenèse par la méthode classique d'histologie. Cette méthode a également été utilisée pour observer la gamétogenèse d'une autre partie du matériel biologique. Le développement de nouveaux marqueurs moléculaires SNPs a permis d'augmenter la densité de la carte génétique précédemment publiée afin d'affiner les régions QTLs détectées pour la survie aux mortalités estivales (Sauvage et al., 2010) et de localiser des QTLs impliqués dans l'effort reproducteur.

1. Synthèse des résultats

1.1. Meilleure connaissance du caractère « effort reproducteur »

L'histologie classiquement utilisée pour observer la gamétogenèse de l'huître creuse a révélé des différences interfamiliales de sex-ratio et d'indice gonadique. Cependant, l'histologie ne permet d'estimer ces paramètres qu'à un instant t puisque les individus sont nécessairement sacrifiés. L'avantage de l'Imagerie par Résonance Magnétique était donc la possibilité de suivre les mêmes individus tout au long d'une saison de gamétogenèse. Nous avons ainsi pu observer des trajectoires individuelles qui n'auraient pas pu être mises en évidence par l'histologie (Figure 46). En effet, nous avons remarqué que chaque individu suivait son propre rythme pour atteindre les différents stades de maturité connus (Mann, 1979 ; Steele et Mulcahy, 1999 ; Normand et al., 2009).

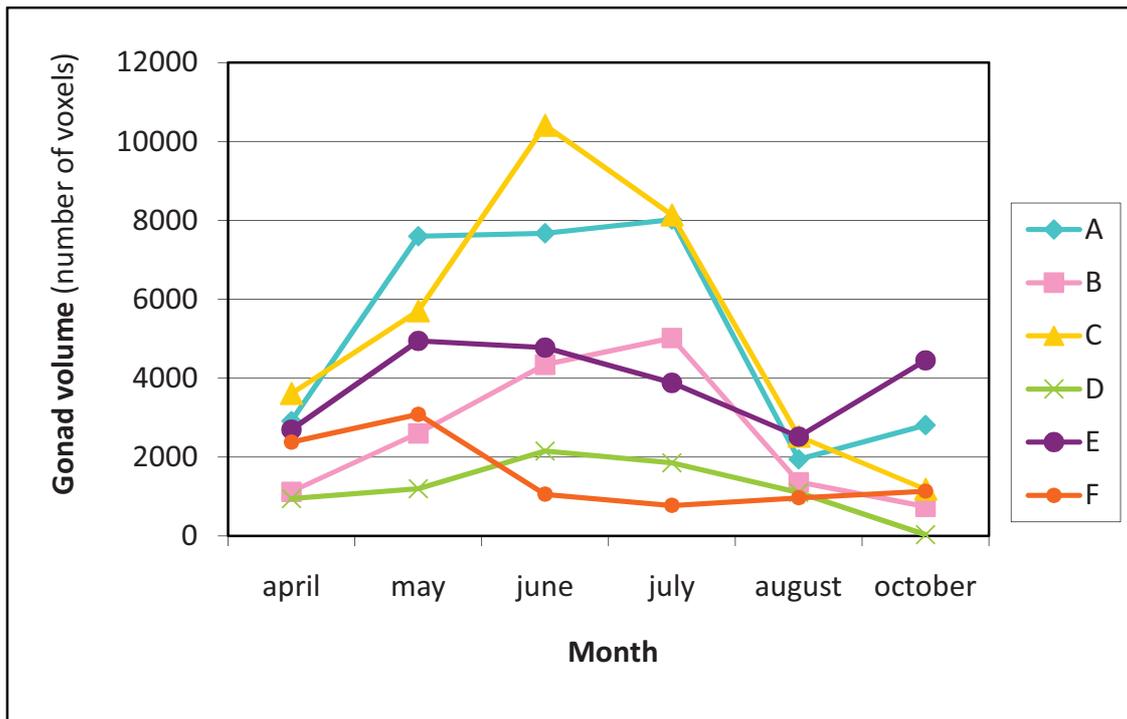


Figure 46. Evolution du volume gonadique au cours des 6 sessions d'IRM de 2011 pour 6 individus (A, B, C, D, E et F) appartenant à la famille F2-18.

De plus, nous avons réussi à déterminer le sexe des individus à partir des images IRM : la composition biochimique différente des gonades mâles et des gonades femelles a induit des niveaux de gris différents sur les images IRM. Nous avons ainsi pu observer que les mâles étaient globalement plus précoces que les femelles. Malgré ces cinétiques individuelles, la plupart des individus ont pondu au mois de juillet, comme les huîtres sauvages suivies par le RESeau d'observations CONchyliques (Ifremer - RESCO). Ceci semble cohérent avec la biologie de l'espèce puisque la fécondation est externe et en milieu marin. Pour qu'il y ait fécondation, il est nécessaire que les gamètes soient émis en même temps. Néanmoins, l'intervalle entre deux séances d'IRM étant d'au moins un mois, il serait intéressant de réitérer ce type d'étude en augmentant la fréquence des séances, notamment à partir du moment où la majorité des huîtres semblent à pleine maturité. Ce moment ne peut être déterminé à l'avance car la gamétogenèse est fortement influencée par les conditions environnementales telles que la température et la disponibilité du phytoplancton (Fabioux et al., 2005, Enriquez-Diaz, 2009, Santerre et al. 2013) qui sont variables d'une année à l'autre. Nous avons d'ailleurs pu le constater grâce aux deux séances d'IRM qui ont été réalisées en 2012. En effet, les individus étaient globalement plus matures

en avril 2012 qu'en avril 2011 mais, contre toute attente, en juin, la tendance s'était inversée. Les données du réseau RESCO ont d'ailleurs confirmé que la ponte des huîtres sauvages avait eu lieu en août 2012, soit un mois plus tard qu'en 2011. Il aurait été intéressant d'ajouter des séances IRM en 2012 pour vérifier ce constat sur notre matériel biologique. Néanmoins, malgré un indice gonadique globalement plus faible en 2012, une corrélation des indices gonadiques entre les deux années a pu être observée au niveau individuel : les individus dont l'indice gonadique maximal était parmi les plus élevés en 2011 ont présenté un indice gonadique parmi les plus élevés en 2012 et inversement. L'IRM a donc permis d'en apprendre davantage sur la cinétique de la gaméto-genèse et le comportement reproducteur d'un même individu sur deux saisons de gaméto-genèse. Cependant, ces données ne reposent que sur l'observation d'une seule famille et restent donc à confirmer sur du matériel biologique différent.

1.2. Meilleure connaissance génétique des caractères étudiés

1.2.1. Apport de cette étude à la connaissance du caractère « survie aux mortalités estivales »

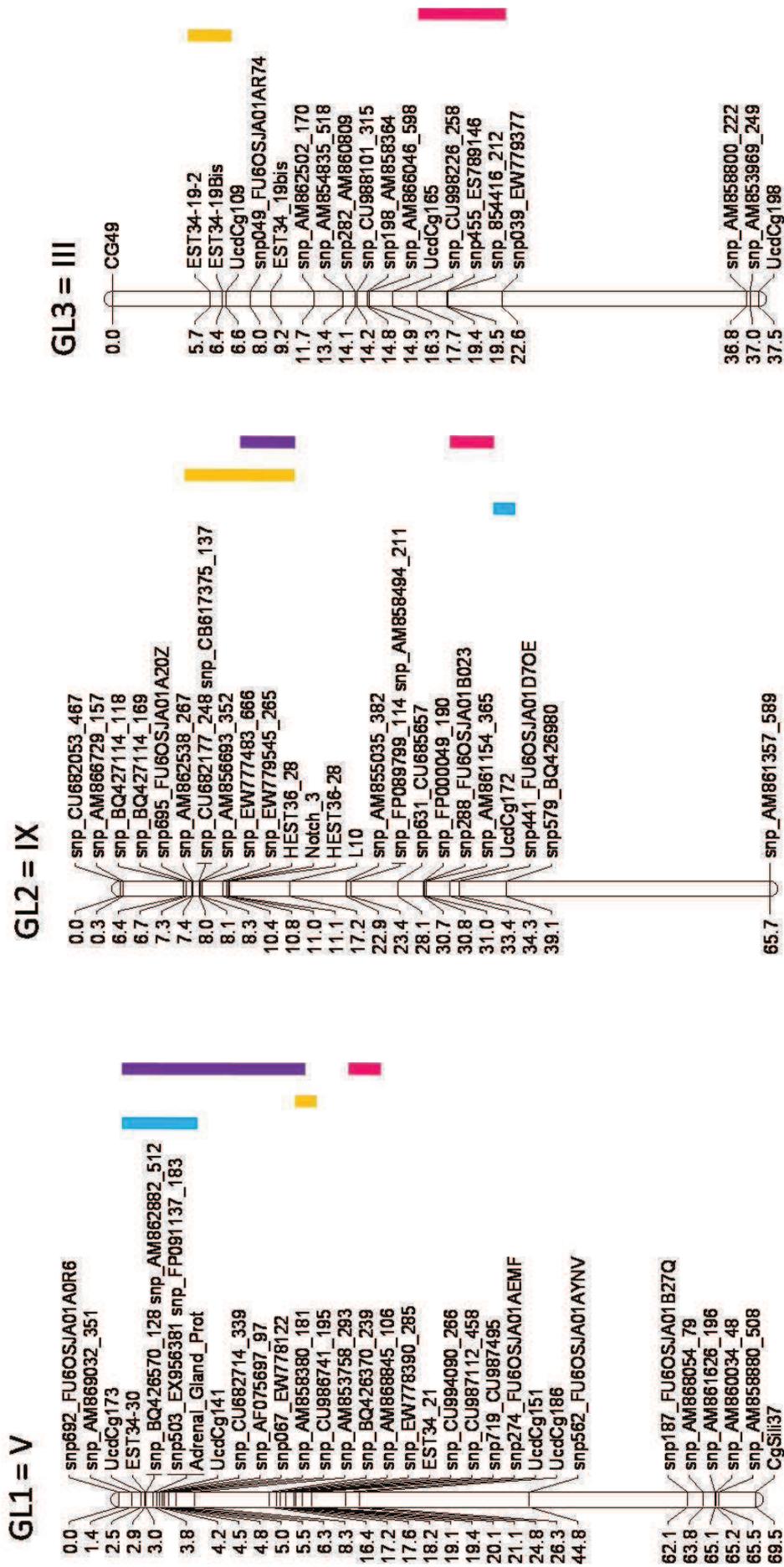
Le génotypage des individus testés pour la survie aux mortalités estivales pour des marqueurs utilisés par Sauvage et al. (2010) et le génotypage d'une famille (R*O) testée par Sauvage et al. (2010) pour les nouveaux marqueurs SNPs développés (Article 1) ont permis de comparer notre carte génétique « survie » à la carte publiée par Sauvage et al. (2010). Nous avons ainsi observé que les marqueurs liés sur la carte publiée étaient également liés sur notre carte. Nous avons donc pu comparer la localisation des QTLs précédemment détectés à la localisation de ceux que nous avons détectés (Figure 47). Sur les 5 QTLs publiés, nous en avons retrouvé 4 chez nos trois familles F2 et 1 chez la famille R*O, dont deux sur des groupes de liaison homologues (Figure 47: GL1 et GL2) et deux co-localisés (Figure 47: GL4 et GL9). En effet, les QTLs détectés ne ségrègent pas dans l'ensemble des familles. Cela peut provenir du fait que les marqueurs sont inégalement informatifs au sein de chaque famille mais aussi du fait que le déséquilibre de liaison qui existe entre un marqueur et un QTL varie d'une famille à une autre. La variance expliquée par l'ensemble des QTLs s'élève à 83,6%. Cette valeur est probablement surestimée en raison de la stratégie de génotypage sélectif utilisée (Darvasi et Soller, 1992 ; Ronin et al., 1998). De plus, nous n'avons retenu

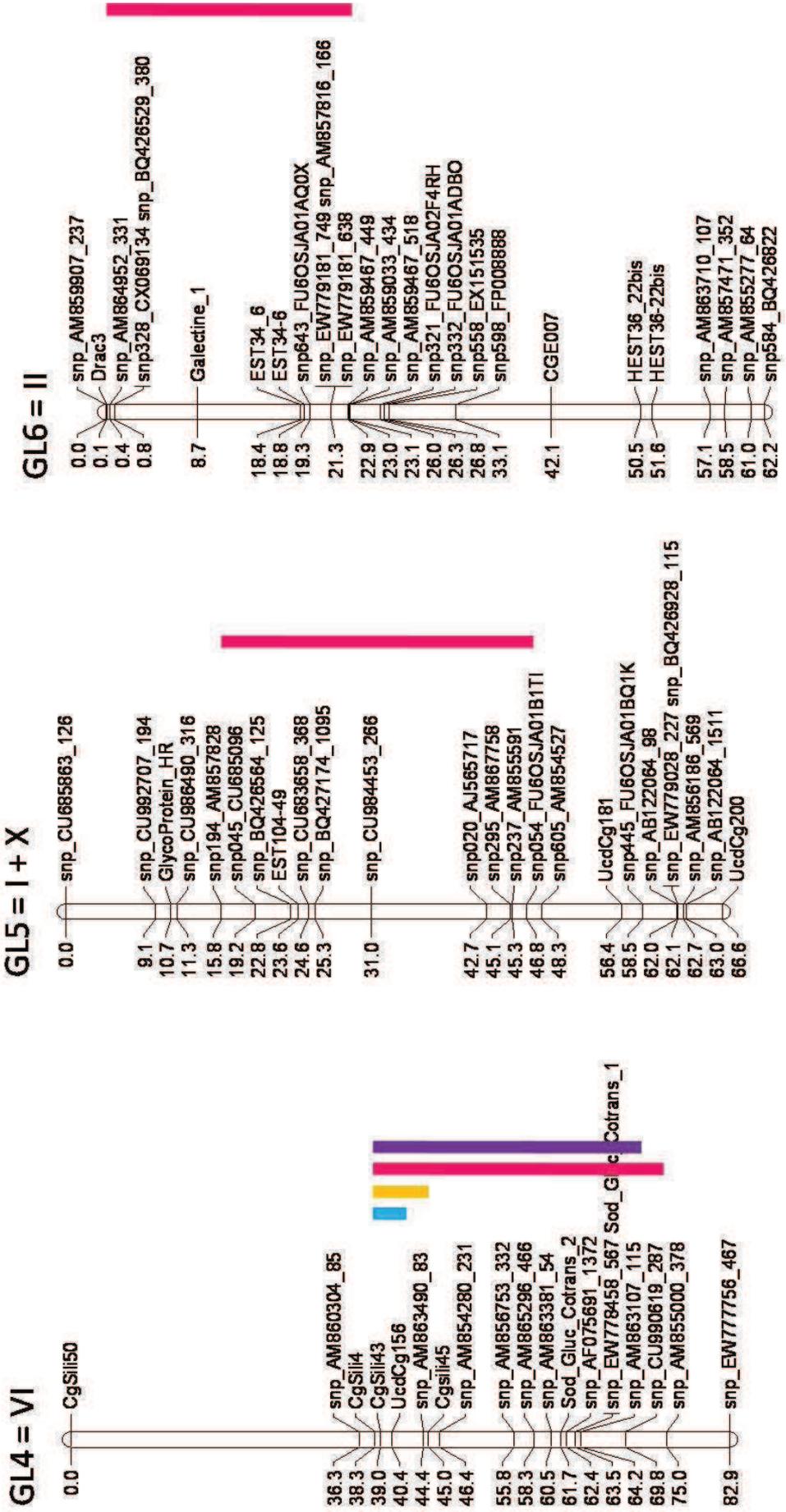
que les QTLs significatifs. Or, ces QTLs à effet majeur peuvent en masquer d'autres dont l'effet est plus faible mais contribue à la part de variance expliquée (Lander et Botstein, 1989). Cependant, retrouver les mêmes QTLs pour du matériel biologique différent et dans le contexte des mortalités massives apparues depuis 2008 laisse penser que ces régions (1) seraient porteuses de gènes contrôlant la réponse aux mortalités estivales et que (2) une grande partie des mécanismes mis en jeu avant 2008 par les huîtres pour se défendre seraient également mis en jeu après 2008, dans le cadre de l'augmentation des mortalités de naissains observées.

1.2.2. Proximité des QTLs impliqués dans la survie et des QTLs impliqués dans l'effort reproducteur

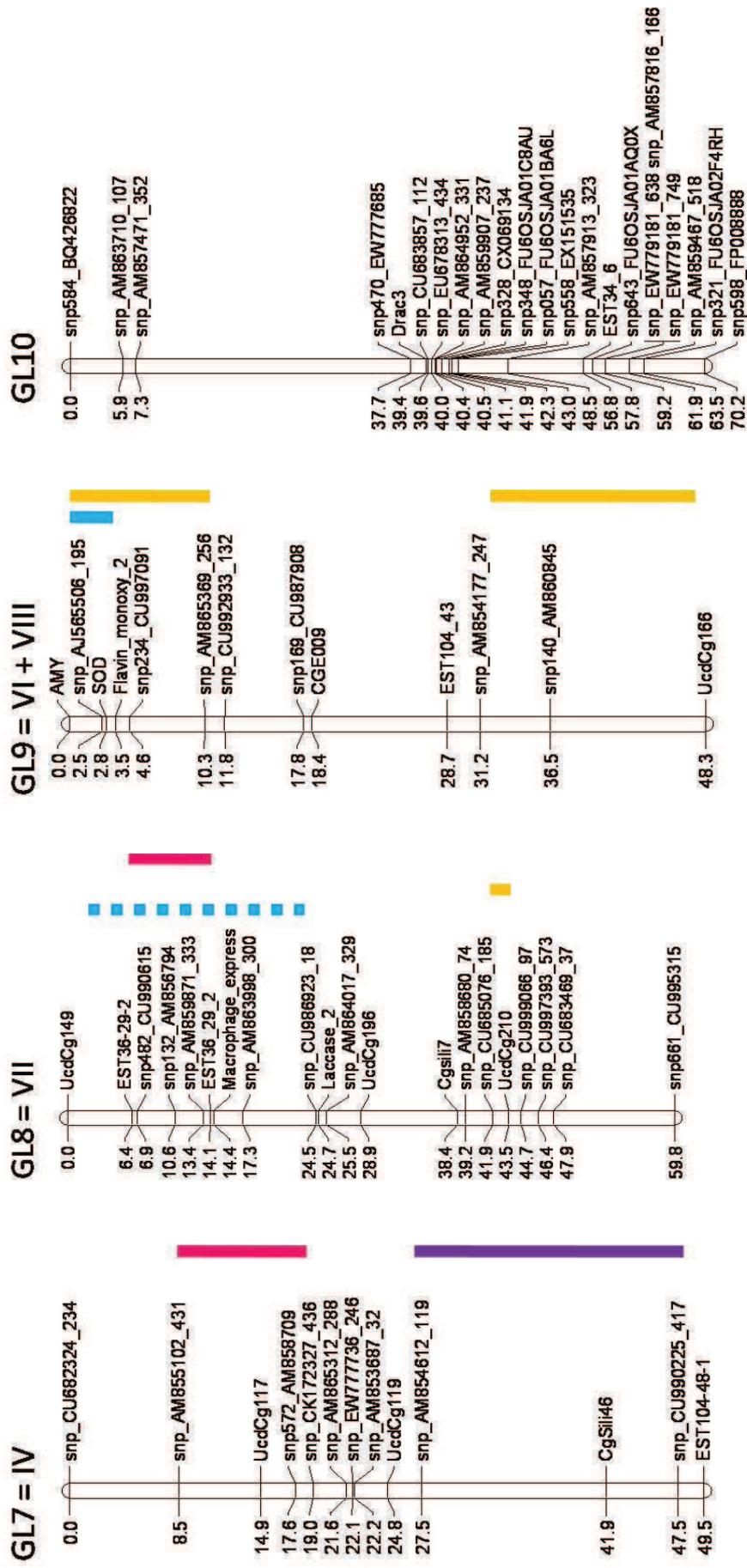
Comme nous avons génotypé les individus testés pour la survie et les individus caractérisés pour l'effort reproducteur avec de nombreux marqueurs SNPs communs, il nous a été possible d'établir une carte combinée « survie/effort reproducteur » en combinant les groupes de liaison homologues des cartes combinées « survie » et « effort reproducteur » (Figure 47), nous avons pu mettre en évidence des liaisons entre les régions QTLs impliquées dans la réponse aux mortalités estivales et dans l'effort reproducteur. Nous avons ainsi retrouvé la corrélation phénotypique observée par Samain et al., 2007 et Huvet et al., 2010 au niveau génotypique sans pour autant pouvoir conclure à l'origine de cette corrélation. En effet, quatre hypothèses permettraient de l'expliquer. La première hypothèse serait que la proximité des QTLs soit due au simple hasard. La seconde hypothèse serait qu'il existe une relation d'épistasie entre les gènes impliqués dans les deux caractères étudiés. La troisième hypothèse serait l'existence de gènes pléiotropes qui favoriseraient la survie mais diminueraient l'effort reproducteur ou inversement. Chez le porc, le gène de sensibilité à l'halothane, un gaz anesthésiant utilisé en médecine humaine et vétérinaire, exerce un effet pléiotrope sur des caractères d'intérêt économique tels que le rendement à l'abattage, le taux de muscle (Larzul et al., 1997) ou la sensibilité au stress. Ce gène est donc utilisé en sélection pour améliorer la production tout en diminuant la sensibilité au stress. La quatrième hypothèse serait que les gènes impliqués dans ces deux caractères soient en déséquilibre de liaison.

Figure 47. Carte génétique combinée « Survie » et « Effort reproducteur ». Les QTLs détectés par Sauvage et al., 2010 pour les caractères « survie » et « charge virale en OsHV-1 » apparaissent en bleu. Les QTLs détectés au cours de notre étude pour ces mêmes caractères apparaissent en jaune. Les QTLs détectés pour l'indice gonadique apparaissent en rose et les QTLs détectés pour le sexe apparaissent en violet. Les noms des groupes de liaison indiquent le groupe homologue sur la carte de Sauvage et al., 2010 (en chiffres romains).





Les pointillés indiquent un groupe de liaison détecté par Sauvage et al., 2010 mais dont les marqueurs associés n'ont pas été cartographiés au cours de notre étude. La position probable a été déterminée en excluant les marqueurs communs aux deux cartes mais qui n'étaient pas associés à ce QTL.



2. Perspectives

2.1. La Nouvelle Génération de Séquençage

Ce travail a permis d'améliorer la carte génétique de *Crassostrea gigas* car l'augmentation de la densité de marqueurs tend à réduire la longueur des groupes de liaison et, par conséquent, l'espacement moyen entre les marqueurs. Les cartes précédemment publiées affichaient une longueur allant de 770 cM pour 102 marqueurs (Li et Guo, 2004) à 1062 cM pour 80 marqueurs (Sauvage, 2008). A partir des deux sessions de génotypage d'individus appartenant à nos trois familles, nous avons pu établir une carte génétique sur laquelle figurent 216 marqueurs dont 28 microsatellites et 188 SNPs répartis sur 10 groupes de liaison (Figure 47). La longueur de cette carte est de 612,23 cM et couvre 90,7% de la longueur théorique du génome estimée à 675,04 cM grâce à la formule de Chakravarti (Chakravarti et al., 1991). L'espacement moyen entre les marqueurs a également été réduit à 3,14 cM, ce qui permet de s'approcher des chromosomes, par rapport aux 8,8 cM estimés sur la carte génétique des mâles par Li et Guo (2004) ou aux 12,7 cM sur la carte de Sauvage (2008). Pour ancrer ces cartes génétiques, l'élaboration d'une carte physique à partir d'un panel RH a été tentée au cours du projet Gamétogènes mais, pour le moment, celle-ci n'est pas encore disponible. L'essor récent des méthodes de la Nouvelle Génération de Séquençage permet d'imaginer dans un futur proche une augmentation encore plus importante de la densité en marqueurs de la carte génétique (P-A Gagnaire, pers. Comm.). En effet, des marqueurs RAD (Restriction site Associated DNA) sont actuellement développés sur les familles F2-19 et F2-21 et seront prochainement intégrés aux cartes génétiques de ces familles (Projet Aquagenet).

2.2. Apport du séquençage du génome de l'huître creuse

Au cours de cette étude, nous avons utilisé des marqueurs SNPs détectés dans des gènes différentiellement exprimés dans les gonades d'individus sélectionnés pour leur résistance ou leur sensibilité aux mortalités estivales (Fleury et al., 2010). Il serait intéressant de vérifier la fonction des gènes dont les marqueurs sont inclus dans les QTLs détectés. Cependant, un grand nombre de marqueurs SNPs anonymes ont également été utilisés. Le séquençage récent du génome de *Crassostrea gigas* (Zhang et al., 2012) ouvre la voie à la

recherche de gènes candidats à partir de ces marqueurs qui étaient anonymes au début de cette étude mais qui se situent peut-être au sein de gènes annotés depuis.

2.3. Utilisation des QTLs détectés dans un programme de sélection

A ce jour, les QTLs détectés chez les espèces aquacoles ne sont que rarement exploités en sélection. A notre connaissance, seul le QTL impliqué dans la résistance à la nécrose pancréatique infectieuse chez le Saumon atlantique (Moen et al., 2007) est utilisé dans un programme de sélection privé mis en place en 2007 par l'entreprise norvégienne AquaGen. Pourtant, des modélisations (Azéma, 2012) ont montré l'impact bénéfique d'un QTL expliquant de 10 à 40 % de la variance observée sur le schéma de sélection classique reposant sur des familles (Figure 48, gauche) et sur un schéma de sélection combinant une sélection sur les familles et sur les individus reproducteurs (Figure 48, droite).

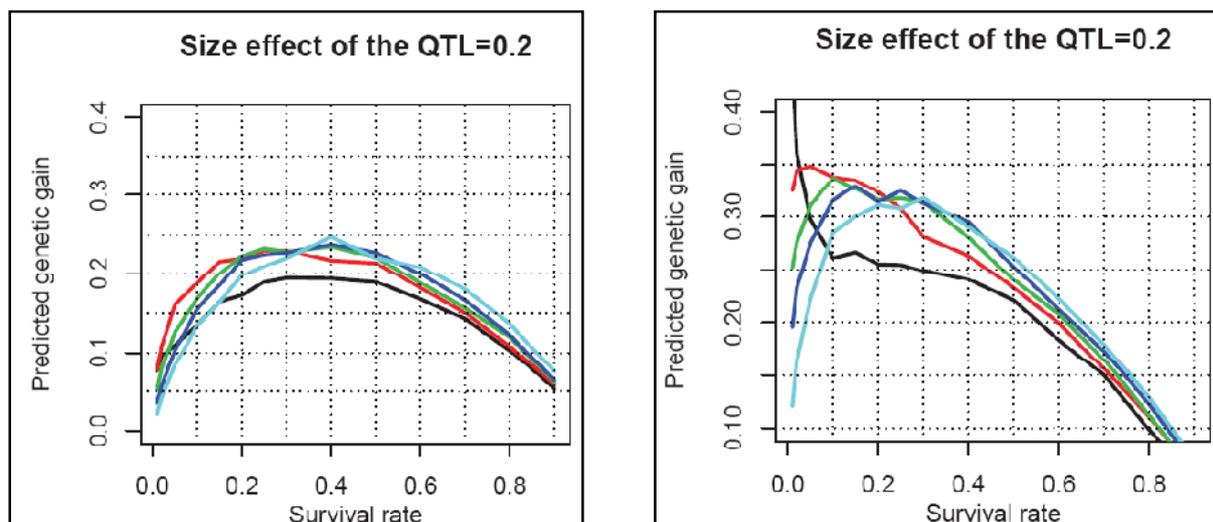


Figure 48. Modélisation de l'effet d'un QTL dans un schéma de sélection classique (à gauche) et sur un schéma combiné (à droite). Gain de sélection attendu sur le taux de survie grâce à l'utilisation d'un QTL expliquant 40% de la variance observée en fonction de la fréquence initiale du QTL dans la population avant sélection (1% en noir, 5% en rouge, 10% en vert, 20% en bleu foncé, 50% en bleu clair).

Si les marqueurs significativement associés aux caractères d'intérêt sont localisés dans des gènes identifiés, une sélection directement sur ces gènes pourrait être mise en place par le choix d'animaux reproducteurs porteurs des allèles favorables. Cependant, cette stratégie pourrait mener à une perte de diversité génétique puisque le nombre de

reproducteurs est limité. Si les marqueurs demeurent anonymes, il est possible de sélectionner indirectement les allèles favorables via une Sélection Assistée par Marqueurs.

Dans les deux cas, le programme de sélection sur un seul caractère expose au risque d'effets défavorables sur un autre caractère. En effet, d'une part, la sélection sur un allèle favorable ou une région porteuse de cet allèle entraîne potentiellement la sélection d'autres allèles défavorables en déséquilibre de liaison tel que la sélection des moutons sur le gène PrP pour la résistance à la tremblante qui pourrait affecter les capacités de défense contre les infections (Sweeney et Hanrahan, 2008). D'autre part, la pléiotropie d'un gène ne pouvant être vérifiée *a priori*, il se peut que la sélection d'un allèle favorable pour le caractère considéré s'avère néfaste pour un autre caractère d'intérêt (Larzul et al., 1997). L'observation récente de mortalités d'huîtres creuses adultes associées à la détection de *Vibrio aestuarianus* (REPAMO, 2012) suscite cette interrogation quant à la sélection des huîtres pour la résistance aux mortalités de juvéniles, le pathogène associé aux mortalités estivales massives de juvéniles. Il se pourrait que cette sélection, dont l'enjeu est important pour la filière aquacole, ait favorisé la survie au stade juvénile tout en ayant involontairement fragilisé les individus au stade adulte.

Ainsi, tout en essayant de comprendre les facteurs impliqués dans les mortalités et les mécanismes de défense mis en place, il semble pertinent de poursuivre une sélection non ciblée sur un agent pathogène en particulier, et en étudiant les corrélations phénotypiques et génétiques entre les survies aux différents stades. Ce type de sélection peut s'apparenter à une sélection visant à améliorer la robustesse de l'huître. En effet, améliorer la capacité de survie de l'huître face à l'ensemble des perturbations auxquelles elle est soumise dans son milieu naturel (variations de température, de salinité et de ressources nutritives, diversité des pathogènes...) apparaît un enjeu majeur pour une filière dont la production s'inscrit dans un milieu non contrôlé.

BIBLIOGRAPHIE HORS ARTICLES

- A -

Azéma, P. (2012). Modelling of a selection scheme for an improved survival rate to summer mortality syndrome in *Crassostrea gigas*. AgroParisTech, Master Thesis, 63p.

- B -

Baghurst, B.C., Mitchell, J.G. (2002). Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture Research, **33**, 1253–1263

Beattie, J., Chew, K., Hershberger, W. (1980). Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. Proceedings of National Shellfish Association, **70**, 184-189.

Buroker, N. E. (1983). Sexuality with respect to shell length an group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Malacologia, **23**, 271-279.

- C -

Chakravarti, A., L. K. Lasher et J. E. Reefer (1991). A Maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. Genetics, **128** (1), 175-182.

Cheney, D.P., Macdonald, B.F., Elston, R.A. (2000). Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. Journal of Shellfish Research, **19**, 353-359.

Curole, J. P. , Hedgcock, D. (2005). High frequency of SNPs in the Pacific oyster genome. http://intl-pag.org/13/abstracts/PAG13_W026.html. Plant and Animal Genome XIII Symposium.

- D -

Darvasi, A., Soller, M. (1992). Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. Theoretical and Applied Genetics, **85** (2), 353-359.

Davison, A.J., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Watson, M.S., Cunningham, C., Le Deuff, R.-M., Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. Journal of General Virology, **86**, 41–53.

- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellet, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. Archive of Virology, **154**, 171–177.
- Dégremont, L. (2003). Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l’huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, Université de Caen-Basse Normandie, 333p.
- Dégremont, L., Ernande, B., Bédier, E., Boudry, P. (2007). Summer mortality of hatchery-produced oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. Aquaculture, **262**, 41–53.
- Dégremont, L., Bédier, E., Boudry, P. (2010 a). Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. Aquaculture, **299**, 21-29.
- Dégremont, L., Soletchnik, P., Boudry, P. (2010 b). Summer mortality of selected juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* under laboratory conditions and comparison with field performance. Journal of Shellfish Research, **29**, 847-856.
- Dégremont, L., Boudry, P., Ropert, M., Samain, J.-F., Bédier, E., Soletchnik, P. (2010c). Effects of age and environment on survival of summer mortality by two selected groups of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture, **299**, 44-50.
- Dégremont, L. (2011). Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. Aquaculture, **317** (1-4), 94-98.
- Deslous-Paoli, J.M., Héral, M. (1988). Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. Aquatic Living Resources, **1**, 239–249.
- Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M.-P., Rivière, G., Boudry, P., Favrel, P. (2012). Gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. PLoS ONE, **7**(5), e36353.

- E -

- Enriquez-Diaz, M. (2004). Variabilité et bioénergétique de la reproduction chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*. Océanologie Biologique. Brest, Université de Bretagne Occidentale, Manuscrit de thèse, 216p.
- Enriquez-Diaz, M.-R., Pouvreau, S., Chavez-Villalba, J., Le Pennec, M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. Aquaculture International, **17**(5), 491-506.

Ernande, B., Clobert, J., McCombie, H., Boudry, P. (2003). Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): A quantitative genetics study. Journal of Evolutionary Biology, **16**, 399-411.

- F -

Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S. (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Aquaculture, **250**, 458–470.

FAO (2013). Aquaculture Production (Quantities and values) 1950-2011. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>.

Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., Huvet, A. (2010). Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. Marine Biotechnology, **12**, 326-339.

- G -

Galstoff, P.S. (1964). The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. Fishery Bulletin, **64**, 1–480.

Garcia, C., Thébault, A., Dégremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., François, C., Joly, J.-P., Ferrand, S., Kerdudou, N., Renault, T. (2011). *Ostreid herpesvirus 1* detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. Veterinary Research, **42**,73.

Glude, J.B. (1975). Summary report of Pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972. Proceedings of the First United States - Japan meeting on Aquaculture, 1-28.

Grassé, P. (1960). Traité de Zoologie. Tome V. Masson et Cie, Paris, 2219 pp.

Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K. Jr (1998). Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Evolution, **52**, 394–402.

Guo, X., Li, Q., Wang, Q.Z., Kong, L.F. (2012). Genetic Mapping and QTL Analysis of Growth-Related Traits in the Pacific Oyster. Marine Biotechnology, **14**, 218–226.

- H -

Haley, L. E. (1977). Sex determination in the American oyster. Journal of Heredity, **68**, 114–116.

Haley, L.E. (1979). Genetics of sex determination in the American oyster. Proceedings of the National Shellfisheries Association, **69**, 54–57.

Hatt, P.-J., Davenel, A., Eliat, P.-A., Quéllec, S., 2009. Magnetic resonance imaging as a mean to assess the body growth and the gonad development of the oyster *Crassostrea gigas*. Aquatic Living Resources, **22**, 331–339.

Hedgecock, D., Gaffney, P.M., Gouletquer, P., Guo, X., Reece, K., Warr, G. (2005). A case for sequencing the Pacific oyster genome. Journal of Shellfish Research, **24**, 429–441.

Hedgecock, D., Li, G., Voigt, M.L. (2007). Mapping heterosis QTL in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture, **272**, 268.

Hedrick, P.W., Hedgecock, D. (2010). Sex determination: genetic models for oysters. Journal of Heredity, **101** (5), 602–611.

Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C., Bonhomme, F. (2000). Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. Animal Genetics, **31**, 71–2.

Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P. (2010). Reproductive effort of Pacific oysters: a trait associated with susceptibility to summer mortality. Aquaculture, **304**, 95–99.

- K -

Kooijman, S.A.L.M (2000). Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Cambridge University Press.

- L -

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M., Poulet, S.A. (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Diseases of Aquatic Organisms, **46**, 139–145.

Lander, E. S., Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics, **121**, 185-199.

Lango-Reynoso, F. (1999). Détermination de la sexualité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 139pp.

Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J.C., Le Pennec, M. (2000). Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture, **190**, 183–199.

- Larzul, C., Le Roy, P., Guéblez, R., Talmant, A., Gogué, J., Sellier, P., Monin, G. (1997). Effect of halothane genotype (NN, Nn, nn) on growth, carcass and meat quality traits of pigs slaughtered at 95 kg or 125 kg live weight. Journal of animal breeding and genetics, **114**, 309-320.
- Launey, S., Hedgecock, D. (2001). High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Genetics, 159(1), 255-65.
- Le Bras, Y., Dechamp, N., Krieg, F., Filangi, O., Guyomard, R., Boussaha, M., Bovenhuis, H., Pottinger, T. G., Prunet, P., Le Roy, P., Quillet, E. (2011). Detection of QTL with effects on osmoregulation capacities in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). BMC Genetics, 12, 46.
- Le Dantec, J. (1968). Ecologie et reproduction de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata*, Lamarck) dans le Bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes, 32 (3), 237-362.
- Le Deuff, R.-M., Renault T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of General Virology, 80, 1317–1322.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L., Berthe, F., (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. Aquatic Living Resources, 15, 251–258.
- Le Roy, P. et Elsen, J.-M. (2000). Principes de l'utilisation des marqueurs génétiques pour la détection des gènes influençant les caractères quantitatifs. INRA, Productions Animales, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 211-215.
- Li, L., Guo, X. (2004). AFLP-based genetic linkage maps of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Marine Biotechnology, 6(1): 26-36.
- Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V., Hedgecock, D. (2003). Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Molecular Ecology Notes, 3, 228-232.
- Li, R., Li, Q., Cornette, F., Dégremont, L., Lapègue, S. (2010). Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment. Aquaculture, 310, 234-239.
- Li, H., Liu, X., Zhang, G. (2012). A consensus microsatellite-based linkage map for the hermaphroditic Bay Scallop (*Argopecten irradians*) and its application in size-related QTL analysis. PLoS ONE, 7 (10) : e46926. doi:10.1371/journal.pone.0046926.

Lipovsky, V., Chew, K. (1972). Mortality of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) : the influence of temperature and enriched seawater on oyster survival. Proceedings of National Shellfisheries Association, 62, 72-82.

- M -

Mann, R. (1979). Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperature. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 59, 95–110.

Massault, C. (2010). Use of genomic information in mass spawning fish. Thèse de Doctorat, Graduate School of Wageningen Institute of Animal Science, 172 pp.

Maurer, D., Comps, M., His, E. (1986). Caractéristiques des mortalités estivales de l’huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d’Arcachon. Haliotis, 15, 309-317.

McGoldrick, D. J., Hedgecock, D., English, L., Baoprasertkul, P., Ward, R.D. (2000). The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. Journal of Shellfish Research, 19, 779-788.

Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A. K., Kjøglum, S. (2009). Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. BMC Genomics, 10, 368.

Mori K. (1979). Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Marine Biology, 53, 361-369.

- N -

Normand, J. (2009). Déterminismes génétiques de l’allocation à la reproduction chez les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) triploïdes. Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle, 226pp.

Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., Boudry, P. (2009). Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. Aquatic Biology, 7, 229–241.

- P -

Petersen, J. L., Baerwald, M. R., Ibarra, A. M., May, B. (2012). A first-generation linkage map of the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*): initial evidence of QTL for size traits and markers linked to orange shell color. Aquaculture, **350-353**, 200-209.

Plough, L.V., Hedgecock, D. (2011). Quantitative Trait Locus Analysis of Stage-Specific Inbreeding Depression in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Genetics, **189**, 1473–1486.

Plough, L.V., Hedgecock, D. (2012). High genotype-dependent mortality at metamorphosis in the Pacific oyster. Integrative and comparative biology, **52** (1), 139.

Pouvreau, S., Bourles, Y., Lefebvre, S., Gangnery, A., Alunno-Bruscia, M. (2006). Application of a dynamic energy budget model to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, reared under various environmental conditions. Journal of Sea Research, **56**, 156–167.

Pouvreau, S., Rambeau, M., Cochard, J.C., Robert, R., (2006). Investigation of marine bivalve morphology by in vivo MR imaging: first anatomical results of a promising technique. Aquaculture, **259** (1–4), 415–423.

- R -

Reece, K. S., Ribeiro, W. L., Gaffney, P. M., Carnegie, R. B., Allen, S. K. Jr. (2004). Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. Journal of Heredity, **95**(4), 346-352.

Ronin, Y. I., A. B. Korol et J. I. Weller (1998). Selective genotyping to detect quantitative trait loci affecting multiple traits: interval mapping analysis. Theoretical and Applied Genetics, **97** (7), 1169-1178.

- S -

Samain, J.-F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., VanWormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Gélet, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection process. Aquaculture, **268**, 227–243.

Santerre, C., Pascal Sourdain, P., Marc, N., Mingant, C., Robert, R., Martinez, A.-S. (2013). Oyster sex determination is influenced by temperature — First clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology, **Part A 165**, 61–69.

Sauvage, C., Bierne, N., Lapègue, S., Boudry, P. (2007). Single nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Gene, **406**, 13–22.

- 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, 272pp.
- Sauvage, C., Boudry, P., de Koning, D.J., Haley, C.S., Heurtebise, S., Lapègue, S. (2010). QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Animal Genetics, **41**, 390–399.
- Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T. (2010). Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. Virus Research, **153**, 92–99.
- Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N., Gouletquer, P. (1997). Ecophysiology of maturation and spawning in oyster *Crassostrea gigas*: metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. Aquatic Living Resources, **10**, 177–185.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P., Gouletquer, P. (1999). Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron. Etude de la variabilité spatiale, de son environnement et de sa biologie par un système d'information géographique (SIG). Aquatic Living Resources, **12**, 131–43.
- Steele, S., Mulcahy, M.F. (1999). Gametogenesis of the oyster *Crassostrea gigas* in southern Ireland. Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom, **79**, 673-686.
- Sweeney, T., Hanrahan, J.P. (2008). The evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction, and health traits in sheep. Veterinary Research, **39** (4): 28.

- T -

- Takeuchi, T., Takemoto, Y., Matsubara, T. (1960). Haematological study of bacterial affected oysters. Rep. Hiroshima Prefect. Fish. Exp. Stn. 22(1), 1–7. Transl. U.S. Joint Publ. Res. Serv. For Transl. Program. Bur. Comm. Fish, Milford, Connecticut (1965).
- Taris, N., Baron, S., Sharbel, T.F., Sauvage, C., Boudry, P. (2005). A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high throughput parentage analyses in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture Research, **36** (5), 516–518.

- V -

- Van der Veer, H. W., Cardoso, J.F.M.F., Van der Meer, J. (2006). The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. Journal of Sea Research, **56**, 107–124.

Verrier, E. R., Dorson, M., Mauger, S., Torhy, C., Ciobotaru, C., Hervet, C., Dechamp, N., Genet, C., Boudinot, P., Quillet, E. (2013). Resistance to a Rhabdovirus (VHSV) in Rainbow Trout: identification of a major QTL related to innate mechanisms. PLoS ONE, 8(2), e55302. doi:10.1371/journal.pone.0055302.

- Y -

Yamtich, J., Voigt, M.L., Li, G., Hedgecock, D. (2005). Eight microsatellite loci for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Animal Genetics, 36, 524-526.

Yu, Z., Guo, X. (2006). Identification and mapping of disease resistance QTLs in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. Aquaculture, 254, 160–170.

Yusa, Y. (2007) Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca—an overview. American Malacological Bulletin, 23, 89–98.

- Z -

Zhan, A., Hu, J., Hu, X., Hui, M., Wang, M., Peng, W., Huang, X., Wang, S., Lu, W., Sun, C., Bao, Z. (2009). Construction of microsatellite-based linkage maps and identification of size-related quantitative trait loci for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). Animal Genetics, 40, 821–831.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Los, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P. M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y, Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C. E. W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature, 490 (7418), 49-54.

ANNEXE 1 : EXTRACTION D'ADN AVEC LE KIT QIAAMP DNA MINI KIT DE QIAGEN

La veille de l'extraction, 180µL de tampon de lyse des tissus (ATL) et 20 µL de solution de protéinase K ont été ajoutés dans les tubes contenant les échantillons. Ceux-ci ont ensuite été placés dans un bain-marie (Julabo EcoTemp TW12) à 56°C pour la nuit.

Le lendemain matin, 200µL de tampon de lyse (AL) ont été ajoutés afin d'assurer les meilleures conditions pour la fixation de l'ADN sur la membrane de silice. Puis, les tubes ont été incubés sur une plate-forme chauffante (Eppendorf ThermoStat Plus) à 70°C pendant 10 minutes. Ensuite, 200µL d'éthanol absolu ont été introduits dans les tubes. Ceux-ci ont ensuite été passés sur un vortex pendant 10 secondes chacun puis dans une micro-centrifugeuse (SD Dominique Dutscher, 220 vac, 6000 rpm) pendant 10 secondes également. Le contenu des tubes a ensuite été transféré dans les tubes-colonnes (contenant la membrane de silice) du kit à l'aide d'une pipette P1000. Ces tubes sont passés à la centrifugeuse (Eppendorf 5417R) pour un run d'1 minute à 6000g à température ambiante.

La colonne est alors transférée sur un autre tube tandis que le premier est jeté. Puis, 500µL de tampon de nettoyage 1 (AW1) sont introduits dans la colonne avant une nouvelle centrifugation (1 minute, 6000g, température ambiante). L'opération est répétée avec le tampon de nettoyage 2 (AW2) et une centrifugation à 15000g pendant 1 minute.

Enfin, on ajoute 100µL de tampon d'élution (AE) et on centrifuge une dernière fois (2 minutes, 6000g, température ambiante) après une incubation de 5 minutes à température ambiante. L'ADN est alors stocké à -20°C jusqu'à son dosage.

ANNEXE 2 : PROTOCOLE D'AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR EN SIMPLEXE

L'amplification d'un fragment d'ADN requiert qu'un échantillon de 5 μ L d'ADN à 20ng/ μ L soit accompagné d'un mix de PCR dont la composition est détaillée dans le tableau suivant :

Réactif	Volume par échantillon (μ L)
Buffer 10X	1
dNTP (2mM)	1
MgCl ₂	0,6
Amorces (12,5mM)	0,75 de chaque amorce
Diamond Taq (5U/ μ L)	0,1
Eau bi-distillée	2

Les échantillons ainsi préparés sont regroupés sur des plaques de 96 puits et placés dans un thermocycleur pour la réaction. Le programme du thermocycleur est détaillé dans le tableau ci-dessous :

Etape du cycle	Nombre de cycles	Température	Durée du cycle
Dénaturation initiale	1	96 °C	5 min
Dénaturation	30	96 °C	30 s
Hybridation		T _L *	45 s
Elongation		72 °C	30 s
Elongation finale	1	72 °C	30 min

* La température de ligation (T_L) est spécifique des amorces utilisées (voir Partie I.2).

ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'AMPLIFICATION DE L'ADN PAR PCR EN MULTIPLEXE

Pour amplifier 3 fragments microsatellites distincts au cours d'une seule réaction de PCR, il est nécessaire d'utiliser un kit pour PCR en multiplexe (Qiagen Type-it Microsatellites PCR kit). La préparation du mix de PCR est détaillée dans le tableau suivant :

Réactif	Volume par échantillon (μL)
Mastermix	5
Solution Q	1
Mix d'amorces	1
H ₂ O sigma	2
ADN	1

Les échantillons ainsi préparés sont regroupés sur des plaques de 96 puits et placés dans un thermocycleur pour la réaction. Le programme du thermocycleur est détaillé dans le tableau ci-dessous :

Etape du cycle	Nombre de cycles	Température	Durée du cycle
Dénaturation initiale	1	95 °C	15 min
Dénaturation	30	94 °C	30 s
Hybridation		T _L *	1 min 30
Elongation		72 °C	1 min 30
Elongation finale	1	60 °C	10 min

* La température de ligation (T_L) est spécifique à chaque multiplexe (voir Partie I.2).

ANNEXE 4 : PROTOCOLE DE DOSAGE DE L'ADN PAR MESURE DE LA FLUORESCENCE

Le PicoGreen® étant photosensible, il est nécessaire de travailler le plus possible à l'abri de la lumière.

1. Préparer le mélange réactionnel

Mettre le kit Quant-iT dsDNA BR Assay (Invitrogen) à température ambiante pendant quelques minutes.

Diluer le réactif Quant-iT dsDNA BR (200X) à 1X à l'aide du tampon. Pour une plaque 96 puits, diluer 100µL de Quant-iT dsDNA BR (200X) dans 19,9 mL de tampon.

Dans les colonnes 1 à 11 d'une plaque 96 puits, déposer 2 µL d'ADN à doser par puits. Prévoir un témoin négatif (H₂O milliQ). Ajouter 8 µL d'eau milliQ.

Dans la colonne 12, déposer 10µL d'ADN dont les concentrations sont standardisées (gamme-étalon) à 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 et 100 ng/µL.

Dans chaque puits, distribuer 190 µL de Quant-iT dsDNA BR (1X) et homogénéiser le contenu des puits par aspiration/refoulement.

Filmer la plaque avec de l'aluminium adhésif. Laisser incuber pendant 3 minutes.

2. Mesurer de la fluorescence

Paramétrer l'ABI 7900 pour la lecture:

- Assay : Allelic Discrimination
- Importer la feuille de route au format .txt
- Add marker : picogreen (excitation à 510 nm, émission à 527 nm)
- Passive reference : none

Après le run, exporter les données au format .txt.

3. Déterminer la concentration des échantillons

Copier les données du fichier de données sous l'onglet « Source » du fichier de calculs fourni par la plateforme.

Soustraire la valeur de fluorescence obtenue pour le témoin H₂O aux valeurs obtenues pour les échantillons d'ADN.

Renseigner la pente de la courbe-étalon (le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995).

Les concentrations en ADN des échantillons apparaissent sous l'onglet « Résultats » du fichier de calculs.

ANNEXES 5 : LISTE DES 384 SNPs GENOTYPES POUR LES ARTICLES 1 ET 5

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
EST36-8bis	AAACGCTCCATGAGCAGGGAGGTGAATCCGGATCCGGTGCACCCAGCCGAAAGCTG	T/C	GGAAGATGAGGAATCCCTGGAGACCGGTACACTGGTCAGCGGAGCTTCTGAT	0,78
EST36-12	AGTATTTGATCGGACAAAATAAACTGATTTGGTTAACTGTATTTGTAGTCG	T/G	GGTTAGTACAGCCTCGGTATCCTAGTGTCTGCTGCTGGTAATATCTACAA	0,838
HEST36-22bis	TGCTCAGATGCTGGAAGTGAAGCAGGAGTGAACAGAAATGTGATCATTTAA	T/C	TTTGGCCCCATTTAAAACAACCTGCCAAATATTGAAGAACCTTCATYAAACATAT	0,97
HEST36-28	ATTGATGACGACAKTAACTGGGGATCAACCTTAAGAAAACCTTTTATGCTTACTCG	C/G	TTTGTTTAAAACAAGAACAATAAGGATATTTTCTYACACTCAGGAAAAATTTGT	0,758
EST36-29-1	TCCAGAAAAATGGACGCCGGAATCAAAACACTCTGTCCAAATGTCGCCATATTT	T/C	TGGTTGGCAACAAGAAAAGATACCGAAGAAAGACCCCAACACACAAAAAGAGCT	0,918
EST36-29-2	TCTGTCCAAATGTCCCAATTTCTGGTTGGCAAAGAAAAGATACAGAAAACGA	T/C	CCCAACACAAAAAAGAGCTCAAAAAAAGCAAAACAGAAACCAAGTCAAAATCGC	0,975
EST36-31-1	CTCAATGCTGCCAACATCCCAACGACAGATGGCTCTGACTCCACCCCTATGACAA	T/C	GAGCATACACATGTGAACGACGTTGGATGTTCTGGTCCAGATGGGTTAACTCC	0,911
HEST36-31-2	ATGATGACATGCCAAAAGCAAGCATGCCAAGGTACCCATCCCTACAAACACAGCT	T/C	TGTTTATCTRTGTACCCATAGCTTTAAACACTAATACATTTATTTTACTGTTTTCT	0,698
EST36-35	RGAAACCTGGCAATATGGTTCTTCTCAATGTTGCCTACACATCCAGCATTTCTC	T/C	CCCTCAGTCCGCCACATCCCAAGTGCAGTACATCCATTTGTCTAGTCCAGAC	0,909
EST36-36-1	ACTGTCTACCTCATGTAAGAAACAAAAACCCAAATCTCCGAGAACCTTACGAAT	A/G	TCATAAATACTTAAATCACATTTAAATAAATACTATAAAATTTTAAAAGAATTTGGTGA	0,66
EST34-6	GTAACAAAATAAATCTATRTCTGCAATTTGATTAATTTGATATATAAGGTAATG	A/C	TTCAATGCCTATAGAGCAATAATACAGTATTATAGTCTTTTATAATTCGTTTT	0,562
HEST34-8	GCATAGGAAACAATTTACATGTATGCATGTTTCTGTCACTTTAACTTTACCTTG	T/C	TCTAAAAGATTTGTTTACTGGTAATCAATGTTAGAATAACATTTAAAACCTGG	0,628
EST34-14	TCAATACATAAATGCACAGCAGCTGTCTGCAATCTGTGCAACACTTCAAGG	A/G	GTAATACAGGTCAAGTTAGAATCCAAATGCTGCTCAACAAAATCAGCAAGGT	0,956
HEST34-17	CATGATGATGCCACCAAATAACAATGCCAATATGCTGAACAAATTTGATACCAGT	T/C	AATTTGGCAACAGAAAACAATGTA GCCAGGAATGCCAATATGATGAACGCCG	0,937
EST34-19-1	TGATGGCYAAGCTGAAGGGTCAGTCAACTCGGCTTCAAGAAATGGCTGTATTTTC	A/G	GTATACATTTGCTYATCTTTTTACGCGGTATGGCAGTCTCTTTGCTTTTTAAGA	0,569
EST34-19-2	TGATGGCYAAGCTGAAGGGTCAGTCAACTCGGCTTCAAGAAATGGCTGTATTTTC	A/G	GTATACATTTGCTYATCTTTTTACGCGGTATGGCAGTCTCTTTGCTTTTTAAGA	0,569
EST34-19bis	TAAATCATCAACAGTCCAGCCTTTCTTACTGCTTTTCAATCATGGACATTTCTCATATT	T/C	AGCATGAAATTTAGCCATCTGAAATTCAGCAAAAATGAAATTCATGTTTTCAA	0,938
EST34-20bis-1	GCGGGTTTAGGGATGGCAGCCGTCGCCCTAGCAGCCGTGATGACCAATTAATACCC	T/G	GATGATGACAAAAAATCGAGCCATACCAGAAACGAGGYTACGACCCGAAACAC	0,935
EST34-21	TTGAGTTTATCACCCAGCTCCTCCAGATGCTGCTGCCAGACRTGCTGACTC	A/G	CTGTCCGTCCTCACTCTCAGGCTGCTGTTTCTTAAATAAAAAAAYATTTCTCT	0,406
EST34-23	CTATGATGATAYTCTCGCCAGGGTGTAGGGCTCCCCGAAACCTGGTGGGGTTC	A/C	ACCGGTTCCCTCCGTTAGCTGCTTTGTTCAAGTCCCGTACATTTGTTAAGCACT	0,523
EST34-25	CCGGCTAACCTTCCCTATGATCGAATATAATCGGGTCAAAATCCGGAAGAGTTA	A/G	TTATTCAGAAAAGTTAGACTTGCCTTAGGGCCCCCACCCTAAAAATCTTTTACT	0,992
HEST34-26bis	GWAMAATAGTGTGTTTACCTGGATGAGACCCATACCATGCTCTGTTGCAGAGAT	A/G	GTTACTTGGGATGGGATGGTYGGAAGCTTAGGRTAAACAAATGAGAGCATG	0,794
EST34-30	TCTATGCTCAGTACAGATCCATTGAACCCGTCTGAAGAAAAGGATGGCAGTGA	A/C	AAGAACAATGGAGCAACAGTACCTACAAAACACAGGGGACAGGGCTAAAC	0,967
EST104-33	CCTTTGCCTTTCCAACAATCTTTCTCTATGAAAAGTTGAAAGTTGTTCAACCTGTGA	A/G	AAACATCACTGGCCATAGATGTGGACCTGTTTCTTAATACAGAAAATTTGGAG	0,902
EST104-36	ATCTACTGGCAATGGAACAATTCCTCWATGTTATCGACTATCAGAATAGTGCCTTC	T/C	TCAGATTTGTTTCAGACAGCATGAACCCGACTTACTCGTTTTTTTGTGATCTACAGA	0,946
EST104-40	TAAACACAATAAATTTTAAATCTAATTTGACAACTTATATTTATAAAGGGACACTT	A/C	TTATCCAAATTTCACTAAAACCCACTTTCATGACTCAATAATTTGTAATTTCCGGA	0,794
EST104-41	TGTTCTTTATTTCTGTCAAAATGAGACRTGACWGATGTAACATTTT	T/C	AGACATCAAAAATAATGTGAATTTGAAAAGATGATATCTGACAAAATATTTT	0,454
EST104-43	AGGAGAAGGGATGAAATGCAGAGAGCACAGGAGGATGATGTCCTATGTTGC	T/C	GAGCATTTCCGTCGCGGAGCCATGAAATCTCACAGCCGACGAGAGAGCTGC	0,802
EST104-48-1	AAATTCGGGTGGGGGTCTGTACATTTTGTATGGRTATACTGCACCTCAGCCGAC	T/C	GTGAAAACGTAGAAAAGATCCCGCTGACACAAGATATCTGGAACAAGATATTGG	0,83
EST104-48-2	TGTTACCCCCACACAATTTCCAAATTCGGGTGGGGGTCTGTACATTTTGTATGG	A/G	ATATACTGCACCTCAGCCGACYGTGAAACCTAGAAAAGATCCCGCTGACACAAGA	0,837

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_CU989483_785	GAAGAAGTTGCTGAAAAAGTTGAATAAGCTTCAGTCAGGAAAGGAAAGATGGAA	A/G	AGTAAGCAAGGACAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGTCCAG	0,965
snp_AM858440_329	TTAAGTTTAAGTCAGAAATAGAACTGATTTGCTCATCGCTGGGAAATTTAAAGC	A/C	GCAACACAGTGAATTCACAAAAAGAAATTTGTCAAATGGAATGACAGAATT	0,96
snp_AM863641_406	AAGGTTACCCAGACTCAGAGAATACCTGGGAAACAGAAAGCAAAATTTAGATTGTCC	A/C	GACCTTATAGCAGAGTTTGAGGAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGATCAAGAGAAG	0,917
snp_AM866950_152	ATAAAGATCTTAAAGAAAAAAGTACAGAACTTGAANAACAGATACGAACTCGTAC	A/G	AAGGCCACATTTGCCACTCTGGAGGGCAAGGTCCTAAATCTTTGAGGAGCAGTT	0,966
snp_EW779181_638	TCTCTTTGGGGCTTTCATGCAGGTGGTGAAGACATGTAAGAGGGTCAAGAT	A/G	TACTTGACAAATCCAGCATCTCCAGCATTTGGCATCTTGGACCAATTTCTTTGTCT	0,927
snp_EW779181_749	TCTCCAGCTGGGAGCCACTTCTCATAATCACCTTCCAGGAGCTTTCTCTCCAA	T/C	TCCTTATCCTCAGCTGTGAGTTTCACTCCCAATTTTTAGCCAGAGCAAGTGATT	0,933
snp_EW779181_818	TCTCCATACGGTATCGCTGAGCAGTTACGGGGGATGGAAGATGGATGACTATCAT	T/C	TGCAACATGGCATCTCCAGCTGGAGCCACTTCTCATAAATCACCTTCCAGGAGC	0,964
snp_AM854315_392	TTTGATGCTTCGTTTGCCTAATGGAAGACAAATTTACAGTATTTGTAATGATGA	A/G	CACCTCGTTGATTTACACATCTGGGAATCTGACAACATTTCTGTTCTGGT	0,781
snp_AM858313_325	CAGTCGGGAAAAATTTGCAATTTGATCATCCATGGAAGGCAAAACAGTGAAG	T/C	CCTGAACAATTTAAAAAATAGCAGTGAACCTGACTGACTGAGGATACTCTCACT	0,98
snp_CU683469_37	TTCCITGCTGATAATTTGCAATTTGATGCAATTTCCACTTTATCCATAAAGTGGAT	T/C	GATTTTGAAGGAAATCTATTCACATCTTTTGGTCCATTTTGGTCCATTTAGGAGAAG	0,919
snp_CU997393_573	GGACCTTAGGGTGTGTTTAAATGTCATTTGAGTTTGGTGGTATAATTTCTTGCAGCA	A/T	TAGCATTTTTTAAAGTCTTTCATGACCGGATGTTGCCATTTTGTCTCTATA	0,736
snp_BQ426370_37	TAAGTGAGGCTTTCATATATGGAACAGTCAAGCTTTGTAAGAAATTCACATAGCTAA	C/G	GTCCTCCACACAGAAATGGCAGAAATCCAAAGACTTACACAGACAAATTTGA	0,985
snp_AM864952_331	CCTACTCGTTATGGTCACTGGGAAAGAAAGGGCGTGTGACAGACTTTTGAACA	A/T	TAATGCAATATTCAGAGCACAATTAATAGCAGTGTCTTCAATTTTTGGTGAATCT	0,992
snp_AM862882_512	TCTATGCTCAGTACAGATCCATTGAACCGTATCTGAAGAAAAAGGATGGCAGTGA	A/C	AAGAACAATTTGGAGCAAGCAGTACCTACAAAACACACAGGGGACAGGGCTAAAC	0,967
snp_BQ426570_128	CTTATCAAAAATTAAGAAATGAAATGACCCCACTTAACTTTTCGACGATCCTGTGC	T/C	GAGGGCATTGTGGCTTGTTCATTAATGAATATTTGGTGAAGCAACACACATTTGGC	0,945
snp_AM853758_293	TGAAGAGAAATAGAAAGCGCTACAGAGATTTGCTGTTTCAACTGACAAAAAGCCTT	T/G	CAGAGAACAATCAGTGGGTCATCATGTTCCATGAAACATTTTATCAAAAAACC	0,943
snp_BQ427044_327	ATGTCGCGTGGCAGGAGTGTACCTAGATAACGCCCGCAAAAGCTAAATGTCCG	C/G	TGTGTCGAGCAATGTACCCAGAGCCCGACCCAGATATATGTTGTGCAGCAA	0,757
snp_CU992694_436	TGTTTGAGAAATGAATTTATCAATGCGAATGATATGTTACAGAGATATGGAATAC	T/C	GGTAGGTTACAGTGTACTGAGGAGGAAATTTGAACAAAATGGTGTCTATGA	0,791
snp_CX068989_311	TGGTATGTTTTAGCAGGCTACAACATTTTATTTGTGTGACATATCTCCATTAC	A/T	GTGTATGATGAACAACACACCAATTTCCATGATCTGTTCAATTAAGTCTCTTTT	0,911
snp_AM859871_333	TCCATCACAGCCCAGTCCACATTCATGACCTCCAGGATCAGGGAACAGATATT	A/G	CGTCAAGGACACTGATGATGTCCTGATTTGTCCTCAAAACAAAGTACGGGTGAG	0,958
snp_AY165040_178	CAGCCCAATGTAAGACCCCGGCTTACAGACTAGAACTACTGACAGGGCCCTTGA	A/G	TATGCTACAGAAAGTGGCTTGGTTATAAAGCAGAAATGACCCATTTGTGAG	0,932
snp_CU682177_248	CCAGGCCCAATAGGGGAAATGCAAGTCTTCCCTAAAGACGATAAATCAAAGCC	A/C	TGTCATTTAAGCGCATTTTCAAAGCTGGTCCATCAAAGGAAACCTTTGTCTAAACATGT	0,865
snp_AM863098_171	ACTCTTCAGTGTCTGCTCAAGATCCAAAAAAGTCTGCGGACAAAGCTCCTGTCTC	A/G	AAGAAACCTATTTCAAAGCTGGTCCATCAAAGGAAACCTTTGTCTAAACATGT	0,983
snp_CU683857_112	TCTCGTCCGTTGTGGTCAATTTACCAATGAAAAACCCATCGAATGAAAAATGT	A/G	GCAGAAATGTTTTCCAAATGGTGAAGTTTCGCTCATAAAGAAATCTAAAGACC	0,945
snp_EU678313_434	GTGAAGTTTCGCTCATAAAGAAATTAAGACCGGAAAGTCAAGTCCCAAGATGT	A/G	AAGAAGCATGCCACTAAGCATCTGAAATTTGGTACAACAACCTGTGCTGTGGT	0,901
snp_CU684921_209	GGACACGATTCCTCCGCCCCACACTTGGCCCATCATGTTTCATGCTCCTTACCTTCC	C/G	CTCGGACCATCGTCGCTGTGGGGTTATTGATAAACAATGGACTACAAACCCGGT	0,9
snp_CU988526_293	CCATATGCAGTACATGTGAAATGATGGAACAAGATAGATGCAGCTAACCTTCC	T/G	CAAGAAGTAAAAAGATAAATGAAATCGGCTGATTTCTGGAAGAAGAAAGCTCGCTGG	0,914
snp_CU984479_305	TTTTCCGCGCTTCTCAAAGTCTCCGATTTCCGACTGATCGGATTTGTGAGA	A/T	TGAATGCGGGAGATGAAGACATAATCAACAATCCAATCAACCAAGAGCGACTTT	0,844
snp_CU994620_455	TTCCGTTAGAAAAAATGAGTGTGATTAAGAAAACTTTATTTATGATTTTTTC	A/T	TGGTCTGAAGGTAATCAAAATATATGATGGAAGCGCATTTGCTTTTATAAATA	0,596
snp_FP001306_426	TGTTGATTACTCTTTGCGTGAATAACTATGCATACTTAAAGCCTATCTGGCA	A/T	TTCCGTTCTTATGATTTCAATTTTTTAGTCGATTTTATATTATCAATAAATAA	0,947
snp_FP008781_161	ACGGTGTATATGGATTTGTGTAATCCGCTTCTTCCGAGAACTTTTGAATACG	T/C	GGCTTTGTTGTGATGTAATTTGTTGATGTTAAAAAACCCTGCTTTTATTAGCA	0,947
snp_CU999925_301	AATTGAAACTATTGTCCTTATGAGTATCACAAGTTTGACTTTTGTACTGTTGATG	A/G	ATCGGACTCCCAAGTGGAAATCTAGGTCAGGTGGTGTGGTGGAGAGGATA	0,97
snp_CX068955_187	GTTTTAAATGGAATAATAATTTCTCTCATGATTTTATGATAAATTAATAATAGCAATG	T/G	TAATTTGCTAAGAAATTTTATTTTACATTTGAAAGAGATACTCATGATATTGTGAT	0,412

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_AM854801_566	TTTCCATCAGGACATTCAAAATTTTATCACAAATGCAGCAGACATATCAGGACAT	A/T	TAATAGCTATGGCATGATATTTATGTGAGAACAAAATCGTGAGAAAATTTATC	0,937
snp_CU684608_65	AAAAAAAATCCAAAATACCTTATGATATGTATAGCACTGTAGGTGG	T/C	AAGGCAAAATCGACAGCAATCAACTAAAATGATAAATAGTTACTATGTG	0,998
snp_CU685863_5	CAAAAATCGACAGCAATCAACTAAAATGATAAATAGTTACTATGTGCAGCAT	A/G	AAGTACTGGTAGTAGTAAACAATACCAAGGGGACCCGTGCATGAACAGTGC	0,67
snp_CU991735_307	AACATGGTGGACATTTGAAGATCTGGGTGAGAAGGTCACTATTCAGGTGTTGG	A/C	GATCAAAAAGTTCCTCCCTGTGTGATGGCAGCCACAACAAGCACAATGAGGA	0,895
snp_AM868054_79	CCCTGAACGAAAGAAAACAGCTGGAAGATTTGGTCAGTATGTTGGTCAAGTGCCT	A/G	CCCAGGTATGTTCCAGAAAGTGCCTAATGTCTGGGGACGAGTTGGAGATTC	0,903
snp_CU997918_398	GTGACGTTGAGGGGTAGAAGAAATTCATAAATTCATAAAGCTGATCTTGA	T/C	CCAATCTATTTTGGCGAGCTCTGAAAAACATGCCCTATTAAAGGATGACGGAGAT	0,979
snp_AM867415_381	GAAGATTATGCCCTCCGAAATTTAACAAAAGTAAAATCGGACTTTAATGCCTCCC	T/C	GATCTTTCCAAAAGCTGAGGGTAAGCTTCAGCAGCTGTAGCAGAGATCGGGC	0,908
snp_EW777711_499	ACTCAGAAATCATCCAAACACTTCATTCGATGAAGATTACATCACTCTCTAAAA	T/C	GAGAAAGCTACATATGTAAGTGCCTTTGAAAAATACCGTTCCCTATCTACTCT	0,793
snp_FJ347728_1147	CTGACGAGAGGGACGACTTATCTGGCTGATGCTGTGTTATAGTGAACAGTT	T/C	AACCTTCCCTCATCTAGACATGGCACTTAACAGGTGCAATAGATGTTGCT	0,745
snp_FP008372_101	TGAACGAGATCTAGCAGACGCGCAATGGAAGTAAATCGAAAAATACCTT	T/C	ACCAGTGGGCCAACGAGCCTGAAACTGAAACTGCAACAAGAAATATAAATACTT	0,929
snp_FP090947_291	GTTTTGCGAGTTACTGTGAAGAAATGTATTTTTCTGGAGAAAGACTTTAT	T/C	TAAGCACAAGTGGCTGCCATATAAATATCCAGGGAAATTCACATGTGACT	0,978
snp_FP090949_87	TAGTTCACCTTGAAAAATACAATAACATACATGGACATGTTGAATGAATTC	T/C	CCTTTTCTTTGTTTCAAAACAATAAATATTTGCGTTATATGCACTTAATCAA	0,936
snp_FP091149_98	GGAAATGATATATCCGGCATATATGATTAATAACCGCATTCATCAAAAAACAGA	A/G	AAACATCTCAAAAATATCCCAAATTAACCTCAAAAATGCAAGCTTCAATTCATTTAT	0,979
snp_CU995994_511	ATCAAGCACACTCTACTTAAATACATGTAAGAAAGTAAACAGGTTATCAAAAATATTGT	A/T	AAAAGTCTTCTAAAGACACAAAATGACATAAAAATGGAGGGCATTTATATATTTT	0,683
snp_CU995994_561	TATTTTAAAGTCTCTTAAAGACACAAAATGACATAAAAATGGAGGCAATATATAT	A/G	TTTTATCTATATTTGATATACTTTTTATATTCAGGATTTTGTATAAATAGAAATTAAGT	0,484
snp_AM858680_74	ATGTTTGAGACAGCCACCTCCGGTCAGGATTTGCTGCAAGACTCTGCTGGTT	T/C	GCTGAGAGGGTAGAACACATGCTGAGAGAAGCCATGAGCACTTCTCAAGATG	0,92
snp_CB617405_591	GAATGGACATGAAAAGAGTCAACATCGTATTTAACTATGACATGCCAGAAGACTC	T/G	GACACTTACTTGCACAGAGTGGCTCGTGCAGGTAGATTTGGAACAAGGGTCT	0,964
snp_EW778458_567	CTGAAGAAGAAATGCCCCACATTTGTTGGTACACCTGGTAGAATCTIAGCCCT	T/C	TGCCATTCAAAAGTCTCAACCTGAAGAATGTCAAGCACATTTGTTCTTGATGA	0,926
snp_AF075691_1372	CTGAAGAAGAAATGCCCCACATTTGTTGGTACACCTGGTAGAATCTIAGCCCT	T/C	TGCCATTCAAAAGTCTCAACCTGAAGAATGTCAAGCACATTTGTTCTTGATGA	0,926
snp_AF075697_181	AATACATGAACGATCAAAATTTTACTTCTCAAAATGGTGGAGAAATGACGCAAT	A/T	AAAATGGCCGTAGTGACCACAGACGGAGAAAACAACCCAGGTGGCCGTGATA	0,843
snp_AF075697_97	ATAAGACAAAACCGGGTCTCGGTGCAACACAAAACATACACACAAAAGG	T/C	GATGCTACTAGAACTTACAAGGCTTGGAAATACATGAACTCAAAATTTTACT	0,874
snp_FP091137_183	CTTTGATACGAGTCCACTTCTTACGATATCTTGGTACACATATTTCTCC	A/G	ACAAAACCCAGGTTGGGCGTTTGGTACAGTAACTGATCAGACCACAGTT	0,886
snp_AB122064_98	CAGCACAGCAAGCCATTGGAATAGATCTTGGTACACATATTTCTGTGGAGT	A/T	TTCCAGCATGGGAAGTGGAAATCATCGCCAAACGATCAGGTTAACCGAACCA	0,891
snp_BQ426928_115	AGACCTTCTCTGCTGAGGAAGTCTCATCCATGGTCTCAATAAAAATGAAGGAAAC	T/C	GCAGAAGCATATCTTGGCAAGACAAATTAACAATGCCGTCTCACAGTCCAGC	0,832
snp_BQ426928_40	TGAAACATTTGGCCATTCACAGTATCAATCAAGCAAGTAAACCCATGATCAAAAT	A/C	GAGTACAAAAGGGGAAAGAAAAGACCTTCTCTGCTGAGGAAGTCTCATCCATGG	0,928
snp_EW779028_227	ACGATCAGGGTAAACCGAACCCAGTATGAGCGTTTACAGACACAGAAAAG	A/G	CTGGTCCGCGACGCGCAAAAACCAAGTCCGCTGCAATGAACCCCAACAACAAT	0,804
snp_AJ563464_101	TCTCTTCTGCTTTCTTAAAAAGCAAGGCAAAATGAAGATTCAGACTGGGCTCC	T/C	ATTGTGAAGCTTGCCTCAAAATCAATGAGCTTGTCTCCATATGATGACTGGTA	0,908
snp_AM863710_107	TGGTTTTAGCAGTTCTGATCAGCTTTGCTGTTACAGTTTGTCTGAGGAGGAGAA	T/C	GTTGCCAGACTACTAGCATCAAAAATGTACTAACCAAGTATTTAGTGGAAAGG	0,892
snp_AM866419_269	TTGAAGATGTTGGACATTCATGATGCCAGAGCTGATGAAAGATTATTAAT	A/C	GCGAACTTCAACCGATGATAAAAAGGAAACATCAGTAAAAGCCAAACACCTC	0,965
snp_CU682053_467	TGGCTTCTCAGCCGACACCGACAGATTGTCTGGATCCAGAGACAAAATCCAT	T/C	AAACTGTGGAACACTCTTGGAGTCTGAAATACACAATTCAGGATGAGGGTCA	0,92
snp_CU684465_50	AAGCGAGAGACCATGGCAAAAAGAAAGAAAGTGGGAATTTGGGGGAAATA	T/C	GGAAACCGATATGGTGCCTCTCTCGTAAACCATCAAAAAGTGGAAATGCTC	0,72
snp_AJ565506_195	CTCTGGACGTCAACCATGATGGCAAAATCTCCATGAGAGCTGAGGAGTCCAG	A/G	AACAAAATCACCAACTTACAGCTGTTGGAGACAAAAGCCAAAGGTTGCCA	0,904
snp_AM858800_222	AACTGTTAACAAAACAAATGTTCACTTGGTAAATTTCTTAAAGTTATGTACTGATTTAC	A/G	AGTGTCCACTTACATGTAAAAGACTTTAAAGGAAAAGGAAAATCTCTGAAGTT	0,585

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_AI565627_213	CCGCTTTGGCCAGCTATACACCAAGCTGAAGGAAACAACCAAGGCATAGAAAT	C/G	ATCTTCGTACGTCGGACCGCGAGCAAAACAGCTTCAAGGAGTACTTCAATGA	0,601
snp_CU998226_258	CTTCTGCAGAGATTCAACTATACATTAGTACCTGACACCACTGATCAGTACA	A/C	GTTCAATAAAGGTCACTGACCAAAATACAGGTGATACATCTCTCCCGGATT	0,955
snp_AM855912_584	AAGTGTAAATGTACCAATGCAAGAGTACTTTGTGTATCCATACAGCCTTTGATA	A/C	CAGTTTTCTTGGTATTCCTGCTGTATTAGATTGTTTTCTATTGTCCACCTTTTTT	0,913
snp_AM858494_211	GGCATCTTCTCGACCCAGGTCGGTTTTACGCACAGATAGCAGTGGCCAGTTTCTT	A/G	GGTGGACTTATTTCCGCAATCGTTTGGAAATATTGTTGATAACAACACTAAGAACTCGT	0,911
snp_CU683122_402	CCATGAAGGAAAAAGAAATAGATAAGGATACGGTCAATGGCTATCATGACTTTGT	T/C	CAGACTCAGATCAGGGGCGAAATTAATGGCATCTTCTCGGACCAAGGTCGGTT	0,828
snp_AM853841_102	ATTTGATAGAAATGGCTGATGATGCAATGAGCGAATTAACCCGGAATATTGTA	A/G	GGATGAACAAGTGGCACTGGTAAACACTGTCAAAGACGCAACGCAACAAGAA	0,974
snp_AM853969_249	ACGCACCTTTCTCTTTAAATCAAAAGACCAACAAAAAGTTGAGTTTTCAAAATA	A/G	ATTTTAAAAATTTATGAAATCGCCCTTCTCCAAATTTGGACAGAAAAATGTGAG	0,947
snp_AM860523_155	ATATTTGGTCAGATCTCCCATGAGAAAATGGATGCCTCTTCCACATGGC	T/C	AGCTGCAAAAAATTTGTCATTATCCACAAAACACTGCATTGAAAAAATGCCAACCTTA	0,946
snp_AM854342_374	GCCAGAAAGGCCTTGTAGAAATTAATATCGCACAAACCAATGAAAAGATGCT	T/C	TCGATCTTGAAGGAGAACATAGTTCCITTAATTAATGGAATTTGGTCTGAAAG	0,963
snp_CU994616_9	TTTTGTCTGCGGTCGCAGAACAGGAATGAAAGATGAAAGATGCT	A/T	TTGCATGGAAACATTAAGAAGAGGATATTTGGTGTGCTTGGATGCTCT	0,931
snp_AM857059_211	TTTTGCTTCTGAGGTCAGGAAGTCTTTGACCAATATGCCAGCTTCTCCA	T/C	GAGCGATCCAGGGCTTGACATCAGGGTGACAATTAACCCACCCCTCGGG	0,758
snp_CU684236_290	ATCTACGAAAAATTTGACCAACAGCCTACAACCTGTTTATTTGACGACGGATTTA	T/C	GTCTTGTCTTCTTCTCTCTGCTGTCACAAAAGAAATGAATCCAAAAGCCAGCT	0,919
snp_AM854469_343	GGTAACATCAGAGATATTTACATCAGATCTACAGTAATAATTTTGTGAGTATGT	T/C	GTACGGAAATCCACAGTGTGAATAGGACAACCAATCACAAGTGTGAGCTGTTTCA	0,784
snp_CU682241_333	GTTTTCTGGCTTTCCAGGTAGAACAAATACAGATTTGTAATAGATTTCCAGGCTTAT	T/G	CAATAATGTACCTTGTAAATAGTAAATATCTGTGGACTTTTGGTGCATTGTAAATTT	0,408
snp_AM854612_119	ATTTAGAGCAGCTTTACAAAATTTGACCAATCAGGAGATTCGTGACATTTACGGGCGC	A/T	CCTCAACAAGCATGCCAAGAGAATTTCTCACGCTCTCACTTGGGTGAAAAAGAA	0,788
snp_AM854683_330	AACAAATGCATTTACAATGTTGAGGATCGCACAAAGGATAGAAATCCAAATATCCTCA	T/C	ATGGACAGGGTACTCTTCTCCGTCGGAATTTCCATCATGAGACCTCTAAATAT	0,988
snp_AM861565_95	GATATAGATCCACGATAAAGCGCACAGTCAAGATCAGCAGAGATGAGTTCCAC	A/T	GATAATTTCAAGCTTCCAGAAAAAGCCATAAAGGACTTTGAGGAAATATGGATA	0,935
snp_AM856693_352	ACCGGAGGATAGCCCTTATCATGAGGGGAGATTTGGCTACGCACTGACTTCCAC	T/C	GCCGACTACCCATTCGCTCTCCAAAGATAATTTCTCTAACAAAAAGTGTCCAC	0,7
snp_AM861654_152	TGAAAGGATTTCTTACAACATAAGCGACAGCAATCATTTTTCAAACACTCC	A/G	ATTTATTTAAITTCGGTCAAAATTCGTGATGAAATAATCGCGAGTATTCCG	0,944
snp_AM854833_563	CACCCAGAAATTCACCAAAAGTAAAACCAATTTACATGATTTGAAATCACAATGAAAA	A/C	AAGGAGTAAACCCAAACACTCCAAACATGCCAGATTTGAAATCTGGACTTTC	0,887
snp_AM854835_518	GGAAAAATAACCATTTTAAAAACATTTACATGATTTGAAATCACAATGAAAA	A/T	TGTACTTGTGAACTCATTGAAGATATTTATGATTTTTTATTTGTCATTCATTG	0,904
snp_AM861154_365	AAGAAATTTACTGAAAGATAGGTTAAATTTGATATGTTTAGCAAAATTTGA	A/T	GTCAATGGGAAACAACGCCACCCCACTGTACAAGTATCTGAAGGCCAAGCAAG	0,957
snp_AM858867_164	TGGAGTTTACAGATGACGAGATAAGATGAAATTTCAAAATTTAGGTTACAGAA	T/G	CATCCCTAGTGAGAGACTCCAAGAGTTTAAAAAGATTTGAGAGTGTCTTATAC	0,899
snp_AM855102_290	CATTCAGAAAAATTTCTATGAACGTGGGGATTTTCCAAATTTGCAATTTGAAACATGACAC	A/T	AAAGGAAAAACAAAAATTTGCATGGAAAGGTTGAGATTGAAAAAAGTATACCATC	0,881
snp_AM855102_431	AAAACAGCACCCCTATGAAATTTTCCAGACAGGGTGTTCATGATGCTAGA	A/G	CATGGCGGTTCCAAAAATTTACCTGTTATACCTCAGTTTAAATCATCCCAATAAA	0,962
snp_AM855277_64	ATTTAGGGCGAGAAAAACACTCAAATAATGAGTTACCTGATGAAAGCACCAATAA	A/G	CCAACAGGAGACGATGATTCGTTAAACCCAGCAACCCCTGATTTGTCCACCCTG	0,894
snp_AM861389_162	TTTGAGAGTAAAGCTCAACATTTCTCCAAGTCAATTTCAACGAAACTTAAAAAT	T/G	GGATTTCTCGAAAAAGAAATTTGAACAAGACAAATTTAAGGAGTTTTAAGACCATGG	0,912
snp_CU685076_185	TTACACCCGAAAGATATAGCAGACGAAACTAAAAGAAAAAGAGCTTATAAACGTTT	A/G	GAGGAACACTTCAAAGATGAAGACTTGAATTTCAACCAAAATCGAATACCCCTA	0,895
snp_AM856019_65	TTTCCAGTACCTGCCCAATGATTTTTGATAAAAAATGTAATAATTTGTACATCAT	T/C	CGTAATCCCAAGGACATCGCTGTGCTGTTTTACAACCATCACAATAAA-CTTCT	0,96
snp_FP000502_586	GGCCGACCCCAATGATGGCGGAAATGAGGGTGGTATGATGAGGGGAGGACC	A/T	CCACCAGTATGAGAGGTTCCCTCTGGCATGGGAAGAGATAGACA-GACA	0,841
snp_AM867000_546	CTATATGGGATGAAACAGGAGATCTTCCAGACTGGAGATTTGCCGCTTAC	A/G	AAAGGATACTCAAATGTTTTGGAAGAGTTGTCTAATTTGTACACTGGAAAAATC	0,683
snp_AM857062_374	GGGTCAGGAAAAAGTATAGATCTTGGCACTATGTACTACAGAGGGCATCAGC	C/G	GCCATTTATGTTACGACATCAAGGGGAGCCACTTATAGAACAGTAAAGGA	0,938
snp_CU684876_164	TCTGTATAATTTCTTTCATCAGCTGTAGAACACGATCAATTTTGGAAACACCCCAA	T/C	TCTACGCCAAAAAAGTGGCCCAACCAAGGAAATAGACCTACAGCCCAATCATG	0,766

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_AM856753_332	GAAAAATCCCAGTCTTACCAGCACACCAGGTACAGGGGGATAATACTGCTACACA	A/G	GCATCCTCAGACAGCAGTCCAGTCAAACGACGACAGGGAGACCCGAGGGGG	0,956
snp_AM8564311_279	GACCAGACTACTTCAACTCAGTTGTTATCGATACACAGTCTAAGCGAGGAAGAAG	A/G	AAATCCAGTCTTTACCAGCACACCAGGTACAGGGGGATAATACTGCTACACA	0,914
snp_AM8564695_282	GAGACTGGGAGGAGTAGGTTCTTAGATCCCGGACCAACAGTCTTTCAAATA	T/C	GATCATTTACGAAAAGAAAGCTACAGAGGACGAGCCAGCTAAAGTAGACCCGG	0,973
snp_CU986490_316	ACTGTCTAAAGACGCATATAAACAATCTAGAGGAGATAAAGTCTAAAGACTTCAAG	A/G	ATTTCCCATTTCTTTGAGCTGACAGAAAGAAATGTGTTTCATATTTACGAAAGAAA	0,892
snp_AM859119_174	AGTTTAAACGCCACCACCATCAGCAGATGTTCCGGCAGAGTTAAAGATTCCAATG	T/C	ATTCAAAGAGGAAGTTAGCAACAATCAGGCCACCTTTGAAGAGCTGCATAGG	0,947
snp_AM857471_352	TCAAGATGAAGTCAGACTTGTCTCAAAAGGCAGCTATTGCGGTTTCAAGGAAAGC	T/C	CTGCAGCAACTTATCCAAAAGAGATTGACATGTATGAGCAGGAACTTAGCTT	0,909
snp_CU681722_367	AGGAGACTCAAGTTTAGTCCCAACCAACAGAGCGGTGCTACCAAGTTCAA	T/C	GCCGGCCACCATTCCACAGCAAGGATTTCTCTTCTGATCCTCCACATGTATC	0,623
snp_AM860034_48	GTCAAAATGACGGACACTATGCTTTCGTCTTAAAGGTAACCAAAAGCC	T/C	TAAACCTATGCAATAAGAAATAGACAAAAGTGCAAAAGATCATTTGGAAAAGCTT	0,929
snp_AM860592_273	GAAAAAGAAAAGAAAAGGAAAAGAAAGATGAAAACAAGAAAACCAATGA	T/C	AATGTCTAAAGATTTGCTCCAGTGTGGGGTGCATAGCCATAATTTGTG	0,918
snp_AM857665_474	CCATCATGCCGCCAGTGTATGAGTATACATCAACAACCTGGCAACATC	A/G	CTTGGTGTGTTCTGGGACAGACAAGATCATTCGCCTCCTTAGTTGTCATAG	0,861
snp_AM857996_76	GAAATCTTCAAAAATGTTGATGTTGCTGAAAAGCGCGGTGCCAGGTTGT	T/C	CTTGCTACTTCTAGTGTGTTAAATCATCCACCTGAAAATATCATTTGATGGGGAT	0,884
snp_AM859846_182	CAAGTTAGAAGTCTTTGGCTAAAAGTGGAGCGCAACAAGATTGCTGATCCC	T/C	TGGAGCTGTTGTACCACTTTAAAAGTTTGAAGAATGGTCTGAACTTGAGA	0,9
snp_AM862502_170	ATGAAAGCAAGAAGTGAATGCACCATTGAAAGTTTGGCATCTTCTACCTCCACA	A/G	GCTGAGAATGGAAAAGTCCCACTCTACTCTGGCTGTGAGGACTGACCTGCAC	0,828
snp_CU986708_332	ATTTTATCAGAGAATGCTAGATGAAAAGGGTGGAAAAGATCCCTGGATAAGATT	T/C	GAAGTTCTATGTGGCACAAAATTAACACAACACTAGAGTCTATACATAITGGCA	0,905
snp_CU987873_518	GTCAATTTAAGATTTTAGCTGAAAATTTGGTTTTAATAAATCTTAGGGTAAATAA	T/C	TCAATTTTGGAAAAGTATATGATATATGTAAGTGTAGATTGGCAGGACATGA	0,513
snp_CU990109_131	TAACGGG-GGTTCTGCTCAATATACAAGTAAACCAAGGCGCATGACGATGGGTA	T/C	ATCGATTTACAGTTCAGAGACCTCTCCAAAAGTGCATACAAGGCTATACTG	0,913
snp_AM858186_333	TGCCGTGGATATCAGGAATGATGGGGCATCAGTGGCCATGAAGGAAGCAGC	A/G	GACAAGTTTGGGGGATAGATATCCTGATCAACAATGCCAGTGCATCAGCTT	0,905
snp_AM858186_636	AATATGGGATGTCATGTCGTTGGGATGTCGGAGGATTTAAACCTTTGTC	A/G	ATTGCAGTGAATGCTCTCTGGCCCGTACTGCAATTTACACTGCTGCCATGGAG	0,931
snp_CU994090_266	TTACATCTGTTTCAAAGAAAAGGACTTTTGGTTTCTTTTCAAAGCACTGAGA	T/C	TGAATGAAAGTGACAGATACGAGATGAAATTTCCCTATCTTTACCATGTGGTA	0,941
snp_AM858323_344	GACGTCCTCCGGCCCCCTGACTGTAACCCACCCTCTCCCTGGACATTTCTCG	T/C	CTGTTTCATGGTCAACATGTGCCTGAACTGTCTGGATCCTCTCTTTGACAG	0,908
snp_CU989257_270	GCAAGAAATCATGAAAACCTTGACAACATAATGAAAACCTGAGCAAGCCCC	T/C	TCGCCATTAGATGAAAACGACAACGACAACAACTTCGAAAAGTCCGGAGAAAT	0,859
snp_AM858398_181	GGATACTCCCCCATACTATGTTTTAGTGGAGCGCACATTTGTGAGCTGCATT	A/G	AAACGAAAATCAACATCAGAGAACAGCTTCTTAAATATCTAGAGGCGAGAGGT	1
snp_AM861624_248	ATTTTACGTCAGAAATGTGAAAATGAAAATGCTCATTACGCCACGAGGAAAACCTC	A/G	CTGAGCAAACTTTTCCAGTTTATACATAAATGCAGTGAAGGTTGGACGTGTG	0,998
snp_AM861624_299	ACTCACTGAGCAAACTTTTCCAGTTTATACATAATGCAGTGAAGGTTGGGACGT	T/G	TGTGTGTTTGTTCACCTGTACAGACCTGGCCGACCTGTGATACAGGGCTGTG	0,961
snp_AM858880_508	AGATCATCACCTCCACCACAGTAACTATGAGACGTCAACATTCGCCTCGAAGAC	T/C	GAGTGGCGAGTGGGAGCTATTTGGCCACGAACCTCCATCTCAGAAACAAATCA	0,715
snp_AM858511_544	TTTTATTGGACGGCCCCGGCCACAGGCCACATTTATTTATAGGTACCATAGT	T/G	AAAAACAAGACCTTTGTTTTGGACCAATGTTCTCTCCCGCTCATCAAGACGTG	0,784
snp_AM858589_274	TATGAAATGATCGTACTGATCCAAATAGCTGTAATCCATTTGCTACAGTGTGTTG	A/C	CATATCTGAAACCCGCCAACAGAAAACCAAGAAAGCTGGGCGATTTGACTTACA	0,751
snp_AM860177_238	TTGCAAAAAA-GGAGCACAGATTTACAGAGTTCCTCAACACACCCGGTTGCT	T/C	AAAAGGATTGCACAGTAAATGTTAAACCCAGAACCTGTCAAAGAAGAAAACC	0,978
snp_AM858743_147	GGAGTTGATAATGTTATAGCACAGATTTCTGGCGGTACCCCTGACTTTGATGA	T/C	GCATGGGATTTTAAAAAGTTTAAAAAGAAATTCGGCATTGACATGATAAAAAT	0,985
snp_AM864676_609	ATCAGAAGCTGGATGATAAGTTGAGGCCAGAGTCTGTGGCAGCTTCAGGAGA	A/G	GTGCTGAATCCAGTGGAGATTTGATATTTCTTGACCCCTCCAGACTACACCT	0,934
snp_CU986923_18	ATAGATTCTCTACAGTTACATGTAACACTTGAACAGTAAACAATAA	T/G	AGAAACGAGGTAAGCGACTAGCTGGTGTATCACCGAAGGCTTACTTCAITG	0,986
snp_AM859467_518	ACAACGAAAGTCAGAACAGGCAGACACTTGCAGAAGAGCAAAAGTTGTGCT	A/G	GATGAAAATACGGGCAATGAATCTGAAGGAGCCAAAACCCAGAAAGACAG	0,895
snp_AM859033_434	AGAGGTGTACCAAGCAACTAAAGACAACAAAGTTTACAATGGGACAGAAAACCTC	A/G	GACCTGAAGAATGAACAACAGCAAGTCAAGAACGAGGACGACGACTTGCAGAA	0,963

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_CU987264_280	GGAAAAGGAATATTCGGGTGTTTTCATCAAGGTGGATGATGAAAATGAG	A/G	AAACTGCTGGGCTTGAAAAATTCAGCCATGCCAACATTCATATTTACAAGG	0,985
snp_AM853312_288	CCAAGCAGTGACAGATTCGTCAAAAGTGAAGGAGATAATCGATTCCTACGACAC	A/G	TATCTGTGGATATGGATGGCACCCTTTGGGGAACAGATCACTACAGCTCTATT	0,778
snp_AM859469_105	AACAGCCGCTCCATGGCTGTGAACGTGTATAGTACAAAACACAGCCAGACAAA	T/C	CTGAGTCGCCATGACATCTGGCTGGGTCAACGACAGCATCCACACAAAATTA	0,877
snp_AM859907_237	AATTGGATGACCAGGAAAAAACAAGGACAGCTTTGCTGTTTATTTCCCATGGACT	T/G	GGGAAACACTTTGATATTTACGATGAGCTTGGATATTTTCTAGTGAATTTCTGGC	0,963
snp_AM859907_279	ATTTCCCATGGACTGGGGAAACACTTTGATATTTACGATGAGCTTGGATATTTCT	A/G	GTGAATCTGGCTTTCCGAGTTTTACACACGATCACATCGGCCATGGGACTAGT	0,959
snp_AM860238_377	AAACAGCTAAAATGTACAGAGGAGGAAAAATTTGCTTACTGACCCTTCAAGCC	A/C	CTGTGGGCAAGAAATGTTCCCTAAATTTGGAATAGCTCATGCAATGGCACTGGG	0,947
snp_AM860852_202	TATGTTCAAGAACAAATAAAGAAATCTGACAAATGACTGGTTTCGCCTAGAATCTAACAC	A/T	GAGGGCACTCGTGGTTCCGGAAAGTGGTACGTCCACGAGCTTCTCAAATA	0,905
snp_AM864324_160	ATACTAAAGCCCTTGGAAAGGAAATTTGTTATCAAGATTTGGATGACACTCACTT	A/G	TTCACTCAGCAGACACTTCTCGAAACTCTCAAGATCAAGTTCAGTGGACTGATG	0,966
snp_AM860304_85	AACAAATGATTAACAAGATGAAAGAAATGCTGAAGTCAACGGATGTGACTGCT	A/G	TCAGGAGATGATTAAGGGTGGAGTAAATGTCAATTCACGCTCAGCTGCACAG	0,902
snp_CU995085_518	AAAATGGAGAAATCCTTGGCATAAAATACGTGGCAAGACAAAAGGCCAACCCG	A/T	TGGGGGGCCCAAAATAGTGGGATATATTTCTGGGGCCCTGCTATGGAGGT	0,736
snp_AM863490_83	TGTTCAAAAAGATTATCAAAAACATGTGAACCTTAGCCAACAGCTTGATGCTCAG	A/T	TGAATGAAAATCTTTGGTGAAGAGGAGCTTGATCGAGTGGAAAGATGGTGC	0,98
snp_AM861320_348	CAGCAGCATTAACAAGAACCAATTTGAATATACCCATTCATGTCAGTCTATC	T/C	GAGGCAGATGCCAATTAACACAGAAAAGTCTTACACGACATATGTATATGA	0,671
snp_AM861357_589	GGAGCCGGCAACTGGTGGACAGGATGAGGGGTATGAACAAATCTACGGCGA	A/G	CAATTCACACCTGCCAGCTGTACTGGATCACGCGAAAAGACTCTCCCAAGAA	0,899
snp_AM861494_377	TAACTCCACTCGTTGGTGAATTTGATCGGGAGTGGCAATTTTAAATAAATTTGAAGT	T/C	ATGGTGGATAGTGAAGCTTCTGAAAGTGCTTAATGGTGAACATAGAACAGCAAC	0,943
snp_AM861494_473	TAGAACAGCAACTTGGATTAAGACTTTAGACTTTGGGAGAACCCAAACCAAAAT	C/G	TGTTTTGGCAATTCATTTTGGGAAACAAAAGATGAAGAAAACCTGGGGCAATTTGAG	0,872
snp_FP008139_99	CAGCTGCAGGGAGAGCCAGAAAAGTGGCTGGTGAATTTGGCTGAAAAGAGGCCAA	A/G	CTTCTATTAGAGACTAGACAAGCGGCCCTCGCTCGACAGCGTTCGCTTCAGCC	0,988
snp_AM865369_184	TGCTGAAGCAGCAATGCCAAACAGTCCCAAAATCCGCATGGACCCGCAATAAGTT	T/C	AACGACTTTGTGCAACAAGAACTTTGAGATGACGGATGAAATGATTTGGACA	0,916
snp_AM865369_256	AGAACTTTGAGATGACGGATGAAATGATTTGGACAGAGTTTTCCGAGCCTTGA	T/C	GAGGACAATGATGGATTTATCAATGAACTTGATGGTGGTCAAAGGGCTGTCCAT	0,989
snp_AM862518_108	TTCTGATAGCTATTGACGGCAGTGAACCTCTAAATACGCTTTGAATGGTACTG	T/C	AAGTCCATGCATCTTCCAAACAGATCACGTGGTCAATTCACCTCCGTTGAGTTC	0,977
snp_AM862538_267	AAAGGGACCCCTGGGAAAGGAGACTTTACAACTAAGGATGTTGTTCAAAGA	A/G	GATTACCCAGCTCTCTCCAAAGTGCAAGTTCGAGCCCTGTTTACCC	0,998
snp_AM863998_300	GTCATCACATATTTGTACAGACCAACCTTGGTGGTGTTCGAGGGATCCTCGG	A/G	AGCTTTGGACTGTGTGCTCCAGACTCCAGACTACAAGACGACTACCCACCAC	0,85
snp_CU999304_274	AGGAGCACATATCCCGTACGATGGTGAAGGAAAATAGTCCATACTACGAGGT	T/C	CTAGTACTCGATCAAGACCAAGGATTCGTAGACTGGCAAAAAGCTTCCAA	0,893
snp_AM863641_199	GCTGTGTTCCAACTTAGTCTACCAATGGACGAAAAGGCAACGATGTCGTC	A/G	ACAAGACGCAAGGCCAAAAGATGAGGAAAATTTGTCAGAGCCAGCAG	0,64
snp_AM863381_54	AACATGGCGATGCTTAGTTGGATAATCCGACATTCGAAAAGATTTGCAATTTACTC	T/C	GGCATTGGGATCGGAAAACCTTGTAAATGAGTGCACCTGACCCCTCCGCTCAAG	0,979
snp_AM863574_174	CAGTGATGGAGTTCTAGAAGAACTCAACAGATGAAGAAAGAAAGTTAAACC	T/C	CCAGAACCAACAGTCAACCCAAAAGAACTGACTTGGATGCTTGGTTTTGGTA	0,958
snp_AM865098_23	TAAACTGTCTCGGTAACACTTGAATCTCAATGACATTTCAATTTACTTTGACATTCAT	A/G	CTAACTGTCTAAAACCTTGTATCATGAGTTTTACTTAAATCATGACTATATCTGTA	0,76
snp_AM864017_329	GTGGGCAATGGAGGACAACCGAGATTTAGGACTATGTTGGGAGAGATACTGCCG	A/G	GGGTCAATGCTATTGTCTATATGTTAGTGTGCTGCAGACCATGACAAGGTAGA	0,888
snp_AM869032_351	TATGACAGAGCCTGATATCAGAGGCTACTTCAGCCCGCTAGCAAAAACCCGAGG	A/T	GGAGGAATACAATCCAATCAAGTTACCACCAAGCCAGTGAAGGCAAGTTTAG	0,96
snp_CU999066_97	AGAACACAGTGCCAAAATTTCCCGGAGAACCCGGATCCTTTTGGTGGG	A/G	AATTATGATTTCAAACCAACGATTTCAAATTTTAGAGTTGTGGCGTAAACAT	0,956
snp_CU992608_133	TGTACTATATGAATGAACTGGTGACAAAATTTACACTTTACAGAAAGTGGATCC	T/C	ATGGGACGACTACCTCTCAGCCCAACCTGCTAGATTTCCCTGATGACAAA	0,975
snp_CU998679_293	TGAGTACTACCAGGAAAAGGAAATTTACCAGTCACTAGGACATAGAGAAAAT	T/C	GTGGGCCATGGAGAGATTTCCCTATTACACTGACTCTTCACTGTGCCCTGTCCG	0,97
snp_CU990868_732	ATAAACTTAGGAAGCAGGACATTTGATGCAAAACAGCAATAATATAAAGTACTAA	A/G	TTAGTCTTTTTTGTCAATTTATAGTATCTACTAAGTAAAGTAAATAAAA-C	0,428
snp_CU683658_368	AATGACCTTATCGCAATTTTCAAAAAATTTGGAAAAAGCCTGTGTTGACACTATTGA	T/C	AGTGGAAAAATGACCAAGGACTTAGCTGTTGTATATATGTTGGTTGGAAGATG	0,918

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_FP001390_99	GACTTCAAAACAATTTGTTTGGAGGCGCTTCAATAAGTAGATAAAGACGGAA	T/G	TGGTTTTCTGACACGTGACGAGATTTTGGAGCGGCCAGTAAAGGCTGAGC	0,995
snp_BQ426841_203	CTGTTCAAAGGGCATGCCACACAAGTTTACCATGGCAAGACTGGTAGAGTTTT	T/C	AATGTAATAACACCGCTTTGGAGTTCATCATCAACAAGAGAGTGAGGGAAA	0,94
snp_CU686003_247	GAAGAAGAAGGTAGCAGCAGCCCTTTGGTGGCAAAAAGCTGCAGAACCCAA	A/G	AAAGTTGTTAACCCCTGCTGGAGAAAAGACCAAGAACTTTGGAATTTGGTCA	0,845
snp_AM237651_319	CACAAGTTCCTTTTAGCAGGTGGCTGCGGTGCTATAATAGCTACTACTCTGT	T/C	TCATCTTTAGTTACTCATCAACTCTTGTAAACAGCTGGAAATTTACCTTCTTATTC	0,923
snp_BG467427_179	GGACAAGAAGTAGACTTCAGTGTGGTGGGAGGTGGCGGAGAAAGCAAAAAT	T/C	ATGGATGACGATGATGATCGCAAAAATATTTGTTGGAAATCTCAGTTGGAAAC	0,757
snp_FP007608_70	ACAGCCATTTTATGATCGAGTTGAAGACTGCACAAATGGCGGAACAACAAGACTACAC	A/G	TACGATCAGCAAGCAAAATGGAGAAAGGGGCTTTTGAACAGTTTGAACAACAGC	0,841
snp_BQ427114_118	GCTGAAGAGATTGACAGTTTATATCGGGTTACAGAACCTCTTCTCCAAGTAGCCG	A/C	AGTGATGCAACCGACCCAGACTATTTCTCCATACAGAGCGACAGTGAAGAGT	0,885
snp_BQ427114_169	CCGAAGTATGGCAAGCAGCCAGACTTCTCCATACAGAGCGACAGTGAAGA	A/G	TACAAATCAAAGTCCGCTAC-TGGAGGCAAAACAGAAATCAAAGAGAGCGGA	0,817
snp_AM853931_350	CCGCAAAAGTTCCTGTCAGGCCAAGCTGATGCCAAGCTGGAATCAAACAGA	T/G	GCCAAAGCCACTGCAAAAGAAAAGCAGCAAAAGGCCAAAAGACAGCAAAAGCCA	0,827
snp_CU681711_212	GGTCGGAGAGAAAGTCAAAGACTCCACGTTTAAGATCGGGAGGAGTTCGACTC	T/C	GTGTCTTGACAGGCCAGCTCTGAAGTGCACCTGCTTTGAATGGCGAAGA	0,675
snp_CU684183_570	AATAGTGTAGATTTGCTGCGCCGGTGAATGACTCCGAAGACGTAAAGAGGC	A/T	TACGATGAGTCTGTGGGAGCTGTTTGCAGCGGAAAATGGCGGTCAAGGCC	0,918
snp_EW779545_265	GGCAAACTCAGGATTTGGTTAATATGATAGCTTGGACTTTCGCAAGAAGTT	T/C	GAACCAAAATACAGATTACAGAGACATGGCTTAGTAGAAAATTAAGAAAACCG	0,967
snp_AJ564625_64	TCTTACTCTAAATCCATCCCTACTTGAGAGATTAATTCACCATCGGAACCTTAC	T/C	ATGGCCGAATCCCAATGTGCCAAAAT-TTACCACAGGAGCGCAAGCTGGCA	0,835
snp_AM857816_166	AACACTGCTGGAGCTCTTAAATTTGACACAGCTACATGTTTGTATCCGAGAACCCGG	A/G	GGAAGAGATGACGCTAGCCATGTTGCAATCATCATCACAGACGGTAGATCACA	0,895
snp_CF369132_326	CCCAACATTTAGGTGAAAATGTTGGTCCGTAATTTGCTATGGATGGTACTGAGGG	T/C	TTGGTGGAGGAGCTCAGTGTATTGACACTGGTTATCCAATCAGAAATCCCTGT	0,948
snp_AM858845_106	TAATTTGGGCGGATGGCAATTTGAATTTATTCGAAAGCAATATGGAGTAA	T/C	AGTCTCAGGACTAAAATTTGTTATAAAACAATGCCAACATATCTGACCAAGAGGA	0,581
snp_BQ426370_239	CGTTCAAACAAGTTTTCTTTTAAAGGCAATGATGTTCTGAATGTGTGA	A/G	AAATCAATCTTGTGCAAAATGCAATCAGATCTGTTGTCCCTGTTGTTATCATT	0,956
snp_DW714015_27	CATAATAACCACTGGTCAATCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG	T/C	ACAGCGTAACTGTGATTTGAAAGTGTACATTTAGCATAATGCTTCAATATCA	0,954
snp_ES789710_308	ATGGACAACCTTTGGGACTCGTACATTTAGTGCCTTCAATACCTCAATTTTCAT	T/G	AAGAACAACAACCTTTGCTATTTTTTATTTTTCTGCTGAAAAGCATTAACTTGT	0,667
snp_AM853687_32	CAACCAGAGCGGCATTCGATAATTCCTGTTTGTGCTCAGTGAACGTACCG	A/G	CGGGATTGTCACAGAAGCTTTTACGTTCTTTTTAACGTTTTACAAACTCAAC	0,944
snp_EW77736_246	TACCAGTCCATGGCTCTACTTCGATCGGAGCATGTTGGCTTTGCCAGGATTTCA	T/C	AAGTCTTCAAGCACTGCTGACGAGGAAAGTGCAGATGCCGAGAAAGTTGAT	0,928
snp_EW778209_342	TGTGGGAAACAAAACGGATTTGGTACCAAGCTCAACAAGATCAGGAAAT	A/G	CAGCATAATCGCAACTCTTCTCAGAGTCAAAAATCCAGCGGGTGGAGGA	0,92
snp_FP001154_355	GCTAGCAAAAGTCTTTTATCACGTGGTGCAGGATAGTCTTCCAATCAAACAG	A/G	AGATGTTGATGCCAGTAGTAATAAAGCCCTGAGAGCCAAAGATGACGGGAAT	0,899
snp_BQ426529_380	CCTACTGTTATGGTGAAGTGGGAAAGAAAGGGGCGTGTGACAGACTTTTGAACA	A/T	TAATGCAATTTTACAGAGCACAATTAATAGCAGTGTCTTTTCAATTTTGGTGGATCT	0,992
snp_BQ426564_125	ACCTGGAAGTCCAACTACTTCTTGAATAATTTCAAGCCCTGTAGATGAATATCCCAA	A/G	GCCTTCATCGTGAATGCTGACAATGTCGGATCAAAGCAAGATGACGCAAAATCCG	0,95
snp_AM852882_206	GTACAGATGGATCCAGAAAAGCCAGGAGATAAACCCAAAGATGCAGACATATGA	A/C	GTGGATCTAAACACATGTTGGTCTTATGGTCTTATGCTCTTATCAAAAATTAAG	0,859
snp_CU686490_284	CAGAAATG-ATCGGAAGCATATTGGAGTTTACAATGGCAAGACTTCAACCAGG	T/C	GGAAGTCAAGCCCGAGATGATGCCATTACCTTGGGGAGTTTAGCATTACAT	0,815
snp_CU686490_340	GGAAGTCAAGCCCGAGATGATCGGCCATTTAGTGGGAGTTTAGCATTACATAC	A/G	AACCTGTTAAACATGGTCCAGGATTTGGTCCAGTATGGTCCACCCACAGCTCCAGATTTA	0,961
snp_BQ426573_112	TCCAGTCCGATACGGAACTCCGAAAACCTCAGATCAACGCCGTTATTGAGGATGA	A/C	AAGATCAGCACAGACTTTTAGAAGATGAAATACAAAATTTGAAGACTATGT	0,651
snp_EW777483_666	TTTGCAACGCACTGGTCCACCCCTTGTGGCCGTTTCCACCTGGAACTT	T/C	ACCAATCAGATCCAGGCTTCCGTTAGCCCCGTTTGGTGGTCCACCCGAC	0,785
snp_BQ426663_270	CCAGAGGCGTGGGGTGGACCAAGCCGTCGAAGAAGCGGAGGAGAAAGAAAT	A/C	GATGAAGAAGAGGAAACAGATGAAGAAAAGACCCCTCTCTGTCGCCCAT	0,983
snp_FP008712_168	GCTTTTGTCCACAAAGGAATCTCCATCAAAAATGACCTTCCGGAATCTTTAACCCGT	T/C	CCTGATTTGATTTCTATGAAAACATTTGGAGCGGATTTGTGCTGACACAGGTG	0,724
snp_CU986744_318	GTGCCCTGCCCCAGAAATGTGACGCCAAACAATCAGGGTTACGTATGATGAGCC	A/G	TTATGCCCCGGATGTACAGAATTTCAATCGGTCGCCCAATGTCCAGGACGTG	0,957

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_CU997005_286	CAGGATTGTGGTTGTTGCCACACTTAGGAAGACACACATCACATTGACGTTGA	A/G	GAATGTCAGAGACGGGGATCGAACTGGTACCTTACCCAAAATGCTAAGG	0,895
snp_AM858814_476	TATTTATATATTTGTTGATCCCATCTTTGTTGGTCCAAAATAAGTT	T/C	CTATTTGCATGAAGTCAATATAATTTAGATCCCCCATATAAAGATCAATGAG	0,906
snp_EW778242_645	ACAGTTGTAGAACCATACAATGCCACACTCTCTGTTTCATCAGTTAGTAGAAAACAC	A/C	GACGAAACCTCTGCATTTGATAACAGGGCTGTATGACATTTGCTTCCGTACA	0,943
snp_AM866729_114	ACCTTTATACGGGGGATGATCCATGGTGTATATGGAGCAATTCGTGACTACG	T/C	GACTAAATATGTCAACTTGTATTATGACACTAATGACAAAGATCATTAATGATGT	0,717
snp_AM866729_157	ATTCGTGACTACGTGACTAAATATGCAACTTGTATTATGACACTAATGACAAGAT	T/C	ATTAATGATGTGAAAATTCAGACGCTTGGACAAGAAGTACCAAAATCAAAAGTC	0,815
snp_AM866729_19	AGGTGCCACTCTGGAGAAATGAACATCGAGGGAAACTACGCAGAGTTTCTAAA	T/G	AGCAGAGGAGTGTATTGCTGTGATGGTCAATTTTGGCGACCTTTTATCAGCG	0,956
snp_AJ565645_416	GGCAAGATCACCGTCTGAGGAGGGAGTGCCTCCAAACGAGGAGTGTGGAGCCGG	A/G	GTCCTCATGGCTCCCACTTTGACAGACAATACTGTGAAAAGTGTGCTGACC	0,668
snp_EW778496_139	TTGAGCCTAGTACTATCGAAATGTTAAAGCCAAAGATTGAGCAAAAGAAAG	T/C	ATTCCTCTGACCAACAGAGGCTGATTTTCCGGTAAACAGTTGGAGGATGG	0,947
snp_BQ427174_1095	GACCAGAACTCCTCCAGCTTCAACAGCAGACGGCCATCGTGGAGCCAGAAC	A/G	GAGGCAGAAAAGGTGCCAAAAGAGTGAACAGAGCAGAAAAGTGGGCCAA	0,645
snp_AM857215_257	CTCATCTTTCAACTGACAGAAAACCTGGGATGTTATGACCGCATGGTTGC	T/C	GACAGTAGTCTCAGTGCAGCGAGCCAGGTATGAAGCAGCAAAAATGGAAT	0,782
snp_AM866192_370	CGTCTCATGCAGGCTTACAGATGGATGGTGGATTACGTTGACGACTACCCAG	T/C	GAACGGTTGTTCCAAATGGAGGACAGATTTCTGTATATCGATGCCACCAAT	0,778
snp_BQ427368_404	CCAACTTGGCTCAGATTGAACTGTGGACCAAGCAGGGTCAATACAAAATGGG	A/T	GTGCATCTCTCCAAAAGTGTGAAGCTGCCTGCAGCCCACTTGG	0,864
snp_EW778390_285	GCTCTGGAGCTCAGTCCAGTGGAGCAGTTGTAACATTTCTACCCAGGATTT	T/C	GCTGCAGCAGCCATGCCAAGACAGGGGTTCTGTGTATGCATGGAAAAGGAG	0,918
snp_CU682324_234	TGTAACGTTAAACCTCCAGAGTCCATTCACCTCCGGCTCCAGTAAAATGTT	T/C	TACAAAGCTGTCGGAGGAATGGTTCCTCCATAAAGCAGCGCTGGGGCCGAGG	0,765
snp_AM866360_263	TACAAATCAAAGTGGATGATGAAAAGATAATGATGCCAAAATTCAAAATTT	T/C	GGCTGGGATCAGTATTGCTCTAGTTCCTAGCAACAGAGTGGGTCAAAGG	0,945
snp_AM861208_421	AAACTGCCTGAAGGAGAGACTTGGATAATTTGATTGAAAGCCTGGAATGAAG	A/G	AAAGTATTGGTTGAGGAGCAGCCCACTAATGTCCGGTGGTTGGCTACATTTGAAACC	0,91
snp_CB617375_137	AGTTGATAGACCTGGATCCAAGTCAACAAGAGGAGATTGTGGAGGCGTTAC	T/C	ATCCTTGAGACTCCCACTAATGATGTTCCGGTGGTTGGCTACATTTGAAACC	0,848
snp_FP000071_19	ACAGATTGACCCAGTACAAAGACCTTACTCCATCCATGGAGGCTTCCCTCATTA	T/C	GGAGAGGTCAACCAGGACTTGTGCATGATCAAGGGATGCTGATGGGATCCA	0,902
snp_CU682714_339	ATTCGTGATGTTGACACAACCATCACCGTATGATGTTAGTACGAACTC	T/G	GTGTCAATTTCTCCACTGTTATGTTGCCATCTGCCGTTTGTCCATGTTTCCAAT	0,874
snp_DV736306_319	AAAATTTCCCATACGTATGCGAGTACAGGCAACAGCTACCCTGTCGGAAACC	A/G	CAGACCGTGACCCCATACCACACAAACCCTTCTACCACCAACCCGAA	0,867
snp_AM853792_146	CTCTAACGGTTGTTCCGGCTTCAACAACCTGCACACTGCGCTTACTTATAT	T/C	GCCCCATGTTACTGCTGGGAAAATGCTGAGCGGTCGGGACTCGTGCA	0,971
snp_DV736416_207	TAATGTATGTCAGCAGTGTGATTTCAATGATTTCTTCTGACTGCTTTTC	A/C	ATCTTAAATTCATGGGGGAAAACATTTTGTGTTTATACAGGGGTTCTATTG	0,961
snp_CK172327_436	GTAATTCATTACATTTTATTTGGGAAATAATCTTCTCAACTAGAAAATTAATTT	A/T	CCTGTACTGCTTGCAGAACTACTCTCGACTAACAGATAATTTCCATATATTAC	0,776
snp_CU986741_195	CTATTTCAAGTCATCATCTTTTATTTGGGTTGTAGGGTTCAATTTGGGGTTACAT	A/C	TGTCAACAGTTCTCACAGACCATGTACATCTTACTTGTGGATTTGCACATATCAT	0,939
snp_EW777868_135	CAACTTCTACAGCAATTTCTAGAAAACATCAATGAAGTTGAAAACAGATCTTGAC	T/C	AGGGATTCCTAAGGGTATCAGTGAAGCAACCAAAATGAACGAGTTCCGGTTCCTT	0,883
snp_CU684921_8	GCCTTTGGACCTCCCTACTGGGCTGGACTTCTGGTACACCTTGTGACTTGTCT	A/G	AAGAAAACCCCAACACTGAAGACATTTTTCAGCTGGGGTTATGTTTATTCAGG	0,937
snp_FP000122_108	GAGTTCTCGTGGAGAACGCAATCTGTTGTTAAAAAATTCAGTGAGCCGACAGAT	T/G	ACAAGAAAACCTTTGGCGATGATTTCAAGTCGGCAGACCCCACTCAATGCGTGGG	0,827
snp_CU686230_506	TGTTGAAACTGTGTTTGTATCAATATGTAACCTGTTGGTCAATTTTCAGAGCAAC	A/G	GTCAAAATGCTTTACCACCGATTCCCGACCTCGCAGAAATTTGAGATACGTT	0,927
snp_CU984479_370	ATGAAGACATAATCACAATCAATCAACCAAGCGACTTTCATAAATTCACGAT	T/C	CTAGGGTACTGTTTCCAGCATCGGTGATGCTTCTCATTCGCAAGGGAAACC	0,889
snp_CU984479_425	TCCTAGGGTACTGTTTCCAGCATCGGTGATGCTTCTCATTCGCAAGGGAAACC	A/G	TGTTCAATCCCGGAAATGTTGTTCTTCCATTCGCAAGGGTGTATATGATG	0,848
snp_FP006935_63	CATGAGATTCGGATGACAGCAACCAAGGTTAGGATGTGAAAACAAAGACAAA	A/T	TTCCGAAATATATTTAGAAATGGTTTACCCTGGTGTGATGCGGGAGTACTGAC	0,836
snp_AM868306_136	CTCTGTCTGTACCTGTGGCCCGGGGTTGCTGCTCCCTAAAACAGTGG	A/G	CCGGGACATGGGCTTATGTTAGGCAACCAACGAAACCGCAAGGGTGGAT	0,744
snp_AM867342_588	AGTTTCTATGGAATCAGGTGGTTCCCTGGATATTCCTATGGTTTCGACAGGTACCC	T/G	AAGTGGCAACTTGGAAAACCGATTCACCAATGAATGGGAATCTTTTCTCCCAA	0,903

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_CU992707_125	CGACGACGATGACATTGACCTCTTTGGCAGTGACGATGAGGTTGATGAGGAGGC	A/T	GAAAAATCAGACAGGAAAGATTAGCAGCATATGAAAGCCAAAGAAATCTAAAA	0,992
snp_CU992707_194	AGGAAAGATTAGCAGCATAGAACCAAGAAATCTAAAAACCCGCCCTCATCGC	A/C	AAATCTAGTCTTCTTGATGTGAAACCCCTGGGATGATGACAGACATGAA	0,945
snp_AM855811_199	CTAAAAAGCCACATTTCCCCCGATAGGTGGTGACAAAATAAACAGAGGAAAGTC	A/G	GAGTTCAGGAAAAATCCCAATACCTAGTCACAGATACACACCTTTAAAGGAAAA	0,889
snp_AM856748_179	TATTTGTTGGATATCCTCCGATCTCAATGGTCCCAGCCCTAACTGTTTCTAAAAGT	T/C	CTGTTGTCCATAAAATGCTTGTGACAGATCCAAACCCAGACGATCCATAATG	0,937
snp_AM858380_181	ACGGGAATGTGCTGGTTTTAGATGGGTTTATTCAGTGTACAGAAAAGAGATGAATT	T/C	TCATACCAAGAGATGCTGGCCCATCTACCCTTGAACCTGTCAACCCAAATCCAAGA	0,986
snp_CU684109_266	AGATGTGAGCAAAAATGGCTGAATTTGATTCAAAAAAGTTTGCAGAACTTCATGG	T/C	CAGACGGCAGGTAGTGGCAAGAAAGGAAAAAACAACCAAAACCCAGCTGCTAAG	0,659
snp_FJ669341_143	CAGTAAAGTGAACAGTCACTGCCAATCCATCCGTTGTAGAGGGGCTACTGTG	A/G	CGCAGTCACTCTGGTTAAGATGACTTGTACCGATTGTACCGATTGTAATGGAAAAAGT	0,972
snp_DV736300_603	GATGTGAAGGGAATCCACATTTCTGTTGACTGTGTTTAAAAATGTTGACATGTT	A/G	TCAGAAATGGTTCAGGAACACGATGAGCCAAATTTACAACATTTACAGGATGT	0,989
snp_AM855035_382	CCAAAAGAAATACAGCCTAGATAAAGAGCATCTGGTCTGATGAGGTCAAAACA	A/G	AGAAATCGATCCACTTACTTTTACTTTGGAGCCAGCATTTGGACTAACTGCTGCT	0,963
snp_CU988483_537	ATCTAAGCCATGCTGGATTGGTAGTCCGGCTACAGACCAATCGTTTGATTG	A/G	CTACTTTGAAGCAGCGGAAGCTTGTGATTTGTTACCAGCATTTGCATATACC	0,931
snp_CU685863_126	TATATCATAGCAGAGTTTGTGATTCAGCATTAACATTTTGTAAATGGGTATTT	T/G	AAGGAAAAAATAATCCAAAAATCTTATGATTATGTTATGATTAAGCAGCTGTGA	0,784
snp_CU685863_215	TTTTCAGTTCAATGTTGATATGATGCTGATTAATGTTGAGTTTCTTTCAA	T/C	TAATTTCCGTTGTTAAATTTCCACAAGTTATCATAGCAGAGTTTTGTGTA	0,869
snp_CU988574_243	AGCCGAGCAGACAGATGCCACACAATGGATATATAAAGAACTGATTCGTAA	A/G	GATGGTCTGGTACTACTTCAACAAAAAGCCGAGAGTGTTCGACAAAAGATGT	0,933
snp_AM856944_535	TGATCCTGTGGGGTCATACGGATCGGATGGTACCGAGCCCGAGGGTCCAGCAGC	T/C	GCCATGTTACAACTCTGTAGATAACAGATGGTTGAAAAAACCCAGCAAAA	0,92
snp_CU990225_417	GGGACAAAAAGACAAGACGATGGAGTCAGTCTCGCCAAACAAAAAATTTGTCAT	T/C	GGAGATTTCTTTGACATTTGCCATCACACCCCCAGAAATGAGCGACCTAACC	0,878
snp_AM858368_354	CCCTCTGATCGAGGTCCGGGAAGATGGTGTGAACAGGAACCCCAACAACTACTC	A/G	CTGAGGTGGAACAGATCGCCTTCTCCCCGCTCACTTATCCCGGGGGTGGAG	0,912
snp_AM865296_466	ACCACTGAATTTCCGGAGTAATAAATGAACTTGTGAGGATAATCCTCATAATCT	T/C	GAGTTAAACCAGAGAGTATTTGGATACAGTCTGAAAGAAAGTACTGATGTTGA	0,764
snp_AM859710_402	TGAGGTTTCCGTGAACGAGAAAGCCGATGTTGATGGATCCCGGGGCTC	T/C	GGCACCATTCTGTAGGACGCTTGGAAAGCGTCAAGTCTTACGCTCATGTTCA	0,661
snp_AM857209_187	CTGTGACCCCAATGTTTATCCCTGGCCTGTTTATCAGTTGAAATGTAAGAATG	T/C	CTCTGCTTGTGAGCAGCTTTACAAGTCTCGGGTGTTCACCTGTAGATTT	0,904
snp_AM854177_247	ATTTTAAATTTAGCAATGGCTAGTGTTTATAACTTAACAGTAGTTAACAGAAA	A/G	ACATCAATGATTTAGACTGCTTACCCTTAGAAATGTTACTGAAAACCACTCT	0,616
snp_CU988101_315	AAATTTCTGTAGTTAACTGGATTTACTCGATATTTACTCAGTTGGTCTATAT	A/T	TGTAGCTAAATAATAGGTTGTAATCTCAATATTTGAGCCTCAGTCAGAAAA	0,569
snp_CU995337_540	AAAAAGTGTCTTATCCTACAAAAGGAGTACAAAAGCAAGTGAATAAGCGG	T/C	CCAAGGCATCACCTTAGTTGATATGTTCCCGGTTTTACTGACAGCGCTTTGT	0,884
snp_CU992933_132	ATATCTTTGAATACAAAAGGCGCTTCCCAAGAAAGTCCGCAAAACAGATCGCAA	A/G	ATGAGGGACGTTGACAACTGGATAATTAAGTTCTGTTTTTAAACATTAAGTT	0,727
snp_AM858116_547	GGAAAAGAGATTGAAGGAAACCGGAAAGTGGTACTACCTAGTGGGACCTCTTTAAC	A/T	ATGGCGGACGTCGGCTTCTCTGGAGGTGCTCCTGCTGTGTGGAGTTTGGGG	0,878
snp_FJ347724_339	AGACCCAGAGTTTTCTCAGTGTAGTGACCTGCATTTGAAAAAAGAGGAGAGGG	A/T	TATGATGAACTGGAGACAGTGGACAAAGGGAGAGAAATCCATTAGAGCTGCAG	0,92
snp_FP090949_223	GGAAATGATATTACCGGCATTATGATTAACCGGCATTGCAATCAAAAACAGA	A/G	AAACATCTCAAAAATATCCACAAATTAACCTCAAAAATGCAAGCTTCAATTCATTTAT	0,979
Cavortine	TTTTATACTGTGTCAGCATCGAAATATGTCATATACACCGATTTTTTTCTCGC	T/C	CTCAATGTGCCAGTTAAACAGCAGCTAAAACAAGTTATGCAGAGTGAAGTACT	0,905
SOD	CACCATTTGGAGAACTGTACCANAATGAGCANGCCCCCAACCCAGGTAAGTCCG	T/C	TTTGTATTTCTTTGTCATCTTACAGCCAAAAGTGGAAAAATATTTCTAATCTAA	0,983
Calcium_Dependant_Kinase	GAAGAGGCAAAAGGTGAGNAGAAATTTGATTTATACCACCTCCCTCGAAAAATTTCC	A/T	GGAAATTTGTACANTCCGTTGANGTTTTTCAACCTTTTAAATGCGGATTTTCAAT	0,557
Plastin	GCAGGAGCTAAGGTGTATGCATCCAGAGGACATTTGTTGATTTAAACAAAAA	A/T	TGATAATGACCAATATTTGCCTGCTTATGCTCGGGATATGAGAAGTCAACAG	0,876
Myosin_Light_Chain	GGACTCAACCCAACTTTGAAATCGTCAGAAAAGAAATGGCGAAACCCGATAAATG	A/G	GGTAAGAGTTTTATAAAATTTGAGGAAATTTTGCCAATCCATGAGACAAATCATGA	0,883
EF1_Alpha	TGATCCACCAAAAGGGGCCAAAGAACTTCTTGGCCAGGTAAAACCTTACAAGAAAT	T/G	TGATAGGCTCAGTACATGTTGTA AAAAGCATGANAACAAAACAGAAATTTATAAT	0,909

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
Cytochrome_p450	ACCCAGGGTCAGAAAGTACGCTGANACNTTATCATTTTCATTTTTTATTGTCATTG	A/G	TATTAATTTGAGATATGATTATGCAGAGTTTCATATANNNTATTTTCAAATCT	0,728
GlycoProtein_Hormone_Receptor	GACTCCTAAACACGGCTCAGCATCACAGTTCTCGGATGACAGACACGAACCTCAA	A/T	CTTGAGAAAAAGGCAACAGTTGCTGACATCTGTGACATCTGTAGTCAAAATGCCAGTGAG	0,928
Glutathion_S_transferase	CACCCCAACCTGAGTGAATACCTCTCCTCCAGACCCCGCTTTGTCGTATAACTCGT	C/G	ACCTGANTCNTCAGAGCNNTGCAGGCCGTCAATACAGGGCGATATACCCGGAT	0,426
Ciao1_like_Protein	AACGTGCAGTAGACAAAAAGTGTATGGATTTGGGAAGGTAATCAACATCATGT	A/T	NTTTAATAANTANAGAAAACTGAATATATCTAAATATTGATAATAATGNAA	0,429
Drac3	GCCGGGATCAGTTTACGTGTAAAAAAGGAAATATTTATGATGGATAATAGTG	T/C	GACGGAGTGAAGGAAAGTNTACATGGGGATAAGTAGGGAAGTAACAGG	0,439
Adrenal_Gland_Protein	TTAATTGCATTTTGGATTNAAAAATTAATGTTATGAAATTAATAGGTGATCATATA	T/C	ACATATTTGTGATCATATACATGATACACACATATTTATGTTNNNTGAAATGTATG	0,481
Astacin	TATTTTGTAAAAGTTGCGATGAGAGAGCTAGAAAAATACACATGTCTCCGATTTA	A/T	ACCCAGAACCAATGAACAAGACTACGTGGATTTTCATTTGATGCTCAGGGGTAAAG	0,939
Amylase_Gene_1	GGCTGGTTTCAGAGTGGACCGCTAAGCACATGTGGCCCGAGATCTTCGCGC	T/C	GTTTTTGANAGACTGCATGATTTGAATACCGCCTATTTTACTGCAGGAACCCAAA	0,62
Amylase_Gene_2	TCAGAGTGGACCCGCTAAGCACATGTGGCCCGAGATCTTCGCGCNGTTTTGA	T/G	AGACTGCATGATTTGAATACCGCCTATTTTACTGCAGGAACCCAAACCTTTATA	0,423
IK_Cytokine_1	GGTGAGTGAATGTGCACCTNCAATGTACATGTATGAAGGACAGGACTGTTAG	T/C	AATAAGCAGTGTGTANAATAAATAAAGCTAAGACTTAAGACTGGTACATTNACATA	0,55
IK_Cytokine_2	TGAAATCAAAGGGTCAAATTAACAAATTAAGATTTTGAATAATTTCAGAAA	T/C	AAATCANTTTTATAAAAAATCCAAAACATAAAATTTGGTAGCAACTATAT	0,423
Phospholipase_C_1	GAAATCAAAGGGTCAAATTAACAAATTAAGATTTTGAATAATTTCAGAAA	T/C	AAATCANTTTTATAAAAAATCCAAAACATAAAATTTGGTAGCAACTATAT	0,423
BQ426586	TGGCACTTATGTATCTGACGTCTTCAAAAGCGTTTGTGAGGTCAACGAGGAG	A/G	GCACGGAAAGCCCGCTGTACAGCAGTAATGATGNGACTNATGTGCATGCC	0,647
Amylase_Gene_A	CTGGTCAGCTTGGTGGATCTTAAACTTTCAAAAGGACTACGTTCTGTGACTCCATCGC	A/G	GGATATTTGAATCACCTGATNAGTTTTGGTGTGGCTGGTTTCAGAGGTGGACGC	0,425
Laccase_2	CCGGATTTGTGCTATGAAGGTCAAACGTTGATGTCACCGTCAACAAACAGTTT	A/G	GCATCTGATTCGGTCACTATTCATTTGGCACGGNTTGCATCAGACGGGGACCCC	0,836
Macrophage_express	GTGGATTTTGGACTGAGACACTGCTGTGACAAATTAACAATGCTACGGGAGCGC	T/C	AAATATCAGTCAATCTGGTGGCTTGGCAAGGTCACGTNGATCAGCAATCTGG	0,913
Notch_homolog_3_variant_protein	GTTTTGGAGCCATTTAAATCGAAATATTTAGACGAGTGTGAAAAGAAATGCTCTA	A/G	TGATAACGTGNGTGTCTCTATTCAAAAACAATTTCCATTGTTACCCAAAAGAAAATA	0,633
HA114_1	TAGGGCATATATCTCAAGATGCAGATCATAATGCAATGAACCCCTAAAAATTTGTT	A/G	TTATAAATCAACTTTAAATCATGGAGANTAAAGACTNAAACTATTTGCCCTTTGTT	0,838
Kazal_type_proteinaise_inhibitor	TTAGTCAAAGATTACATTTACCATAATTTCTGTTGGATCATTTTCCATGTTTCATCAT	T/G	TTCATTTAAGCTTTATGTTGGAGCCAGCAATTAGTAAACAAAAAATGAATCA	0,961
AY321300	TGATGAGTGGGGAACAGGACTTTGACGCCATGCANATAGCCCTCCAACCTGGAGAA	A/G	AGTGTCAAACAATCCCTGCTTGACCTTCAACAAGTTGGCNGANGNTCACCCGGA	0,828
BMP	GTCTGACATTTACTCAGGTATGCATTTTGATAACTTACAACAATTTGATAGGACACAA	A/C	CCGATATACTAGCGTTACTGTAGATTCCTATTTAAACGCAAAAGGAAATTAATATA	0,793
AJ557014	NTACAAAACATTTGCTTNGCTTCACTGTGAGAGGTGACTAATGTAAGACTTGTATATT	T/C	CAGGCCATGCTGGATGTAGTGCAGACGAGGGCTGGCTAGTACCTCCCTAC	0,832
BQ427193	TTAGTCAAAGATTACATTTACCATAATTTCTGTTGGATCATTTTCCATGTTTCATCAT	T/G	TTCATTTAAGCTTTATGTTGGAGCCAGCAATTAGTAAACAAAAAATGAATCA	0,961
Glycogen_Phosphorylase	CTCAAAGCTGACCCAAACAGGCGCTTTGTTCCAGGACTATCATGGTGGGAGGAA	A/T	GGCAGCTCCTGGCTATCACATGGCCAAACTGATCATCAAGCTGATCAACAGTG	0,753
Bcl2	AGAGTTGGAGGCATCTCATTCGGTAAGGACTCGGCCCTAGCGGAATATGGCGT	T/C	TTTTCCAACTGGTANACCAGATCGCGCATCTGATTTGCTCCGGGCGAGAATGA	0,471
Galectine_1	CGAGTACAACGATGCCTTTAGAACAATGGTCAATGGAAAAGCCCTTTGTAATTC	A/T	CTCACAGAACAGACTTCAGGAAGGGCAAGTTTCTGTTCTGCGAGAAGGAGCT	0,924
sodium_glucose_cotransporter_1	CGTTACTGAACTACAACAATGCCAGCTATCCGTACTGGAAGTGGGGTATACCCCC	C/G	GAGAACTCGATGAACCTGGTGGAGGGCTTANGACGACGGCTCCCTGCCCTGGC	0,876

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
sodium_glucose_cot ransporter_2	GGGCCTANGACGACGGCTCCCTGCCCTGGCCCGGCATCTTTGGACTGACCAT	T/C	TCCNCTGTCTGGTACTGGTCTGATCAAGTCATTGTCAGAGAGCTCTTGCC	0,742
TRAF	TTAAACAAATCAACAAGCATGTACACATGTAGAAATAGAGATAAANCAACAACATG	T/C	TTACAGGTAATTTTGTTCACCTAAATTTACCTCAAGAGGACTAAACCGAATG	0,542
Ficolin	GAGACGGACTTTGGGCGAGAAATGGTGTCTAGCTACCAGAGTTGATACTC	T/C	NTTAAACAAAAGCGAAACCAATAATTTGATGAATGCGAAACGTTTTAGACG	0,786
Flavin_monooxygenase_1	GTTTGACCACCTCCGCCCTCTCGGAGATGATGGGATGACGTATGGATGAG	A/C	GGTACATGAACCTCCCGAAGTAAACACNTTGTACTATGATCAGATCAGGACCA	0,906
Flavin_monooxygenase_2	GATGTGGATGACGTATGGATGAGNGGTACATGAACCTCCGAACTGTAACAC	T/G	TTTGACTATGATCAGAGCACAGACAGTCTACCGTCTGAAACCCGAGGG	0,962
Deshydrogenase	TTTTTTGGATTTAAACAAGTTTACAAAAAATTTGAGCCTA GAACCTCGACAGT	T/C	CATCGTCGAGCGACATCTCTCTGGCTTAGATATGAAAAATAACTGCTACTATC	0,942
snp_EW778176_747	AGAAGTTCATGAGGGATCCTATCCGAATCTTGGTCAAGAAAGAAATTTGACCCCT	A/T	GAGGGTATCAGGCGATTTACATTTCAAGTGGAAAGAGAGGAGTGGAAAGCTTG	0,948
snp_AM854876_196	TCTGCCACCACCTGCAATTTGACCCCTCACACAATACAGTCTTTGCCACGCTGC	C/G	GGCATCCACACAAGTCAAGGGGCGAGTATTTCCAGTAATGAGGACGCGGACAG	0,696
snp_EW777756_467	GAGCCAAGCCTTCAAGTGCAAGTTTGGACCGCTGTTTCCGCCGCTCTGACCA	T/C	CTTGCTTTCACATGAAACGTCACGAGCCCAATCCAAGTGAACACTCTTCTCT	0,844
snp_BQ427052_349	CAAGAAAAGGAAAGAAAGAAATACACCACCCCAAGAAAGAAACACAAGAA	A/G	AAGAAGGTCAAGCTTGCAGTCTCAAACTACTACAAGTGGATGAGAAATGGCA	0,932
snp_CU682725_836	CTCAGTCCAACAATCTGTATAAAGTCCATGGTAAACTGTATAAATATGTACA	A/G	TTTCAATAAAAAATTTAGAGACAGTCAAAACCTCGTTAAACCATTCATGCAGGC	0,694
snp_854416_212	TTTTGCTTCTCCTGAGGGTACAGGAAGTCTTTGACCAATATGCCAGCTTCTCCA	T/C	GAGCGATTTCCAGCGCTTGACATCCAGGGTGACAAATATCCCCACCCCTCGGG	0,758
snp_AM858631_462	TAAGATTTATGAGAAGTTGGATTTGAGATTTGGAAGAGAAAAGAAATATTA	T/C	AAGCGAATAGAACCCAGCTGATGCATATGTTTACAGAAATCATTCGGCAAAA	0,988
snp_AM859984_177	AAAGATTAGGACAAGTACCAGAGAGAATTCCTGTAATGTTGGAAAGACCC	A/G	AAATCCAGATTCAGGCATAGACAACAGCAAGTTCCTGGTCCCAATGATAT	0,948
snp_AM860393_128	ACAACCTGCAAGCCTGACCACCGCTGATCTGCTGACGTGATGGAGAATCT	A/G	ATTAATGTCARAGACATGAGTCCGGGGGTATTTAGAGTCCAACGAGAGG	0,977
snp_AM862312_607	ATAATTACCTACAACGATTCATTCAGGAAAACGGACTATGGGTCTGGTTTGA	T/C	TACACTCTGGAATGGAGAGATTTATGGAGAGTCAACCCGGATTCCTATCCA	0,969
snp_AM863611_261	TTTTGAAAACCAAGAGAGATCTCTAAAAGGACTTGATGGAGGAAAGCCAGACAG	A/G	CTGAGTAAAAATCAAAAAGGACAAGCCCAAGTACAAGAAATTCATGGAGGGAC	0,996
snp_AM863641_319	GAGGAAGAGAAAGAAAGAAATACACAGTTGAGAAAGTGGTGGACTCAGGGATGAA	A/G	GGAGGTCTGTAAGAGTACCTTCTGAAATGAAAAGTTACCAGACTCAGAGA	0,991
snp_AM866046_598	ACGCTCGAGTCGAAAGTCCCTCTCCACATTTGCCAGCTCAGGATTAGGAAAAGC	A/G	TGTTTTGGAATCTCTGATTTGAACCTTCCCAAGATCCTCTGTCAGGAGGAAAGGA	0,991
snp_AM869106_166	GATATAATCCGGACTCTTTTCGTGTCATAAGTATGAAAGTGAAGCTGAAACAACCTGTA	A/G	AGATTCAGGAAAATCCATACTACAGCCCAAGTCCAGGAGGAAAGGTTGAGAA	0,977
snp_BQ426574_124	GATATTACCAAAATTTTGGCTTTAACACCCATCTTGGAGCCCAATGTCGACTA	T/C	CAGATGAAACAATATGCTTTCAAGAGGAAAGCCCTGATGGTGTATACATTTAAA	0,997
snp_CU681648_376	ACTTTAGAAAATCAACCCCAAGACATCTTTGATTAAGAGCTGAAATCACGAGTTGA	T/G	GCCAAATGCTGACGATCAGATTCGAAAGAAATCAGAAAGTCCGCTGATGTTGAGAC	0,938
snp_CU984453_266	CGAAAAGATCAGCTATATTCGAAAATGAAATTTGTTGAAATGGAAGCCGAGGC	A/G	GACAGACTTATCAAGAAAATCAGAAAGTCCGATTAAGATAGAGGAGATGG	0,972
snp_CU988230_566	TGGATCTGAAATTCGATTTAAAATGGCACCGGTACGGGTGAATCAATTTAGA	A/G	TGCGAACTGTTGACCCTCTCTGTCAGCGGAGGGTTTACAGAAAGCCCA	0,95
snp_CU990619_287	AAGGAGCAAAGAACCACTAAGCCCAAGATAGATGATTTCTTTCGAGACAT	T/C	TTCACAATCCAGGGATTTCCCTCATCAGTATGTTAGACTAGATTTCCACCC	0,998
snp_EF68775_1672	AGGGCACCTCGACTCCGTCAGCAATGTAGCAAAATCAACGTGGTTTTGAAATGG	T/C	GTCAAAATGTCGGATAAATAAAAATCCAGTTGTACTAAAAGCAAAGGAAAGGAT	0,984
snp_FP000049_190	AACAAAATCCACAAAATGGTACAATTAACAAATAGATGTGACAGAAAAGAAAGC	A/C	TATGAAAAGCTGAGAGAAAGAAATTTGCCAAAGAAACAAACATGTGACAGATTTACG	0,917
snp_FP000500_24	ATTTTCAGAACCTACAGAATTTGACGCTGTGGTGGAGCATAGTAAAGATAAAC	T/C	TTGTCAAGTGCAGAAATTTTCGGAAATGAAAAGAAATTTAACGTAACCTAACACCC	0,994
snp_FP001079_116	GGACAGACAACAATTTTATATGATCTTCAGAGATGGCTTCCAAAAGGAAAGCTGC	A/G	AGTACTAAGGGAGCTGAATCAGAGAAAGAAAGCAAAATGGTGTGATAATTCAG	0,991
snp_FP001634_190	CAGTATGGAGTCTAGAAAATCTCAACAGATGAAGAAAGAAAGTAAAC	T/C	CCAGAACCAACAGTCAACCCAAAAGAAATGACTTGGATGCTTGGTTTTGGTA	0,958
snp_FP089799_114	GGTCTGATGAGGTCAAAACAAGAAATTCGATCCACTTACTTTACTTTTGAGGCCAGC	A/G	TTGGACTAACTGCTACTGCTGCTGGCCATGCCAGAACTCCTGCTCTAATGA	0,97

ANNEXE 6 : ANNOTATION DES 384 SNPs GENOTYPES DANS LES ARTICLES 1 ET 5

Nom du SNP	N° d'accension	Annotation	Référence
sodium_glucose_cotransporteur_1	AY551098	sodium_glucose_cotransporteur_1	Huvet,A., Herpin,A., Samain,J.F. and Cunningham,C. Gene. 2004 Dec 8;343(1):211-20.
Laccase_2	EU678320	Laccase_2	Faury,N., Renault,T., Barbosa-Solomieu,V., Brunetiere,C. and Moreau K Submitted (09-APR-2008)
EST34-6	AM856073	N/A	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacherre,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
EST34-19bis	CU682072	identique au précédent	Unpublished Davey,G. 2008
Macrophage_express	AAR82937	Macrophage_express	Kanipes,M., Holder,L. and Guerry,P. Infect Immun. 2004 Apr;72(4):2452-5.
Adrenal_Gland_Protein	CK172342	Adrenal_Gland_Protein	Huvet,A., Herpin,A., Degremont,L., Labreuche,Y., Samain,J.F., Cunningham,C. Gene. 2004 Dec 8;343(1):211-20.
Bcl2	EU678312	immunoglobulin domain cell adhesion molecule	Faury,N., Renault,T., Barbosa-Solomieu,V., Brunetiere,C. and Moreau,K. Submitted (07-APR-2008)
EST36-31-1	CU683708	Neurogenic locus notch homolog protein 2	Unpublished Davey,G. 2008
EST36-12	AM854726	Toll-like receptor 4 precursor	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacherre,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
EST36-8bis	CU684209	Alpha tubulin 84B mRNA	Unpublished Davey,G. 2008

Nom du SNP	N° d'accension	Annotation	Référence
EST104-48-2	AM858621	SNPC1_HUMAN (Q16533) snRNA-activating protein complex subunit 1 (SNAPc subunit 1) (snRNA-activating protein complex 43 kDa subunit) (SNAPc 43 kDa subunit) (Small nuclear RNA-activating complex polypeptide 1) (Proximal sequence element-binding transcript)	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bachere,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
Amylase_GeneB_2	?	Amylase_GeneB_2	
Cavortine	CK172315	Cavortine	Huvet,A., Herpin,A., Degremont,L., Labreuche,Y., Samain,J.F., Cunningham,C. 2004
EST34-30	CX069267	Succinate dehydrogenase	David,E., Tanguy,A., Pichavant,K., Moraga,D. (2006)
SOD	AY551095	SOD	Huvet,A., Herpin,A., Samain,J.F. and Cunningham,C. (12-2004)
EF1_Alpha	AB122067	EF1_Alpha	Yoshihiro Yokoyama Submitted (09-OCT-2003)
HA114_1	HA115	HA114_1	Duan,Z., Zhao,K., Peng,Z., Li,J., He,S. and Zhao,X. Submitted 2009
GlycoProtein_Hormone_Receptor	AJ549813	GlycoProtein_Hormone_Receptor	Unpublished Herpin,A. and Favrel,P.
EST34-20bis-1	CU683250	N/A	Unpublished Davey,G. 2008
Amylase_Gene_A	AJ496597	Amylase_Gene_A	Unpublished Submitted (25-JUL-2002) Van Wormhoudt A.E
AJ557014	AJ557014	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	Unpublished Submitted (22-APR-2003) Herpin A
HEST34-8	AM856617	MAP Kinase-activated protein	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bachere,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
Galectine_1	BQ426390	Galectine_1	Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguère C, Girardot AL, Garnier J, Hoareau A, Bachère E, Escoubas JM.(Gene. 2003 Jan 16;303:139-45.)

Nom du SNP	N° d'accension	Annotation	Référence
EST104-43	AM858104	ENKUR_MOUSE (Q6SP97) Enkurin	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacher,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
Ficolin	HS135942	Ficolin	Unpublished 2010 Lucas,S., Rokhsar,D., Wang,M., Lindquist,E.A., Hedgecock,D., Boudry,P., Gaffney,P., Guo,X., Reece,K., Warr,G., Cunningham,C.
Flavin_monooxygenase_2	AJ585074	Flavin_monooxygenase_2	Boutet I, Tanguy A, Moraga D. <i>Biochim Biophys Acta</i> . 2004 Jul 13;1679(1):29-36.
Cytochrome_P450	AF075693	Cytochrome_P450	Lopes,E., Ohresser,M.C.P. and Cancela,M.L. (1998)
HST36-28	CU683323	Chitotriosidase-1 precursor	Unpublished Davey,G. 2008
TRAF	BQ426742	TRAF	
Myosin_Light_Chain	AJ563459	Myosin_Light_Chain	Unpublished Kausland,A.H., Herpin,A., Favre,P. and Cunningham,C.
EST104-36	AM856765	Oyster-gonadal-TGFb-like	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacher,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
EST36-35	CU686145	Suppressor of cytokine signaling	Unpublished, Lindeque,P. 2008
Astacin	AF075684	Astacin	Unpublished Lopes,E., Ohresser,M.C.P. and Cancela,M.L. (1998)
sodium_glucose_cotransporter_2	AY551098	sodium_glucose_cotransporter_2	Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain JF, Cunningham C. <i>Gene</i> . 2004 Dec 8;343(1):211-20.

Nom du SNP	N° d'accession	Annotation	Référence
EST54-40	FP009463	CamK4 (FA oxidation)	Unpublished Pascal Favrel cDNA library Genoscope 2009
Amylase_GeneB_1	AJ496603	Amylase_GeneB_1	Unpublished Sellos,D.E. Submitted (25-JUL-2002) Van Wormhoudt A.E
Phospholipase_C_1	EF999947	Phospholipase_C_1	Sauvage,C., Bierne,N., Lapegue,S. and Boudry,P. Gene 406 (1-2), 13-22 (2007)
Glutathion_S_transferase	AJ577235	Glutathion_S_transferase	Boutet,I., Tanguy,A. and Moraga,D. Mar. Biol. 146 (1), 53-64 (2004)
AY321300	AY321300	Ferritin	Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguère C, Girardot AL, Garnier J, Hoareau A, Bachère E, Escoubas JM. Gene. 2003 Jan 16;303:139-45.
BQ427193	BQ427193	NA	Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguère C, Girardot AL, Garnier J, Hoareau A, Bachère E, Escoubas JM. Gene. 2003 Jan 16;303:139-45.
BMP	CU986524	BMP	Unpublished Pascal Favrel cDNA library Genoscope 2009
Notch_homolog_3_variant_protein	?	Notch_homolog_3_variant_protein	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bachere,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
EST104-48-1	AM858621	SNPC1_HUMAN (Q16533) snRNA-activating protein complex subunit 1 (SNAPc subunit 1) (snRNA-activating protein complex 43 kDa subunit) (SNAPc 43 kDa subunit) (Small nuclear RNA-activating complex polypeptide 1) (Proximal sequence element-binding transcript)	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bachere,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
Glycogen_Phosphorylase	AY496065	Glycogen_Phosphorylase	Bacca H, Huvet A, Fabioux C, Daniel JY, Delaporte M, Pourreau S, Van Wormhoudt A, Moal J. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2005 Apr;140(4):635-46.
Drac3	BQ427024	Drac3	Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguère C, Girardot AL, Garnier J, Hoareau A, Bachère E, Escoubas JM. Gene. 2003 Jan 16;303:139-45.
Ciao1_like_Protein	AY339886	Ciao1_like_Protein	Choi,D.S., Doh,E.J., Kim,J.D., Ahn,W.K., Ahn,B.M. and Oh,S.E. Submitted (11-JUL-2003)

Nom du SNP	N° d'accension	Annotation	Référence
EST34-14	AM854479	N/A	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bachere,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
EST104-41	AM858002	N/A	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bachere,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
HEST34-26bis	CB617381	CD109 antigen précursor	Boutet,I., Tanguy,A., Moraga,D. Gene 329: 147-157 2004
EST36-29-2	CU683194	Ras-like GTP-binding protein	Unpublished Davey,G. 2008
Deshydrogenase	BG467415	NADH Deshydrogenase	Rafferty,G.P., Powell,R. J. Molluscan Stud. 68 (4): 397-399 2002
EST36-36-1	CU684879	Ras-like GTP-binding protein	Unpublished Davey,G. 2008
HEST34-17	AM854673	Heat shock 70 Kda protein	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bachere,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
EST36-29-1	CU683194	Ras-like GTP-binding protein	Unpublished Davey,G. 2008

Nom du SNP	N° d'accension	Annotation	Référence
EST104-40	AM857857	NA	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacheire,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
EST34-23	FP091069	Dopamine receptor	Unpublished Huvet,A. 2008
EST104-49	AM858780	MSRA2_ANASP (Q8YWD8) Peptide methionine sulfoxide reductase msrA 2 (EC 1.8.4.6) (Protein-methionine-S-oxide reductase 2) (Peptide Met(O) reductase 2)	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacheire,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
Plastin	AF075691	Plastin	Lopes,E., Ohresser,M.C.P. and Cancela,M.L. (1998)
BQ426586	BQ426586	leukocyte elastase inhibitor-like	Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D, Barreau-Roumiguère C, Girardot AL, Garnier J, Hoareau A, Bacheire E, Escoubas JM. Gene. 2003 Jan 16;303:139-45.
EST34-21	CU683279	Tetratricopeptide repeat protein 28	Unpublished Davey,G. 2008
EST104-33	AM856249	Neuropeptide Y receptor	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacheire,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
Kazal_type_proteinase_inhibitor	CB617338	Kazal_type_proteinase_inhibitor	Boutet,I., Tanguy,A., Moraga,D. Gene 329: 147-157 2004
EST34-19-2	CU682072	identique au précédent	Unpublished Davey,G. 2008

Nom du SNP	N° d'accension	Annotation	Référence
IK_Cytokine_2	AM857010	IK_Cytokine_2	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacher,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
Calcium_Dependant_Kinase	AY713401	Calcium_Dependant_Kinase	Unpublished Huvet,A., Fabioux,C., Bacca,H., Le Moullac,G., Herpin,A., Cunningham,C. and Van Wormhoudt,A.
EST34-19-1	CU682072	N/A	Unpublished Davey,G. 2008
IK_Cytokine_1	?	IK_Cytokine_1	Sauvage,C., Bierne,N., Lapegue,S. and Boudry,P. Gene 406 (1-2), 13-22 (2007)
EST34-25	CX068896	Cytochrome C oxidase subunit 1	David,E., Tanguy,A., Pichavant,K., Moraga,D. J. Biol. Chem. 2004
HEST36-22bis	AM857760	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacher,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Klages,S., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
Flavin_monooxygenase_1	AJ585074	Flavin_monooxygenase_1	Boutet I, Tanguy A, Moraga D. Biochim Biophys Acta. 2004 Jul 13;1679(1):29-36.
EST54-9	AM854810	inhibitor of kappa kinase epsilon	Unpublished 2008 Tanguy,A., Bierne,N., Saavedra,C., Pina,B., Bacher,E., Bonhomme,F., Boudry,P., Boulo,V., Boutet,I., Cancela,L., Dossat,C., Favre,P., Huvet,A., Jarque,S., Jollivet,D., Lapegue,S., Leite,R., Moal,J., Moraga,D., Reinhardt,R., Samain,J.F., Zouros,E., Canario,A.
HEST36-31-2	CU683708	Neurogenic locus notch homolog protein 2	Unpublished Davey,G. 2008

ANNEXE 7 : PREPARATION DES LAMES D'HISTOLOGIE

1. Composition du fixateur de Davidson modifié

Réactifs	Quantité pour 1L de Davidson (mL)
Eau de mer filtrée	300
Ethanol 95%	300
Formaldéhyde 36%	200
Glycérol	100
Acide acétique (à ajouter au dernier moment)	100

2. Les bains pour l'inclusion en paraffine

Réactifs	Temps de balnéation (minutes)
Ethanol 70%	60
Ethanol 95%	30
Ethanol 95%	30
Ethanol 100%	15
Ethanol 100%	30
Ethanol 100%	60
Xylène	60
Xylène	60
Paraffine	45
Paraffine	45

3. Les bains pour la coloration à l'hématoxyline/éosine

Réactifs	Temps de balnéation (minutes)
Xylène	15
Xylène	15
Ethanol 100%	15
Ethanol 100%	15
Eau courante	5
Hématoxyline de Harris	1,5
Eau courante	5
Eosine Y 1g/L	4,5
Ethanol 100%	1
Ethanol 100%	1
Ethanol 100%	1
Xylène	1
Xylène	1

ANNEXE 8 : LISTE DES 384 SNPs GENOTYPES DANS L'ARTICLE 4

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_EW77756_467	CACGGGAGCCAGCCTTCAAGTGCAGAGTTTGGACCGCTGTTTCGCCGCTTGACCA	T/C	CTTGCTTTCACATGAAAGCTCAGGAGCCCAATCCAAAGTGAACACTCTCTCTCCAT	0,844
SOD	CTGTGACACCATTTGGAGAACTGTACCANAATGAGCANGCCCAACACGAGTAAGTCGG	T/C	TTTGTATTTCTTTCGATCTTACAGCCAACTGGAAATAATATTCCTAATCTAAGAAAT	0,983
EST36_29_2	ACACTTCTGTCCAAATGTCCTTATTTCTGGTGGCAACAAGAAAGATACAGAAACGA	T/C	CCCAACACAAAAGAGCTCAAAAAGAAAGCAACAGGAACAGTCAAAATCGCAAGAGGG	0,975
HES136_22bis	TGACGATGCTCAGATGCTGGAAGTGAAGCAGGAGATGAACCAAGATGTGATCTTTAA	T/C	TTTGGCCCCATTTTAAACAACCTGCCAAATATTGAAAGAACTTCATYTAACATATGGAGTCA	0,97
Flavin_monox_2	GAGATGATGGGATGACGTGATGGATGAGNGGTACATGAACCTCCGAACCTGTAACAC	T/G	TTTGACTATGAGATCACAGGACACAGTCTACCCTGCTGTAACCCCGAGGAAATCAAA	0,962
EST34_14	AAGGTCAATACATCAAAATGCACAGCAGCTGCTTTCGAATCTGTGCAACACTTCAGGG	A/G	GTAATACAGGTCAAGTTAGAATCCAAAATGCTCTCAAACAAAATCAGCAAGGTTGTAC	0,956
Deshydrogenase	TTTTTTTTTTGGATTTAAACAAGTTTACACAAAAAATGAGCCTAGAACTCGACAGT	T/C	CATCGTCGAGCGACATCTTCTGGCTTAGATATGAAAATAAATGCTACTATCAGACA	0,942
Astacin	ACCAAGTATTTTAAAGTTGGGATGAGAGAGCTAGAAAAATACACATGTCCTCGATTA	A/T	ACCCAGAACCAATGACAAGACTACGTGGATTTTCATTTGATGCTCAGGGGTAAGGC	0,939
EST34_19bis	GATTAATTCATCAACAGTCCAGCCTTTTCTTACTGCTTTCATCATGGACATTCATATT	T/C	AGCATGAATTTAGCCATCTGAAAATTCAGCAAAAATGAAAATTCATGTTCAACATTTT	0,938
HES134_17	CATGATGATGCCACCACCAATAAACAATGCCAATAAGTGAACAATTTGATACCAGT	T/C	AATTTGGCAACACAGAAACAATGTAGCCAGGAATGCCAATATGATGAAACGCCGT	0,937
GlycoProtein_HR	CCAGTGACTCTAAACAGCGTCAGCATCAGTTCTCGGATGACAGACAGAACTTCAA	A/T	CTTGTGAAAAAGGCAACAGTTGTCACATCTGTCAGTCAAATGCCAGTGAGCGAAGCC	0,928
Galectine_1	CGAGTACAAAGTGCCTTTAGAACAAATGTCATGGAAGCCCTTTGTAATTC	A/T	CTCACAGACAGACTTCAGGAAGGCAAGTTCTGTTCTGCGGAGAGGAGCTGTACT	0,924
Macrophage_express	TCANTGTGGATTTTGGACTGAGACACTGCTGTGACAAATCAATGTACGGGAGGCG	T/C	AAATATCAGTCAATCTGGTGGTGGCAAGGTCACGTTGATGACGAAATCGGATTCAG	0,913
EST36_31_1	ACACTCAATGCTGCCAAATCCCAACGACAGATGGCTGTGACCTCCACCTATGACAA	T/C	GAGCATACACATGTGAACGACGTGGATGTTCTGTTGCTCCAGATGGTTAACTCCCTGATG	0,911
EF1_Alpha	AAAAATGATCCACCAAGGGCGCAAGAACTTCTTCCAGTAAACCTTTACAAAGAT	T/G	TGATAGCCCTCAGTACATGTTTGTAAAAGCATGANAACAAAACAGAAATTAATAAFAACAT	0,909
EST36_35	TGCRGAAACCTGGCAATATGTTCTTCTCAATGTTGCTACACATTTCCAGCATCTCTC	T/C	CCCTCAGTCCGCCCACTTCCCAAGTCGACTACATCCATTTGCTAGTCCAGACATTTGTA	0,909
EST104_49	TAGAWTGGAGTTAAAWTTTGAATAATTTTAGGTTCTTTTGGAAAAATCACAA	T/C	CCCACTCAAGGGGATGCGTCAAGGGAAATGAYACWGGRACTCAGTACAGATCTGGGATTA	0,885
Sod_gluc_cotrans_1	TACAACGTTACTGAACTACAACAATGCCAGCTATCCGTACTGGAAAGTGGGTATACCCCC	C/G	GAGAACTCGATGAACTGTTGAGGGCCCTFANGACGCGGCTCCCTGCGCCCGCCGGCAT	0,876
HA114_1	TGGCTAGGGCATATATCTATCAAGATGCAGATCAATGCAATGAACCCCTAAAATTTGTT	A/G	TTATAAATCAAATTTAAATCATGGAGANTAAAGACTNAAACTATTTGCTTTGTTTAAACA	0,838
EST104_48_2	ATTCTGTTTACCCCAACAAATTTCCAAATTCGGGTGGGGTCTGTACATTTGTATGG	A/G	ATATACTGCATCAGCCGACGTGAAACGTTAGAAAGATCCGGGTGACACAAGATATCTGG	0,837
AJ557014	ATCANTACAAACATTTGCTTNGCTTACTGTGAGAGTGAATAAGTAAAGACTGTATATT	T/C	CAGGCCATGCTGGATGTAGTGACAGAGGGCTGGCTAGTCACTCCCTACGAACTACT	0,832
EST104_48_1	TTTCCAAATTCGGGTGGGGTCTGTACATTTGTATGGRAATATGCTGCACTCAGCCGAC	T/C	GTGAAACGTAGAAAGATCCGGGTGACACAAGATATCGGAAACAAGATATGGAAATCCA	0,83
AY321300	GACCGTATGAGTGGGAAAGGACTGACGCAATGACGCAATGACGCAATGACGCAATGGAGAA	A/G	AGTGTCAACCAATCCCTGTTGACCTTCAACAGTTGGCNGANGNTCACCCTGCTGCTCAG	0,828
EST104_43	TTGATCAGGAGAAAGGATGAAATGCAGAGACCAAGGAGGATGATGCTATGTTGTC	T/C	GAGCATTTCCGTCGGAGCCATGAAAATCTCTCACAGCCGACGAGAGCTGCAATTTCTC	0,802
EST104_40	TTTTAAACAACAATATAATTTAATCTAATTTGTACAACCTATATTTTTAAAGGGACACTT	A/C	TTATCCAAATTCACATAAACCAACCATTTGACTGACTATAATTTGAAATTCGGGAGCCACT	0,794
BMP	ATTTGCTGACATTAATCAGGATGCAATTTGATAAATCAACAATTTGATAGGACACAA	A/C	CCGATATACTAGCGTTACTGTAGATTCCTATTTTAAACGCAAAAGGAAATTAATATAAGAA	0,793
HES136_28	GATTTGATGACGACAKTAAACGTTGGGATCAACCTTAAAGAACTTTTATTGCTTACTCG	C/G	TTTTGTAAACAAGAAACAATAAGGATATTTTTCTYACACTCAGGAAAAAATTTGATTTCA	0,758
Sod_gluc_cotrans_2	GGTGAGGGCTANGACGACGGCTCCCTGCCCTGGCCGGCATCTTTTGGACTGACCAT	T/C	TCCNCTGTCTGGTACTGGTTCCTGATCAAGTCAITTTGCCAGAGAGCTTCCGCCCAAG	0,742
HES136_31_2	CACAGATGATGACATGCCAAAAGCAAGCATGCCAAGTACCCATCCCTACACCAACAGCT	T/C	TGTTTATCTRTGTACCCATAGCTTTAAACATAATACATTTATTTTACTGTTCTTTCT	0,698
EST36_36_1	ACTGTCACCTCATGTAAGAACAAAAAACCAAAAATCTCCGAGAACCTTACGAAAT	A/G	TCATAAATCTAAATACATTAATAAATTAACATAAAAAATTTTAAAGAAATTTGGTGAAG	0,66

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
Notch_3	TGAGTGTTTGGAGCCATTAATCGAATAATTTAGACGAGTGTGAAAAGAAATGCTCTA	A/G	TGATAACGTGNGTGTCTTATCAAAAACAATTTCCATTGTTACCCAAAAGAAATACCAGTG	0,633
EST34_6	TACGTAACAATAATACTATRTCTGCATTTTGATTTGATATATAGGTAATAG	A/C	TCAATGCTATAGAGCAATATACAGTATATAGTGCTTTTAAATTCGTTTTTACG	0,562
Adrenal_Gland_Prot	GGAATTAATGCAATTTGGATTNAAAATTAATGTTATGAAATTAATAGGTGATCATATA	T/C	ACATATTTGATCATATACATGATACACACATATTTATGTTNNTGAAATGATGACTNITG	0,481
Drac3	ACAGTCCGGGGATCAGTTTACGTGTGAAAAAGGAAATAATTTATGATGGATAATAGTG	T/C	GACGGAGTGAAGGAAAGTNTACATGGGGATAAGTAGAGGAAAGTAAACAGGCCAGTTT	0,439
Amylase_GeneB_2	TGGTTTCAGAGTGGACGCCCTAAGCACATGTGGCCGGAGATCTTCGCGNGTTTTTGA	T/G	AGACTGCATGATTTGAATACCGCTATTTTACTGCGAGAACCAACCCCTTTATATACCTG	0,423
EST34_21	TTGAGTTTATACCCAGCTCCAGATGCTGCTGCAGACRGTCTGACTC	A/G	CTGTCCGTCTCACTCTCACGRCTGCTGTTTCTTAAATAAAAAAAYATTTCCCTT	0,406
snp_AM861624_248	TAATATTTTACGTGAGAAATGTAATAAGGTTGCTCTTACAGCCACGAGGAAAACTC	A/G	CTGAGCAAACTTTTCCAGTTTTACATAATGCAAGTGAAGTGAAGTGTGGACGTGTGTGTGTTT	0,998
snp_AM862538_267	GCCAAAAGGGGACCCCTGGGAGGAGACTTTACAACCTAAGGATGTTGTTCAAAGA	A/G	GATTTACCCAGCTCTCCAAAAGTGCAGTTTCGAGCCCAATGTTGTTTCCACCAATGTG	0,998
snp_CU990619_287	AAAAGAGGAGCAAGAAAGACACTAAGGCCAAGAGTAGATGATTTCTTGCAGACAT	T/C	TTCAATCCAGGGGATTTCCATCAGTCATGTCATGTCAGTGTAGACCTAGATTTCCACCCCTCT	0,998
snp_AM864952_331	TGATGACGACGACATGACATTTGACCTTTGGCAGTGACGATGAGTTGATGAGGAGGC	A/T	GAAAAATCAGACAGGAAAGATAGCAGCATATGAGCCAAAGAAATCTAAAAAACCCGC	0,992
snp_AM863641_319	CTGAACCTACTGTTATGTTGACTGGGAAAGAAAGGGCGGTGCAGACTTTGAACA	A/T	TAATGCAATATTCAGACGACATTAATAGCAGTGTCTTTTCAATTTTGGTGGATCTGAAC	0,992
snp_AM866046_598	AAGAAGAGAAAGGAAGAAATACACAGTTGAGAAAGTGGACTCCAGGATGAA	A/G	GGAGTCGTAAGAGTACCTTCTGAAATGGAAGGTTTACCAGACTCAGAGAACTTTG	0,991
snp_AM865369_256	ACAGTACGCTCGAGTCGAAGTCCCTCCACATTTGCCAGCTCAGGATTAGGAAAGC	A/G	TGTTTTGAAATCTCTGATTTGAACTTCCCAAGATCTCTGTCAAGGAGGAAAGGAGATAC	0,991
snp_DV736300_603	GCACAAGAACTTTGAGATGACGGTGAATGATTTGGACAGAGTTTTCGAGCCCTTGA	T/C	GAGGACAAATGATGGATTTATCAATGAACTTGTGAGTGGGTCAAAGGGCTGTCCATTTTCTG	0,989
snp_AM858631_462	AGAAAGATGTAAGGGAAATCCACATTTCTGTTGACTGTGTTAAATAATGTTGACATGTT	A/G	TACGAAATGGTTTACAGAACACGATGAGCCAAATTTTACAACTTTACAGGATGTCCAAATC	0,989
snp_AM858380_181	TGCAATTAAGATTTTATGAGAAATTTGGATTTGAGATTTGGAAAGGAAAAAATAATTA	T/C	AAGCGAATAGAACCAACGATGATGATGTTTACAGAAATCATTCGCAAAAAAGGACAAA	0,988
snp_AM858743_147	AACCTACGGGAATGTCTGTTTAAAGTGGGTTTACAGTGCAGAAAGAGATGAAT	T/C	TCATACCAAGAGATGCTGCCCATCTACCTTGAACCTGTCAACCAATCCAAAGAAAGGTG	0,986
snp_BQ426370_37	ACATGAGTTGATAATGTCATAGCACAGATTTCTCGGAGTACCCTGACTTTGATGA	T/C	GCATGGGATTTAAAAAGTTTAAAAAGAAATTTCCGATTTGACATGATAAAAAATGAACTG	0,985
snp_AM858313_325	GGATTAAGTGAAGTCTTCAATATTTGAAACAGTCACTTTGTAAGAAATCACATAGTAA	C/G	GTCTCCACACAGAAATGGCAGAAATCCCAAGATCCCAAGCTGTCAACCAATCCAAAGAAAG	0,985
snp_AM863490_83	ACAAACAGTCGGAAAAATTTGCAATTTGATATCACTCCATGGAAAGGCAACAGTGAG	T/C	CCTGAACAATTTAAAAAATAGCAGTGAACCTGAACTGACTGAGGATACTCTCAGTGTACATA	0,98
snp_AM863381_54	CAAGCTTCAAAAAGATTAACAACATGTAACCTTAGCAAGTGGCAAGCTTGTGCTCAG	A/T	TGAATGAAATCTTTGGTGAAGAGGAGCTTGTGAGTGGAAAGTGGTGCCTTGTG	0,98
snp_AM869106_166	ATAAACATGGCGATGCTTAGTTGGAATAACCGACTTTCGACTTGAAGATTTGCAATTTACT	T/C	GGCATTCGATCGGAAAAACCTTTGTAATGAGTGCCTGACCCGCTCAAGGCTCAAGGCTTACA	0,979
snp_CU984453_266	TAATCGATATAATCCGACTCTTTTCGCTGCTATAAGTGAAGCTGAAACCAACTCGTGA	A/G	AGATTCAGGAAATCCCATACTACAGCCCACTGACCCAGGAGGTTTGAAGAGGAAATA	0,977
snp_CU987112_458	AGCCTCGAAAAGATCACGCTATATTCGCAAAAATGAAAATTTGTTGAAAATGAAAAGCGAGGC	A/G	GACAGACTTATTCAGAAAAATCAGAAAGATGCGATTTAAAGATAGAGGAGATGAAAACCTCT	0,972
snp_AM853792_146	AACGACTCGGTGACTTTACTCAGGCAACTTCTCAGGAAACAAGACTTTTTCAGGAAGC	T/C	GTCCATCGCTACAGACGAGGACATCGCACGCGATGAGTTCCAGTTTTGATTACGATGTG	0,972
snp_FP089799_114	ATTCTAAACGGTTTTGTCGGCTTCAACAACCTGCACACTGTGCCTTATTACTTATAT	T/C	GCCCCATGTTACACTGCTGGAAAAATGCTGAGGCGGTGCGGGACTCGTGCATCATGGT	0,971
snp_AM862882_512	TTCTGCTGATGAGTCAAAAACAAGAAATTCGATCCACTTACTTTACTTTGAGCCAGC	A/G	TTGGACTAACTGCTGCTACTGCTGTGGCCATTTGCCAGAACTCTGCTCTAATGAATAATTG	0,97
snp_EW779545_265	CAACTTCTATGCTCAGTACAGATCCATTTGAACCGTATCTGAAGAAAAAGGATGGCAGTGA	A/C	AAGAACTTTGGAGCAAGCAGTACTACAAACACAGGGGACAGGGCTAAACTGGACG	0,967
snp_AM864324_160	AGGAGGCAAAACCTCAGGATTTGGTTTAAATTTATGATGCTTGGACTTTGCCAAGAGTT	T/C	GAAACCAATACAGATACAGAGACATGGCTTAGTAGAAATTAAGAAAAACCCGCCGAAA	0,967
snp_AM866419_269	GGATGATACTAAAGCCCTTGAAGAAATTTGTTATCAAGATTTGGATGACACTCACTT	A/G	TTCACTCAGCAGACATTTCCGAACTCTCAAGATCAAGTGTGACTGACTGAGCAAAA	0,966
snp_CB617405_591	AGCATTTGAAGATGTTGGACATTCATGATGACAGAGCTGATAAGAAATTTTAAAT	A/C	GGCGAACTTACCAGATGATAAAAAAGGAAACATCAGTAAAGCAACCACTCTTTCAAT	0,965
snp_AM854342_374	TAGAGGAATGGACATTTGAAAGAGTCAACATCGTATTTAACTATGACATGCCAGAACTC	T/G	GACACTTACTGCACAGTGGCTCGTGCAGGTAGATTTGGAAACAAAGGCTTCTGCTATA	0,964
	GAAAAGCCAGAAAGGCCCTTTGATGAAATTAATAATGCGCAACCAAAATGAAAAGATGTCT	T/C	TCGATTTTGAAGGAGAACATAGTTTCTTTAATTTATGGAATTTGGTTCTGAAAAGAGCATG	0,963

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_BQ426841_203	TGGAGCTGTCAAAGGGCATGCCACAAAGTTTTACCATGGCAAGACTGGTAGAGTTTT	T/C	AATGTAACAAACAGGCTGTGGAGTCAATCAACAAGAGAGTGAGGAAAGGGTCAT	0,94
snp_CU986741_195	ACAGCTATTTCAAGTCAATCATTTTTATTTGGGGTGTAGGGTTACAT	A/C	TGCAACAGTTCCACAGACCATGTACATCTTACTGCTGGATTTGCATCATGCAAT	0,939
snp_AM857062_374	CACAGCGGTCCAGGAAAGTATAGATCTCTGGCACCTATGTACTACAGAGGGGCATCAGC	C/G	GCCATTTGTGTACAGACATCAACAAGGGAGGCCCTTATAGAACAAGTAAAGGACTGGGTC	0,938
snp_EW779181_749	GGCATTCCAGCTGGGAGCCATTCCTCATAAATCACCTTCAGGAGCTGTTCTCTCCAA	T/C	TCCTTATCCTCAGCTGTGAGTTTCTACTCCCATTTTTTCAGCCAGAGCAAGTGTATTCTCT	0,933
snp_AM855000_378	AGCCAGCAGAAAATATTTCAAGTGGTTCTCAAGGTCAATTTAATCAAAAGTCTACCAGCA	T/C	ATAAATAAAGTCCCTCTATGCAAGAGGAAATACTTGGCCCTAGTTCAAGAAAATCAACATG	0,932
snp_AM858186_636	GGCCAAATATGGGATGTCCCATGTGCGTGTGGGATGTGGGAGGTTTAAACCTTTGTC	A/G	ATTGCAGTGAATGCTCTCTGGCCCTGACTGCAATTTACACTGCTGCTGCAATGGAAGTGT	0,931
snp_AM860034_48	AAACAGCTCAAAATGACGGACACTATGCTTGTGGTCTTAAAGGGTAAACCAAAAGCC	T/C	TAAACCTATGCAATTAAGAAATTAGCAAAAGTGCACAAAGATCATCCAGGACTGGAAAGCT	0,929
snp_FP008372_101	AATGACTGAACAGATCAGACGACGCGCAATGGAAGTAAATCAGAAAATACCTT	T/C	ACCAGTGGGCCAACGACGACCTGAAAATGCAAAAGTGCACAAAGAAATATTAACTGGATTCT	0,929
snp_BQ426928_40	CGCATGAAACATTTGCCATTCACAGTATCAATCAAGCAAGTAAACCCATGATCAAAAGT	A/C	GAGTACAAAAGGGGAAAGAAAGACCTTCTGCTGAGGAAGTCTCATCCATGCTCCTCAAT	0,928
snp_EW77736_246	CACATACCAGTCCATGGCTCTACTTCGATCGGACGATGTGGCTTTGCCAGGATTTCA	T/C	AAGTTCTCAAGCAGCTGCTGACGAGGAACGTGAGCATGCCGGAAGTTGATGAAATAC	0,928
snp_EW779181_638	TGATTTCTTTGGGCTCTCATGCAAGTGGTGAAGACATGTTAGAGAGGGTCAAGAT	A/G	TACTTGACAAATCCAGATCCAGCATGGCATCTTGGCATCTTGGACATTTCTTGCCTTCTCA	0,927
snp_EW778458_567	TGTTCTGAAGAAGAAATGCCCCACATTTATGTTGGTACACTGGTAGAATCTAGCCCT	T/C	TGCCATTTCAAAGTCTCAACCTGAAAGAAATGCAAGCACTTGTCTTGTGAAATGTGAC	0,926
snp_AM856944_535	CAGTTTTGATCTGTGGGTCATACGGATCGGATGGTACCAGCCCGAGGGTCCAGCAC	T/C	GCCATGTTCAACCTCTGTTAGATAACCAAGATTTGGTTTGAAAAACAGCAAAACGTTCCAG	0,92
snp_AM858680_74	AGTCATGTTGAGACAGCCACCCTCCGGTCAGGATTTGCTCTGCAAGACTCTGCTGGGT	T/C	GCTGAGAGGGTAAACACATGCTGAGAGAAAGCCATGAGCATTTCTCAAGATGCCAAAAT	0,92
snp_CU682053_467	GAGTGTGGCTTTCTCAGCCGACACCCGACAGATTTGCTGGATCCAGAGCAAAATCCAT	T/C	AAACTGTGAAACACTCTTGGAGTCTGTAATAACACAATTCAGGATGAGGGTCCACCCGAC	0,92
snp_AM860592_273	TGAAGAAAACAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAG	T/C	AATGTCCTAAAGATTTGCTCCAGTGGTTGGGGTATATATGTTGTTGAAAGAAATGTAACCC	0,918
snp_CU683658_368	AAACAATGACCTTATCGCATTTTCAAAAATTTGGAAAAGCTGTGTGACACTATTGA	T/C	AGTGGAAAATGACCAAGGACTTAGCTGGTGTATATGTTGTTGAAAGAAATGTAACCC	0,918
snp_EW778390_285	CACAGCTTTGGAGCTCAGTCCAGTGGAGCATTTGTAACATTTCTCTACCAGGATTT	T/C	GCTGACAGCAGCATTGCCAAGACAGGGGTTCTGTGTATGATGCAAGGAGGAGACAGA	0,918
snp_AM863641_406	ATGAAAAGTTACCAGACTCAGAGAACTTTGGAAACCAAGAACTTTAGATTGTC	A/C	GACCTTATAGCAGAGTTTGGAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAA	0,917
snp_AM865369_184	ACAGATGCTGAAGCAGCAATGCCCAACAGTCCCAAACTCCGATGGACCGCAATAAGTT	T/C	AAGCACTTGTGCACAAGAACTTTGAGATGACGGATGAAATGATTTGGACAGAGTTTTT	0,916
snp_AM861389_162	TCAGTTTGTAGAGTATAGCTCAACTTTCCAACTGCAATTTCAACGAACTTAAAT	T/G	GGATTTGAAAAGAAATTTGAACAAGAACTTTAAGGAGTTTAAAGCACTGCTAGTGA	0,912
snp_AM858494_211	AAATGGCACTTCTCGGACCAGGTCGTTTACGACAGATAGCAGTGGCCAGTTTCT	A/G	GGTGGACTTATTTCCGCAATGTTGAAATTTGTTGATAACAATAAGAACTCGCTAGTGA	0,911
snp_AM861208_421	TACAGAAAACCTGCTGAAAGGAGACTTTGGATAATTTTGTGAAAGCTGTGAAATGAAG	A/G	AAGTGGTGGTTGTAGGGACGACCCACTAATGTGCTAATCAAGTGTCTGGTCTAGATAAT	0,91
snp_AM857471_352	AAAA-TTCAAGATGAAGTCAAGCTTGTGCAAGGCAAGTATGGGTTTCAAGGAAAGC	T/C	CTGCAGCAACTTATCCAAAAGAGAGTTGACATGTATGACGAGGAACTTAGCTTACTGGGT	0,909
snp_AM858323_344	GGAAGACTCTCCGGCCCTGTACTGTAACCCCAACCCCTCTCCCTGGACATTTCTTG	T/C	CTGTTTTCATGGTCAACATGTGCTGAACTGCTGATCCCTGATCCCTCTTTTGAACAGAAACA	0,908
snp_AM867415_381	TCCTGAAAGATTATGCCCTCCGAAATTTAAACAAAGTGAATCGGACTTTAATGCCTTCCC	T/C	GATCTTTCCAAAAGTGAAGGTAAGCTTCAAGCAGCTGTTAGCAGAGATGCGGCCCATCC	0,908
snp_AM861626_196	GCCACCTGCACAGAGCCGAAACCTCTGAAAAGGACAGATGATGTTTTTCACTGGACTT	T/C	GGTATCAAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAA	0,907
snp_AM858814_476	TTAATTTTATATATTTGTTTTGATCCATCTTTTGGTGGCCAAAATAAGTT	T/C	CTATTTGCATGAAGTCACTAATAATTTAGATCCCCCATATAAAGATCAATGAGGAGAGA	0,906
snp_AM858186_333	GCCTGTGCCGTGGATACAGGAATGATGGGGCCATCCAGTCCGCAATGAAGGAGCAGC	A/G	GACAAGTTTGGGGGATAGATCTCTGATCAACAATGCCAGTCCATGCTGACCCGGG	0,905
snp_AM860852_202	TAAATGTTTTCAGAACAAATAAAGAAATGACAATGACTGGTTTCGCTAGAACTTAACAC	A/T	GAGGGCACTCGTGGTTCCGGAAAGTGGTGGTCCAGGCTTCCAAATCAGAGTTT	0,905
snp_AJ565506_195	CAACTCTGGACGTCACCAATGATGGCAAAATCTCCATGAGGACGTCGAGGATCCAG	A/G	AACAAAATCCAAACCTTACAGGCTGTTGGAGACAAAAGGAAAGTCCAGGTTCAAT	0,904
snp_AM854835_518	AACAGGAAAATAAACCAATTTTAAACAATTTACATGATGAAATCCAAATGAAAATA	A/T	TGTACTTGTGAACTCCATGGAAGATAATTTATGATTTTATTTGATCTTACTTGGCCAAAT	0,904
snp_AM867342_588	GGGTAGTCTTATGGAATCAGGTTGGTCCCTGGATAATCTATGGTTTCCGACAGGTAACC	T/G	AAGTGGCAACTTGGAAAACCAATTCACAAATGAAATGGGAAATTTCTCTCCCAAGGAAAT	0,903

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_AM868054_79	AGTGTCCCTGACGAAGAAGAACAGCTGGAGATTTGGTCAGTATGGTCAAGTCCCT	A/G	CCAGGATGTTCCAGAAAGTGGTCTAATGCTGGGGAGAGTTGGAGATTCTGATCCAT	0,903
snp_AM860304_85	AATGAACAATGATTACAACAGATTGAAGAACTGTAAGTGCACAGGATGTGACTGCT	A/G	TCAGGAGATTGTTAAGGGTGGAGTTAATGTCAATTCACGCTCAGCTGCACAGGATTGGA	0,902
snp_FP000071_19	AGCCACAGATTATGACCCAGCTGACAAAGCCATTACTCCATGGGAGCTTCCCTCAITA	T/C	GGAGAGTCAACACAGGACTTTGTTCATGATCAAGGGATGCTGATGGATCCCAAGAGAG	0,902
snp_EU678313_434	ATGTGTGAAGTTTCGCTCATAAAGAACTTAAGACCCGGGAAAGTCAAGTCCCAAGATGT	A/G	AAGAAAGCATGCCACTAAGCATCTCGAAATTTGGTACAAACAACCTGTGCTGTGGTGAATTT	0,901
snp_AM858867_164	ATGATTTGGAGTTCCACAGATGACGAGATAAGAGATGAATTAATCAAGTTAGGGTACAGAA	T/G	CATCCCTAGTGAGAGACTCCAAAGAGTTTAAAAAAGATTTGAGAGTCTTATACAACATGA	0,899
snp_AM861357_589	CTCCAGGAGCCGACAACTGGTGGACAGGATGAGCGGTATGAACAAATCTACGGCGGA	A/G	CAATTCACACCTGCCAGCTTTACTGGATCACGCGAAAGACTCTCCAAAGAAATCCAT	0,899
snp_AM857816_166	TACCAACACTGCTGGAGCTCTAAATTTCTGACAGCTACATGTTGATCCGAGAACCCGG	A/G	GGAAGAGATGACGCTAGCCATGTTGCAATCATCATCACAGCGGTAGATCACAGAACAA	0,895
snp_AM859467_518	AATGAACAACAGCAAGTCAGAACAGGACAGACTTGCAGAGAGCAAGTTGTGCT	A/G	GATGAAAAACGGGCAATGAATCTGAAAGGAGCCAAACACAGAAAGACAGGGACCAA	0,895
snp_CU685076_185	ACCAATACACCCGAAAGATAGCAGACGAACTAAAGAGAAAAGAGCTTCAATAACGTTT	A/G	GAGAACACTTCAAAGATGAAGACTTGAATTCACCCAAAATCGAATACCTATGGATAT	0,895
snp_CU997005_286	TGGGTCAGGATTGGGTTTGGCCACACTAGCGAAGACACATCACATGACGTTGA	A/G	GAATGTCAGAGAGGGGGATCGAACTGGTACCTTACCCAAAATGCTAAGGACACTGT	0,895
snp_AM855277_64	TGATTAATAGCGCAGAAAACACTCAAATAATGAGTTCACTGATGAAGCACCAATAA	A/G	CCAACAGGAGAGATGATTCGTTAAACCAAGCAACCCCTGATTTGCCACCGCTGAGAAA	0,894
snp_AM863710_107	ACTGTTGGTTTTAGCAGTTCTGATCAGCTTGGTGGTTACAGTTTGTGAGGAGGAGAA	T/C	GTTGCCAGACTACTAGCATCAAAAATGTACTTAAACAGTATTTAGTGGAGGACGGAT	0,892
snp_AB122064_98	CAAGCCAGCACGCAAGCCATTGGAATAGATCTTGGTACCACATATCTCTGTGTGGAGT	A/T	TTCCAGCATGGGAAGTGGAAATCATGCCAACGATACGGGTAACCGAACCCACCCCACT	0,891
snp_AM864017_329	AAGCTGTGGACATTTGGAGCAACCGAGATTTAGGACTATGTGGGAGAGATACTGCCG	A/G	GGGGTCAATGCTATTGCTATATGTAGTAGTCTGCAGACCATGACAAAGTGAACCCCTCA	0,888
snp_AM854833_563	CACCCACCCAGAAATTTCAACCAGGTTAAACCAGTACGCCAAACTTCCGCAACTC	A/C	AAGGAGTAAACCCCAACCTCAAAACATGCCAGTATTTGAAATCTGGACTTCTCCTAG	0,887
snp_AM855000_65	AAAATCATCTCGATATATCTTTGATCATACGTGACAGTGGACAGCGCCGCAACAGAA	A/G	CTATGGGTGGGAAATTTATCAGAAAAGAAAAGAAAGAAATACTGTACGGAGTTATCTTA	0,887
snp_FP091137_183	TAACTTTGATACGCAGGTCACCTTTCTTACGATATCTTGAGCCCTTTGATATTTCTCC	A/G	ACAAAAACCCAGGTTGCGGCCGTTCTGACAGTAAACGTCATCAGACACAGTTTCAATTC	0,886
snp_BQ427114_118	CTCTGTGAAGAGATTGACAGTTATTTATCGGTTTCAGAACCTCTTCTCCAAGTAGCCG	A/C	AGTGATGGCAACGACCCAGACTATCTCCATACCAGAGCGACAGTGAAGAGTACAAATCA	0,885
snp_AM857996_76	TTGAAGAAATTTCAAAAATGTTGATGTTGCTCTGAAAAGCCGGTCCAGGTTGT	T/C	CTTGCTACTTCTAGTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG	0,884
snp_CU995337_540	CCAAAAAGTGGTCTTCTATCTACAAAAGGCGTAGCAAAAACAGCTGAATAGCGG	T/C	CCAAGGCATCACCTTAGTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG	0,884
snp_AM855102_290	AAACGATTCAGAAAATCTATGAACTGGGATTTTCCAAATGCAATGGAACTGACAC	A/T	AAAGGAAACAAAATGCAATGGAAAGTTGAGATTGAAAACCTAGATTACCATCATCTT	0,881
snp_AM858116_547	GCCCTGAAAAGAGATTGAAGGAAACCGAAGTGGCTACCTAGTGGGGACTCTTTAAC	A/T	ATGGGGACGTCGGCTTCTGGAGTGCCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	0,878
snp_CU990225_417	ATGTGGGGACACAAAAGGACAAAGCAGTGGAGTCCGCTGCAACAAAATAATTTGTCCAT	T/C	GGAGATTTCTTGACATTTGCCATTCACACCCCGAGAAATGAGCGACCTAACCAACGGAGA	0,878
snp_AM859469_105	AAAAAGAACAGACCCCTCCATGGCTGTGAACGTGTATAGTACAAAACACCCAGGCAGCAA	T/C	CTGAGTCGCCATGACATCCTGGCCTGGGTCAAACGACGATCCACAAAATACGGCAAA	0,877
snp_CU682714_339	TGTGAATTCGTGCAATGTTGACACCAACCATCACCGTCAATGATGATGACGAACTC	T/G	GTGTCAATTTCTTCCACTGTTATGTTGCCATCTGCCGTTTTTGTCCATGTTTCCAATGATC	0,874
snp_AM861494_473	GAACATAGAACACGCAACCTTGGATTAAGACTTTAGACTTTGGAGAAACCCAAACCCAAAT	C/G	TGTTTTGGCAATTCATTTTGGAAAACAAAAGAAATGAAGAAACTGGGGCAATGGAGTAGCT	0,872
snp_CU685863_215	ATTTTTCAGTTTCATGTTTATTTGTTATATGCTGTATTTATGTTGAGTTTCTTTTCAA	T/C	TAATTTCCGTTCCGTTTAAATTTCCACAAGTTATATCATAGCAGAGTTTTGTGTTTCCAG	0,869
snp_DV736306_319	GCACGAAAATTTCCATACGTTATGCGAGTACAGCAACAGCTACCCTGTCGGAACACC	A/G	CAGACCGTGACCCCATCTACCACAAAACCATATCTTACCACCAACCCGGAACCTGAC	0,867
snp_CU682177_248	GCCTCCAGGGCCATAGGGGAAATGCAAGTCTTCCCTAAAGACGATAAATCAAGGCC	A/C	TGTCATTTAAGGCAATTTTGGGTTTAAAGCAGGAATGACCCATATTTGAGAGAAAGTT	0,865
snp_BQ427368_404	CACCAACCAAGTCTGGCTAGATTGAAGTGTGGACCAAGGCTCAATACAAACTGGG	A/T	GTGCATCTCTTCCAAAAGCTGGATGAAGCTGCGTGCAGCCACTTGGAAACATCTC	0,864
snp_AM857665_474	CTTCCCATCATGCCGCCAGTGAATATGCAGTATACATCAACAACTGGCAACATC	A/G	CTTGGTTGTTGCTGGGACAGCAAGAGATTCATTCGCTCTTAGTGTTCATAGCTCTGA	0,861
snp_CU989257_270	CGAAAACAACGAAATCATGGAACCTTGAACAACTATGGAACCTAGTACCCAAAGCCCC	T/C	TCGCCATAGTGAACAGCAACAGCAAACTTCGAAAAAGTCCGGAGAAATGCAATCTT	0,859
snp_AM857595_643	CCGGTACCGGTCGGGCTCACGTTTCAATCTGAGCTGCAAGCAGCCACCAACCCGCTGAC	A/C	ACAGCATGTTGTTCTGATGGAAAGCGGAGATATCGGGAATCGAACCCGCTGGAATCGT	0,852

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp_CU995994_511	TTTCATCAAGCACACTCTACTAAATTACATGTAATAAGTAAACAGGTTATCAAAATATTGT	A/T	AAAGTCTCTAAAGACACAAAATGACATAAAATGGAGGGCATTATATATTTTATCTAT	0,683
snp_CU681711_212	ACAGTGTGGAGAGAAAGTCAAAGACTCCAGCTTAAAGTCGGGGAGAGTTCGACTC	T/C	GTGCTCTGACAGGCCAGCCTGAAAGTGCACCCTCGCTTGAATGGCGAAGAAATGACC	0,675
snp_AJ565645_416	AGAATGGCAAGATCACCCGTCTGAGGAGGGAGTGCCTCAACGAGGAGTGGAGCCGG	A/G	GTCTTCATGGCTCCACTTTGACAGACAAATCTGTGGAAGTGTCTGACCTATGTA	0,668
snp_ES789710_308	TTTCATGGACAACCTTTGGGACTCGTACATCTTTAGTGCTTTCAATACTCAATTTTCAT	T/G	AAGAACAAAACCTATTGCTATTTTTTTTTTTCTGCTGAAAAGCAATTAACATTTGAAAAAT	0,667
snp_BQ427174_1095	AAACAGGACCAAGAACTCTCCAGCGTTTCAAACGACAGCGGCATCGTGAGGCCAGAACA	A/G	GAGGCAGAAAGGGTGCACAAAGAAAGTGCACACAGAGCAGAAAAGTGGGCCAATCTTCAA	0,645
snp_AM854177_247	AGAAATTTTAAATTTTAAAGCAATGGCTAGTGTAAATTTTAACTAACAGTAGTTAACAGAAA	A/G	ACATCAATGATTTAGACTGCTTACCCTTAGAAAATGTTACTGAAAACCACTCTCAGGGA	0,616
snp_CU994620_455	TTGTTCCGGTATGGAAAAAATAGTAGTAAATTTTAAAGTTATGACGAGTAAATTTTC	A/T	TGGTCTGAAAGGTAATCAAAATATATGATGGAAGCGCATGCTTTTGTATAAATACCCCGCC	0,596
snp_AM858800_222	ACAACTGTTAAACAACAATGTTCACTTGGTAAATTTTAAAGTTATGACGAGTAAATTTAC	A/G	AGTGTCCACTTACATGTAAAGACTTTAAAGAGAAAAGAAAATCTCTGAAAGTAAAGGA	0,585
snp_AM868845_106	ATTTCTAAATTCGGGCCGATGGCAATATTGAATTTATATCGAAAGAAATATGGAGTAA	T/C	AGTCTCAGACTAAATGTTATAAACAATGCCAACATATCTGACCAAGAGGAGCGAAC-	0,581
snp_CU988101_315	TTTAAATTTCTGATGTTAACTGGATATTACTCGATATTACTCAGTTGGTCTATAT	A/T	TGTAGCTAAATTAAGTGTAAATCTTCAATCTTCAATATGTTGAGCCTCAGTCAAAAACATAAT	0,569
snp_CU987873_518	ACTGGTCAATTTAAGATTTAGCTGAAATTTGGTTTAACTTTAACTTTAGGGTAAATAA	T/C	TCAATTTTGGAACTGTATATGATATATGATAGTGTAGATTGGCAGGACATGACAAAAAG	0,513
snp418_CU995683	TTAATGTA TAGTACGCAATCTAGTCAGTGTGGACCAATCGTAGGGAAAGTTATAGATG	A/C	CGTTGGATGTAACATTTGCTGCCATACGCATTTTGAATACCTTATATAAATTAATATATAA	1
snp618_FU60SJA01B42EZ	GGAGGTCAACAGAAAAGTCCAGAGGATCTGGTGGAAATCTGGGTAGAGTTACTTGGTCCG	T/C	TACCCATCAGTCTGGTCCATCATGACCCAATGAGGAAACAGGAGAAAGGACACTGGAT	0,995
snp466_FU60SJA01C1MU9	GACCTAGGGGGCAA TACGCGCATATCAAAGTCTGTGATCTGTACCCAAAGAAATGTGAA	A/C	AAAGCGGACATCAAAGCTTCCGGAAAAAATAAGAGGAAAGAAATCAGAGGAGAAAGAGGAGGA	0,994
snp440_FU60SJA01A05MIN	GTTGGATGACATCAATAATTTCCGAGCAGTGAATGAAAGTGTATGCTAAATTTTCCAGAA	A/G	AGTTTTCCAGCAGGAGCAGCTTATCAAGTTGCGACCTTACCAAAAGGGGCCAAAAGTGGAG	0,992
snp297_CX739431	CTGCCCGTGGAGCCTCGCTCACGTGCTGCCACAGTCCAGGGCTCGCTTTGTTTAC	T/C	ATTTATGGTAGTGTAAACCCTGTTGGCATGACGACGGAAGAGCCGGTACGACGGAAGC	0,991
snp476_CU683318	GCCTGTTCAAGACAGCCTACAAATTTCCCATACATTTTCCATGATGATTGGCTTTTCAGG	A/G	CTTCATATGCTTGTTCATCTTAACAGGATTTGAAAGTTTCTTAAATAAATCAATTT	0,99
snp629_ES789178	AGGAATCAATTTATGATGTGATTGGAACTCCCAAGTATGGATCTACAACAGATGAAAG	A/G	GGAAATCAAAGCCAGTTGCCCTTATGCCATACAGAGTTAATGGTCAATACATTATGGAA	0,99
snp088_BQ427368	ATCAGTATTTTATGAAATCATGACTTCCCTATCATTAACATGTGGTTACATCAAC	A/T	AAGTGTGATGGCGTGGATGCATGAAAGCTTCCATATGTTAAACACTTTAACATATAGATA	0,989
snp406_AM866923	CTGATCTCATTTATGTAACCGGTAAATGATGGACACAACTTTGCTTGGCCAGAGGCT	A/T	TAAATTTGAGTCTGTCAATTTCAATCTCATAACTATTTGTGTGACGTTGACCTGG	0,989
snp292_CU987286	GTCCCTTTTTCATCATTTACTGTAATAGCAGTCCCAAGCAATCTGGAACACCCCTG	A/T	AGATCAAAACCATATCAGGATATGCCAACTGATAATAGAAACAAAAGATGCAGACATTT	0,988
snp354_CU994465	TTAGCTAAAAGGTTATTTTCTCTTTGAAATAGTAGATTTTGGAAACAAGTTTGGAC	A/G	CATGATTTGACTCACCGTGTGACACTATCTGTGATTAAAGAAATTAAGGTCAATTTGATCTCC	0,988
snp312_FU60SJA02GX6U7	GAAATTTGCCATCTTAGAAGAGAAAGTGTGCTGTCTAACATCTTAGAAAATTTCCCGT	A/T	ACCTCAAAGCAGAGCCGAGAGAACTGTTCCCATTTGGAGACCTCATATGAGGCCAGA	0,987
snp438_FU60SJA01BRIKL	CGATTTGTTATGATGTAACAATATCACAAACGGAGGAGTGTGTTTACAAACATTTGGTT	A/T	AGGGATGTGATTTGCTGAAGGAAAGCTTGTGTAGAGATATAGCAGGTCTATATACGGGTT	0,987
snp132_AM856794	AAATACAGTACTCAGGATGAATACGGAACTGGGCTTACAAAGACAGTGGAGCTAGACAC	A/G	TACCTGGATGACGTCCTCCGTACAGCACAGAGAAAGTTCAAGGTCCAGGTCAAGTCTCTTC	0,986
snp427_CU995796	GATCGGATCAGCACAGCTAGCCTTTGTTTACTCAGGACGAGACGCTTATGTAAGCTC	A/G	GTCTCCAGACTAGTGGGAAACAATGGATGGCAAGACTGGACCGGAAACAATACCCTCAGG	0,986
snp565_CU993288	GTAAGAATTTATCGTTGTGAATAATCCATGATTAAGAAGGATGATTTGTAATGTTAC	A/T	CTTGATAATCGGAGTCAAGCTTGGTCTTGAAGGAGTGTGTTCTTGAATTTCTGTTGTG	0,986
snp574_CU682020	TTTGGAAACATATAATGAACCTTCAAGACATGGAGATCCCGGCAACATTTGACTAGATGC	A/T	GCAGTTGGATATGTAATGGAGAAAGTGGACATGGTGTGTTGGGACGAGAAAGGTTG	0,986
snp274_FU60SJA01AEMFB	ACGATCTGGGTCCTTGATACAGACTACACTACTCACACCATGATCTACTCTCTGCTCGGA	T/C	ATCCTCGGACTGTTTTCATATATCTGACGCATGGATCTTAAAGCCGTGAAAAGGACACTTGAT	0,985

Locus	Sequence flanquante 1	SNP	Sequence flanquante 2	Score
snp482_CU990615	AGCGAAATTCGTGCCAAAAGAGGAGAGGGGAGGCAATCGTGGCCATAGCAGAAA	A/G	AGAAAAAGCCAACTGATGTTACCGGAACCTAGAGAAATGGGCAAGCTCAGAGAACCT	0,985
snp273_FU60SJA01A EMFB	CATTGAGTGGATAATATAGGAATCGAAAAATGCGGAGAAAAAGGAAGCAGTTGGTGACG	C/G	CTACATCCAGATCCAAAATACCCATCTCGACTTGGAGTTGATTTCAAAATCTTGCTCC	0,984
snp334_E5789659	CTACGTCACCGACATCAAAAATCAGGGTCACTCGCGCTCTGCTGCTCCTCTCAGCCAC	A/T	GGTTCACTTGAAGTCAAACTTCAAGGCCAGCAAGAAAATAGTGTCCCTCTCAGAACAG	0,984
snp380_AM858009	TGATGCTTTGGACGCTTGGGACTAAAGAGATATTGTCAGGAGGATGCTATTGCTCA	T/C	GTTGACCTCATTTGAAAAAATCTCAACTACGCCACCATTTAGAAAAAGTGTACGGTACTA	0,984
snp567_FU60SJA01B 7B7M	TTACCTTTTCCAGAGGAGTCCGAACTCAATAAGTGATAAATCTCCAATGGCGTTTGG	A/T	TAATTAAGCCAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG	0,984
snp096_FU60SJA01B XHAW	AGCGGACGATCCACCAGAGAAATCCATAAATGATTTTTTGGAAATCTCTATTTCT	T/G	TGGGTGCCATCTGGTTTTCTTGTGCTGTTATATAATTCATTTGTGTAACTTCATGTTGTA	0,983
snp140_AM860845	GCTAGTTGAAAAAGGAAATTTGAGAAATTTGGGAGGCAATATGCAATGACTTGGCGT	A/G	ACATGTTGAACCTTTTACTATGAATCTCTTGAATTAAGTCTTGGTAATTTTCAGATGTA	0,983
snp187_FU60SJA01B 27Q0	GTTCCAAACCCACAAAGAGAGATGCAAGAAAGGAGGCATACGGTGGGAGATTCA	C/G	CAAAATACCCAAAAATAAGAGCCCAATAACAAGGAGAAAAAAGAGGCTCTCACGTCAG	0,983
snp505_AM858862	TGCAAGTGCATCAAAAAAAGAAAAAGCCAGCGGACTAACGATCGGAACAGTAAAG	A/G	ACGACAAAATGGCCAAACAACTCCAGGCCATTAATCTCTTAACGGTAGCTGTTTTGTTG	0,983
snp066_CU683187	GACATCTTATGTGTGCAGATGAATATCTTGGTTTTTAGGGTTTTGTTGGTACAG	A/T	TAAGCCTGGCTTGAACAAACAGGGAAAAAGAAAGAAAAAATTTTGGTATATAA	0,982
snp067_EW778122	CAGAGACCAGTTTCCACGCTGGTGAGAGGTTGCTCCCTGATGTTGGTAAGATGGG	A/G	ATTGAAATCTCAGTTTTACCATCAAGGACATCAAGCAGATCAAGCAGATGGAGTACCTCC	0,982
snp361_CB617520	CAACATCGTGTCTGCAACCATTAATCAACGCTACTGGAACCTGCATGCTTATGCTGA	A/G	GCTGCCAACTACAAACAAGATCTGATAGACCTTCTCAGGCCGCTCTCTGGGATAGATA	0,982
snp237_AM855591	CTGTAGTGTATATATCGGCTGTGGTGCAGTCCGGTTTTATGAGATTAATGCAAGAA	A/G	ACATGTGGTGAATGTGACCTCTACCCCTACAGAAAATCGGAAAATGCAATGGTTTTAGGC	0,981
snp033_CU989658	AGAACTGGCATCATGAAAGAAAGTTTATTAGCCAGCAGCGTGAAATGATGACACAA	A/G	GAGGAGATCAACAGATTAATACTGAGGTGTCTAAACTGAAATGTTGAGAGAGGAGAAAT	0,98
snp104_FU60SJA01C YZUM	AAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAACGTCGGCGGCGCAGCGGCATGCGTAATAA	A/G	AGAACTAACGAAAAATACCGAATAACGCGTTTTCTGTGATCAGTACTAGATATCGACAT	0,98
snp169_CU987908	ACAGGAAAGGAGCCAGACAGCCAGCAAGGAAACATACACCCTAGTGTAAAAACAGG	T/G	GATGAAATGCTCCTGCCAGAAATGGAGCCCAAGGTTGCTCTGGAGGATAAGGAGTA	0,98
snp445_FU60SJA01B Q1K2	ACCTCTGGGAGACACAAATGTTGGTGGATCTATGAAATTCCTATGCAAACTCTGTAACT	A/G	GGAGGGGATCTGAGTTTTAATCATAGTTTTATTGATCTTTATCAGCTCCCTCATGC	0,98
snp245_AM862902	ATGGAATACCCAGTGGTGCAAGACAGTACAACAGCTAAAGACAGAAATGACAAATGAAGA	A/G	AAGCGACTCTGGATAAGGCAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT	0,978
snp499_FU60SJA01A 69IQ	ATTTAAATGATTTTTAGTTGGGTTTTTATCCATCTGCGTACACTTCTATGTTTTGT	A/G	CCAGCGCATGTTGTCAGATTTATGACTAATTTTGGACTTCGACAAGTACCTGCTGCG	0,978
snp536_FU60SJA01B DPM8	TCTTCCGACACAGGAAAGTGAATATGAAACAGGAAGGAAAGTGAATATCAAAAAAGA	A/G	GATCCGCCAAGAATGGAAGTGCACAAATGTGACAAAATGCTCTGCAGACAGT	0,978
snp250_FU60SJA01A HR83	AGTCTTACTGGCCACAGACACACCCTCTGATGACCCCGCAGTCAATACTATAGCAACCG	A/G	CAGGAAATGGCTGGATCGTAAACAGTGCAGCAAAATGTTGTTATGTCAAGGCATCTGATC	0,976
snp605_AM854527	CCAGGTAACAATGCACCCTGTAGCTAAAGTACTGGAGTTACACAAGTAAGAAAGG	A/G	GATGAAAGGGACTAAAAGTCCCGTGTACAGACGCCAGTGGTGACAGCGGTAGATGC	0,975
snp091_CU990044	GCGGAGTGAATGCGGTGGCAGATCACGAGTGGGTTGATGATGAGGTACCTTAAGGA	T/C	ACTGACCGGTTCAATCCAAACCACTGTCTACAGGCAGTGTAGAGGAAAAACCCCGA	0,974
snp190_BQ427188	CATTGTTATCATAACATTTCAAGAAATTAACCTGCTTCGATGTTTCACTTATCTCTG	T/C	GTGTTCCGATGTAAGTATCCGGAGGAGAAAATGTTGTCCTGTCAAAGCAAGTCTTTT	0,974
snp392_BQ427259	ATAACTTTTGGCAAGTTTCTTCAGAGATTTGAGATTTCTCCCTTTCGAAATGCTCTG	A/C	TTGGTTTCAAAATAATGATGGACTGAGGATTTACAATCCAAATAACTTCGACCATT	0,974
snp648_FU60SJA01A 7KN1	TCAACCATCAAGCTAAGTCAAGTCAAGGAAATGACGATTTGACGATTTGAGGTTTACATTA	A/T	AGGGGCTGTTGACTTGGCTTCCGCTTTTCCACTGATATTTGATGAATTTATCTGCTCT	0,974
snp221_CU681678	GCATATGGTCTTGGTTGGCTCTGGTGAATGACTGCGGTGACGCTAAAATCACAGATAACA	A/G	TACCGGAAAGAGGTTGCTGTTTACCGTGGAGGTTTTCCGCCACCCAGCCCCATGTAG	0,973

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp348_FU60SJA01C 8AUQ	GGCTCCCCACCAGAAACGGAAGACAGTGTCCGGGATGCCCTTCAGAATTTTGACAAGGA	T/C	GGTACTGGATATGTTAGCGCTTCCGAGCTGAGACATGTTTTGACGCATTTGGGGGAAAAAG	0,973
snp561_CB617510	TGGAGGGGATATATCATTTATTCATACTCAGTTGTCAGAGGCTGTGACAGAATTCGTTCC	A/G	GTTGATATTTATGTACCAAGGCTGCCCCCTACAGCAGAGGCTCTCCTACAGCCTTTCTA	0,972
snp184_AM865725	GGATACAGCGGACATTTAACTTCGTCGAGAAACAGAAACAGAAACATGGCTAACCCAGA	A/G	AGAACAGTTGTTGTAGCTATGGACGGTAGTACTACTCTAATTTATGCTTTGACTGGTAC	0,971
snp248_CU999018	TAAAGTGGATGATGCATCAAAATATGTAAGAGAAAAACCCACCATATGATGTTGCAGAGG	T/G	ATTAGTCAAGATTGACAAATGGAATCCGCCATACTTAAATGGATTGATGAAGTCTGTG	0,971
snp328_CX069134	CGGTTTCATCAGCGCGCTGAATAGTACAGTGTGACAAATTTAGGAGAAAAACTTAC	A/C	GATGAGGAGGTCGACGAAATGATCAGAGAGGCTGATTTAGACGGTATGGACAAGTCA	0,971
snp402_FU60SJA01A V7T4	CTGTGTCAGTTCCAGAGTCTGTTGCCGTGGCAAATATGTGGATTGTTATACGGGAGCGGA	A/G	TAACAATGCTACCAAGAGTTATAAATCTTTGAACACTGAGGGGTGTTGAATAGTCTGCA	0,971
snp186_CU994705	AAACTCAGCCATGAGTAAAGACATCGGACCCACTCCAAATGTAAAACAACCTGTGAA	A/G	CAGGTTACAATGTCCCTATGAGAAAGGACAAACAATGGAAGTCTGCCTACAGTGTAC	0,97
snp233_FU60SJA01A 2K37	TGTGACCTTGGTAGTCTGACTGTTGTTGGACTCATCGGCTACTTCTGCTGGAAAGGC	T/C	AAAGTCAAGAAAGAGAAAGTAGAGCCCGAGAAAGGACTTCCACCGACCACTACAGGTAT	0,97
snp640_FU60SJA01B BEXH	CCCCCTCATGAAGATATTGATGCTGAGGAACAGGAACACTGATCAATAACCTTGTAT	T/C	TCGGTGTAAAGCCTGTATGAATGAAATCAATCGGAGCAGGATTTCCGCTGATGTAG	0,97
snp668_FU60SJA01A 97KP	GTTTTCTTTGGACGGAGAAATCAAAAGACTATACACTCCATGTCGGCAGCTACAGGAAC	A/G	GCAGGTGACTCCTCTTAAATFACCCACAATCCAGTTTGCCTGAGCCATTACAACCACCCGGTTC	0,97
snp713_FP002214	GTCATTTACGAGGTTTTGTAGAATGCTTCATGAAAAACGGTAAATGGGTTGTCATGATTTCC	A/T	TTTATGAAATTCAAAAATACCGTTTCATAGCTGTTAAAATATGTGTGCAAAATFACTCAATA	0,97
snp719_CU987495	GGTCAAAAACACTGTCGCGAGACACTTCTGCGGTGAGAACTCTGTCAGTCTTCCACCTT	C/G	TCGACAAACAGCCCTTCCAAAAGCTGTTCAAAAAGCCGAGTCCAAAACCTCGCTGAGCTGC	0,97
snp049_FU60SJA01A R741	AAAGACTGATTAGACTAGGCAGAGATGGGACTGGTCTCTCTAGGACTACGGAGACAAC	T/C	GCAGTGTGTGGGCTCGGACTGTACGCCTGTATGATGTTAAGCTCCACAAG	0,969
snp054_FU60SJA01B 1T18	GTCTAACCCAGCGGTGAGTTACGTTGCTCTACATTTGCAGCTGGGACCGGATTAATCACA	T/C	AACGCTTACTACCTCACACACACAGCGGGAAGCACTCAAAATGGCGGAGACTGGCACCAGATG	0,969
snp057_FU60SJA01B A61B	AATTGAAAGTCAACAGCCGAGCTTCGTTACTGTCTTAAAGAGGAGGAAGTGACAT	A/T	TGTTGCTGTGTCTCAAAAATCCGCGCATTTCAACTTCAATACAGATCTGTTAGCAGAAGG	0,969
snp090_AM866353	GGCATCAACAAAAATAAAGCTAAGCTTGAGAAACGGAAACAGGAAGAGAAAGATGAAACG	A/G	GACCAGTTCAACCGACAGTATCTGGACTTGGTGGAAAAAGCAGAGACTGTATTTCAAAAAC	0,969
snp705_AM854722	TCTTTGTACAGCTTTCTTCTACGTTGAGTTGAGATTGGTTGAAAAGGGGGAAAAAATGCTAG	A/G	CAATGTTGTTGTGTCATACCTTCAAGACTTCTGATACATACATACCATTGAATCTCTA	0,969
snp084_AM866212	GAAAGCATGCTTGAATTAACATGTACATGTTAACAATTTGATGTCATTGCAGTGTGTT	A/G	CAAGAAGAAATGCTGGTGGAAATGTCATGTAATATCCCAATGAAAAAAAATTTGCTCTCCC	0,968
snp603_FU60SJA01A IEKZ	GCGACAGAATATGCCATGAAAAATCAAGCCGCTTATCCCAAAAACATAGCTTCTCATATAA	A/G	CAATGATACGAAAGCGAAACAAAGATGGAATCCTTCTAGTTGTCATATGCTTTAAATGCC	0,968
snp491_FU60SJA01A TGZH	CGTTGAGATGAACGCCATACATGAGTTTCCACTATTACAGAAAAAAGCTGGTATGATACGC	A/G	GTGTCCTCCCTGGGATTTCTACACACTCCGGTACCCTCGCTATGATCTTATTGAGGTCAAT	0,967
snp534_FU60SJA01C LD1E	ACAACGAAATCAACGACAGTAACCTAAAGCAACAAATTAACAAAAATGACTACCTCAACC	C/G	CGAAACCAACAACATGGACAACCAAGCCACCTCAATTAACCTCAACTCCGTCACAAGAA	0,967
snp641_FP005212	ACCAGTGCCTACTACAGAGGAGCCGCTTACTAGTGTACGACATCGGGAACAC	T/C	TAACTGCGAAAAACGTAAGAGATGTTAAAGAACTCCGAGATCAGCGGGACAACAAC	0,967
snp643_FU60SJA01A Q0XL	AGAAAAATGTAGTTCAACCATTGTTAGTAGCACTAGTGTATTCACTGGCAACAGAGAC	T/G	GTCAAAAGCATTATGAAAAATTGATGATATTGTTAACTGTGCAAGATAAGAGGATTGATAG	0,967
snp058_CU995743	AGCTGGGAGAACGGCTTCTCGCAAAATCGCTCGAGGAAGCGCTCCAGTCAAGTGTACAA	A/G	GAGCCAGAGAAATACAACTACCAGATGTTGACGATACGTTCTTGAACCCACACAAAATTC	0,966
snp266_CX069061	TATCATGATCTTTGTACCTGTCCTCCAGCTCAGAGCCCTACCAGAAAAATCCAGACAAGACT	A/T	GTGAGGGAGCTGGAAAAAGAAATTCAGTGGAAAAACATGATGATTTTATTGTCACAGAGGAG	0,966
snp295_AM867758	TTCAATTTGATCTGTGTCAGAACTTTTATATATTACCAGTCTCAATATTGAGGACGT	A/G	ATAAAGTTGAACAAATGGTGAATTAATACGTTGTAGTGTGTTGTCACACTTGTACTGGA	0,966

Locus	Sequence flanquante 1	SNP	Sequence flanquante 2	Score
snp530_BQ426757	GTGCCAGCGCCGAGGCTGTGAGGAGTTGAGAGCCGATATGCAGGCTAAACTGAACTGAG	A/G	CCGAGCAGAATCTTGGGCTGCTAATGCCAAGATCAGTCAACTCGAAGAGGTCAAACTCC	0,966
snp075_EW778595	AGTCCAGCCAGTGGACGGTATAGCCTGTGGTACGATTACGAGAACCAAGTTCAAGCC	A/C	ACTGTCCATCTTCAACAAGAACTCAAGTCAAGTCAAGACCTCAGTGAGAAG	0,965
snp455_ES789146	AAGCATGTGAAGATGCTACATAAAGACTGATAGACATTCAGAAGGAAAGGAGATAGA	A/G	CTTCAAAGAGAAACAATGATGCTCCTCACTTCAAGGACCAGCTGCAGGAGATGAAGCC	0,965
snp572_AM858709	AAGAAACAAATAAAGAAAGATGCAGTCTGGGACGTGAAGGAAATGTAGTAAATATGAC	A/G	TAAACCACAACTCCGTCATACGACGAAACACGCTATTATTTGGCAGCGGTGAATGTGA	0,965
snp614_CU994483	GTTTGTCCACAGATGAAGATGGCAAGACGCTCATGATGCTATTTCCCTTAAAGAACGCT	A/G	CCATATCCCATTCATACAAAGTAAAGAACCAACATCACAGAGAAATACAAAGTTCCACCA	0,965
snp138_EW779134	AACGAAAGATTTGCTGACATTTGACCCGTGAGAGGACCAAGCAGAGGAAATTTCTGGA	A/G	AGAGGACTCAAAGTTAGAGAAATGAATTAATAAAGAAACAACCTTTTCTGACCCGGAAAC	0,964
snp309_AM860572	GGTGGTGGTCCGTGTAACAGCATACTACTGAAAGCTCTAGATCGGATGGGTGAAG	T/C	GTAAGAGTCAGTGGAGTAAATGGGCGAGCAATGAAGAACTGACCTCAAATTTTATGATGA	0,963
snp583_DW713882	CAAAATACACAGCAAGGAAACAACTGCCCCAGCCCTACTCTAGTACTCTGTGTG	T/C	AGGGAAATGCTGCAGAGTCAGACAAAACCTGACTGAAAACACCTTGAACACTAGCAAAACT	0,963
snp355_CU994465	TGCTAACITTAACACATCTGCATAGACCAGTCAITTTTCTCGTGAACAACATTTCAACC	T/C	CAAGATCCCAAAAAGGGACCTACAGTATGTACCCTGATCACTTATATTTGAAAAGTAAAACA	0,962
snp390_FU60SJA01B GLV5	ATTGGTATATCCGACATGATAGAGGAAAGGCAGATGGATATACACCTCGAATCAAAAACGTC	A/G	TACAAGTGAATGGATGGAAATCCAGGGAAACCGGACGGACACACCAACCAAACTGCGTA	0,962
snp525_FU60SJA01A RFGT	AAGAAAATGCAGATTTGGTGAAGGAAAGTTCAAGATTGCTCCTCAAATTAAGAAAAAA	A/T	AATGGAAGACGGATCAATGATGGATATATCCTCTTACAACAAAAGGATACGTCAA	0,962
snp346_FU60SJA01A H7EW	GTACTTTCTCAAAGTCACCATCATGACATTTGCTTTAGCTGTGGATAGGACCTTTGATTTG	A/G	TTGATTTCAACCCCAAGGACGGTAACTACAATACCAGGAGCTTAGCATGGGATTCGATT	0,961
snp069_CX069262	GTGACTGGAGCCATAACTTGGGGCGAGTGGTGTGATTCAGCACCGAGAGACATCC	A/G	GGTCACTTCGACATTTACACATCAAGGACTCTGTGGCCACACATACGCCCCAGATTTG	0,96
snp441_FU60SJA01D 7OEP	ACATTAAGGACACGTGTGGCTGTGGAGAAAGCTCAATGTATGACCCATATATTTGGGATT	T/C	TCTGTGATATGCTGTGAGTGTGGATTTTCTATCCGTTTGAATGTGATATATGTAC	0,96
snp512_FU60SJA01A Q6QN	AAGCTCAGAAAATGATGAAAGATTGCGAGATTTTCTAAGCTGTGGTCTCCACACTCT	T/C	TTGCTTTGTTTTGTTGAACTCGGTCAGAAACTGTCCGTCCAGAGAAAATCCGTTTACA	0,96
snp621_AM854967	GAAAAATCACTCGCTTTTCAACTGGCGACTTTGAAACCCATAGGAATAGGTTTATGTA	C/G	ATCAGGGCATCTTTTAGTTTGGCTGTATAAATCAAAAAGACATTTCCGGGAAAAGTTGTC	0,96
snp690_FU60SJA01A 613X	TACTTTGTTAAITTAGTGAAGAGAAAGATCCCTGATCCTTATCTATTCTCTGGTCCAAAGGA	T/C	GTGCTATGTCAATTAAGCTGTAGATCTAGTTGTATGTGAAGACTAGTGGGCGAGATTAT	0,96
snp379_AM861877	ATTTGTATATAATTTATGACGGAATAATAAATCGACATTACGGATAACGGCCCTGCT	A/G	TCGTAAGATGGCAGGTTTTTCTGTAGATAATTTTATTTGTTGCAAAAGTGCCTGCTTTT	0,958
snp558_EX151535	TAAATTAACCTGTTACTGTTTGGGGGGGGTCTAGATTTTCAATGAGGATTTACTTTGA	A/G	ACCAAAATTTGATGCTGAAAATTAACCATATCCAGATCTGAACAATCCGTCCTTACAAA	0,958
snp029_CU984277	TGTGATATGACGCCAATTTGAAATTTCTTTTTAGAGATTCATTTTGGTATTTTTA	T/C	TGCATATCCGTCCATGGAACCTGACTTAGGTTAAAAAAAACAAGGATCTTTTTTTCGG	0,957
snp072_CU987877	GAATGGTCTTGAATGCTGCATTTTGGACTTAAGCCCAAGCCCTCTCAGGCCACTTG	T/C	GTGCTGTAAATGGTATCCACTCTGACGTAAAGTCTGTACCCAAAGTCCACCTGTCCA	0,957
snp285_AM857413	GCTGTCCACGGCCCAAGGCTTCAATCAAAAACCTGATTTGTTGCTTTAGCTAGCTGTC	T/C	CATTGGCTCCCATTTATAGCTCACAGGAAAGCGAGGAGAAAATCCAAAATCCAGACGAT	0,957
snp631_CU685657	AATGACCTTGGACAGTGAAGATTTGTAAGATGTTCAAAGGAGAAATGAAAGCAGTGTG	A/G	GCTTTCAATGTCGGGAAAGTTAAAGATCCAAAGGCGATATGGGACTGGCCATGAAGTTAGA	0,957
snp503_EX956381	AAGCAATTAAGTAATTTAGCGTAGAATGCATATAGGGTTGAAACTCATTTTAGGTAATA	A/G	AACTGCCGTTTCAATCTCAAAAATCCGAAATCAAGTCAAAAGTATCGATTATATGTAC	0,956
snp562_FU60SJA01A YNVA	TTGGTGACAAAATGTCCTATCTTTTAGATTTTACTATTCATACATGAAATCGTGAGT	T/G	TGGCGGATGTAAGAGCTTTTTCATTTGGCTGTTGTAGGATATCATAGCCTGTACAGAAT	0,956
snp070_AM856912	AGGAGGAGAAAGCAAGGAAAACGAAATCCACCAAGGAGGAAAGGAAAGCAAAAGTAAAC	A/G	GAGGGAAGCAATCGCCGAGATGAAAAGCGCCCATGGATGGATATCCTTCGAAATGTGC	0,955
snp227_AM855775	TACTACGACAGCAACGGAGTCTGATATATCTGGACGACTTGAACATTTTACGTGTTT	T/C	TGGCCACTTTGGTCTGTCCGTGATGGTGGCTTTTGTAGCCTGTTATCATTTTGAGGCGC	0,955
snp464_FU60SJA01A DWIC	ATTGCAGAAAAAGTTAGAAAGATCCAAAGGCTGAAAATGAAAGGAAAAGGGCAAGCTAG	C/G	CAATTTAGCAAGCAGAAAAGACATCGAAGGAACTCAAGGAACTCAAGGGGTAGTAAACTCG	0,955

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp098_E5789122	GAGCTTGATGAGGTATAATGATTTACTCTAGACCTATGACCTGACTGCACTGACTCC	A/G	CCCTACAGTGGAGAAAAATCTATTTCTGCTGCTGACCTGAAACCCAGCCAATGGAACC	0,946
snp116_AM853761	GACTCAGCAAGACTTTCTAGACCTGGTAAATGAGAGCAACAATGATAAACAATGACCA	T/C	CATTTACATGTAAACAACAATGTGAAGCTCATGTACTGATGGTTTGAGTTTTCATG	0,946
snp433_FU60SJA01A194Q	GCCATGTCTTATGGTGGTCTCCCTGTTAGTTGGCCCTCGTACTGCTGTTCTGGCT	T/C	TCCTGGTGGTTGAGTTGTTTCTTTAAATCACGAGCTTTCAATTCGTTCCATACCCAA	0,946
snp468_CU988734	TATTTCTCTTTATGTTAGGGATGCTCTGCTTGTGCTACTACACAGGATTAATTTTTT	T/C	TGTGTTAAACATGTCGCTCCAAGTTTGATACAGAGGTGAGATTTGACCATTTGCACATCT	0,946
snp015_FU60SJA01A5479	TACGGTTTTGCGCCACTGCTGATAAAAAACAATAAGAGTGTGATTTTTGGAGAGTTTGA	T/C	AGCTACATGAGAACAAGTCATCTACAAACAATGTCTGATTCACAGCTATAACAATGATATTG	0,945
snp656_AM858965	GACCAGACCTGAGCCCTAGTCTGAGGGTGGGGGAAACAGTCTACGGTCAACAG	A/G	AGGAGAAATATTGATTGTGATGGGAACGCTGAATGTGATATTGTCAGCTGTCCTAAATG	0,945
snp694_E5789681	TTTTACTGGATTGATATTTATGGTGTGGGTCTGCTGATGTTGGTTTTTCAGATT	A/T	ATGCCATAGTATCTACTGCTAAATGAGAAAAAGAGTTATTTGGCCTGCTTACTG	0,945
snp724_AM862897	AATTTACAGACATCGAGTTTGGCTATCTAGAGTATGCTATCACAAAGTTCGATGGCTATTT	T/C	GCAAAAAGAGTCCAAATAAAGGGGAGAACTCATCTAAGAAAAATCCCTCGCACCAAGT	0,945
snp040_EW779377	ACTGTTGTTCAAGCCAAAGTGGCCAAAGGAAAGAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA	A/G	AATGTCCTGCGCAATGATGATACCTGGATACACAGGAAAGGACACACCACTCAAGA	0,944
snp173_CX068872	GTACAGCAGACCCCTGGCCCAAGGGGAACTACTGCATCGCCAAAGATTTAACTGTCCCTC	T/C	GGATTCAGCACCCGGATATCACACTGGGATGATGAAGATGGTAAACAACGAGAACAGTCA	0,944
snp198_AM858364	AATGTTGCTCATCAAAAAATCAAAACAGCGTAAATGTGGCGAGTACATCTGACTTCA	A/G	TCGTGTCATCTGAATCTGTTAAATTAATGACTTGATGTTTTCTGCTTCCGTGACACAAA	0,944
snp282_AM860809	GTTGATCTTTAAATTTGAAAGTTAATGAAGACATTCATAGCTAGATGTTCTGTGTTAC	T/C	GAATCTGTGCAAAATGGATAATTTGCATGATTTTTGTATATTATAGTCTAAATTAGACAA	0,944
snp042_FU60SJA01A16QQ	ATCATGAATTTATTCGATTAAGAAAAACAATAACACGTCAACAGTATAAAGGGAGTCGCATT	A/G	CAAGACTAGTCTAAATCGAAAAATCGTTGTGATATATCAITCTCTGTGAGAAAAATC	0,943
snp045_CU685096	GAAAGAAACAACAACCTGAGGAAGTTCAGGCTGTGAGACACAGAAACCAAGAAAC	A/C	AAGCAAAAGGAGTCAAAAGAGTGA AAAACGGAAAGAAAAGAGGAGGAGACCACC	0,943
snp542_BQ427103	TTGAATTTGGAGGTTATTCCTGATGTTGGAGAGAGGCTGCATCTTAGAAGTGTTC	T/C	TAGTAAACATCAAGCAAGCTTTTCGACAAAGAACCAAAATCTAGTAATCTCTTATTTGGACG	0,943
snp709_AM862331	GTTTGTCAACTGCTCCGGGACTCTAAGATAAAGCCGACAGTAAAGAGTGTTCATTCATC	A/C	AGTCCAGGAGAGGGGATCTGTAAGATTGCCAAAGGAGTGAACGCCGACCTGATTTATC	0,943
snp175_FU60SJA01B0YCN	TTTGATCCTATTATGACGTCAACAACATGCAAGAGAGGAAATGACAAAACGTTGAAACA	A/T	CGACGCAAGCAGTGACAAAAATACTCCGCAAGCTGTATCAGTCGCAGACAAATTCACAG	0,942
snp195_AM867738	TACAAATGAACTATGTTCCAAAATATACTCAAAAAGCTATGCAGATGGGATTTATTCATCA	A/G	TCCTTTCTTGAAGAAAAATTCAGTCAATTTATTTCAAATATGTTTTCTGACGGAAAGTATG	0,942
snp298_EW777395	GTTTCCAAAAGTTGAAGCCAGGATTTCTCTGACGCAGAGAAAGAAATGGAAGATGATGA	T/C	GACTTCTTCAAGAAAGTGCATGCATGGTGGCCACATGGCAGCTGATTTGAAATACCC	0,942
snp579_BQ426980	ACGCTTTGTCAGAAATGGTGTGTTGGATGAAGGCAAAATGAAACTGATACGTTGCTGGG	A/T	TTGAAACTGGAAGACTTCTGGAGAGAAAGACTGCAAAACACAGGTTCAAACCTGGGCTTT	0,942
snp470_EW777685	TCAGCCATTGAACAAGATCGACACCTTGCAGATCAAGGGTGTGCCGATTAACCTCAAGT	T/C	CGCTTTCAGTAATGACGTAATCGCCAGACGACATCTGCTCCGAAACGTTAGACATTAAT	0,941
snp549_AM854538	CATGGAATGTAGGGAGGTTGATGGACGCCCTTCAAGTATATCCACGACGTGGGAGG	A/G	ATCGAGAGTAACGCTGTTACCCGTACAAACCCGCGGAGGAAAAATGCAAGTTCAACAA	0,941
snp584_BQ426822	ACGTAACGGCAGAAAAAAGAAAATTCGAGAGAAAGCAAAAGCCAGTAGAATCCAAAAGACAAA	T/C	CAGAAAAATGAAGTGAAAAAGAAAAAAGAGGTAGAAAAGAAAAAGACCAAACTAAAAGTACC	0,941
snp692_FU60SJA01A0R68	ACATAACCTTGTAAAGGAAAGGAGATAACTTCTGGTTTTGGAAGAAATCATCAACAT	T/G	TAGTTATTGATTTGACAGTGTGCAAGTGTGCAAGTGAATGTTGACAGGGGAGATTCATATAT	0,941
snp695_FU60SJA01A20ZA	ACTGGAAACGAAAGGCAAGCATGACGATGACACGACTGGCCATCTGTGGAAGTTACTCAT	A/G	GTGAAGACGATAAAGAAACTGGCCGAAAAATAGTGAGAATACACTGTCAGCTTTATGAA	0,941
snp321_FU60SJA02F4RH4	CGGCGTGGTAAATGTCATGGATAGGAAGTTCCAACTATTTGATTGTCCAGAGAAAAGGA	A/T	AGCAGAGAGAGCGTATTTCAACACACCCGCTCCCGCCACACGATCGGTGCCGAGCAGAG	0,94
snp180_AB122067	ACGGCGAAGCAACTCTGCTGATCGGGGAAATTCCTTCTTTGTCCTGGATCTTGGC	T/C	TTGACATTTTCAATGGTGTCTGAGGGCTCCACTTCCAGTGTGATGGTTTTGCCAGTCACT	0,939
snp166_FU60SJA01A87N6	TTTTGCTGGTATCGTTTGTACTAGCAGCGTTATGGCTGATAAAGCAGCAAAACATCAGACA	A/G	TAAACAAGAGATTACACTCCACAATTTGAGAAATTACTTTAGAAGTAGGATAGATTTC	0,938

Locus	Séquence flanquante 1	SNP	Séquence flanquante 2	Score
snp586_E5789600	AAGCATCAAAATGAACAAGTCCAGAAAGACCCGGGAGACTAACAGGACGGCCGAGGAAAGC	A/T	TTCAAGAAAGATAGGGATACCCACAGCCCGGGGAGAGTGGGAGAAAATATGCAGAA	0,938
snp290_FU60SJA01C USQE	AGTGCTTCAGCAACGTAACAGCACCAACAATTAGACGTCCTCAACACAGAATCTCCTT	T/C	TTGTCCACTGGAGAGACCGCCATTAGTATGGCTCCGGCGGTGAAGATGAAGCTAGCCATC	0,937
snp342_AM867465	AAGCCAGATGGATCAGATGTAAGACTGTAATTCACGGTGTGACGACAGTGAATAA	A/G	AGAAGCAGAAAGACCAATTTTGAAGCGCAAAAGATCGGCTCTTTGTCATTACACGAAA	0,937
snp671_FU60SJA01A 6DJF	GTCCATGCTAAATCCTGGAAAATGGAGGACACAGACAATCTGATTGCTCAGAAAAGTGC	T/G	GAGATCAACCAATGCAGGAGATGTAACCAAGATGCAGGCCCACTACAGACCAACCC	0,937
snp582_AJ547618	CATTTCATCAATTCAGAGACATTTAAAATTCGGCAACGCAAAATATAAATGATGAT	A/T	CAGAGACTCTATTCGAAAATTCCTTGTACAGATTATTTATTTTGTATTATAATGT	0,936
snp673_FU60SJA01A T3ZD	TGGTTACCAAGGCAACAGCTACAACACAGAGAAAATCTGATACAACAATCGAGGAGG	A/G	GGGTACAACAGAGGGGGCTACCAGCAGCGGCTCTTCGAGTGAITTTGAGGACATGGCTGT	0,936
snp320_AM862409	TTTTTATTAGGGAGACAACTTACTATTCATATTTATCTCGATTTGCTCTGAGT	A/G	TGAGGTGTTTGGGTGAAATTTATCCCTTATTCATCATGTGTTCTTTGTAGATATGAAAAT	0,935
snp531_BQ426757	TGAGGCTGCTAATGCCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG	A/G	ATGGAAGACCTGGTTATTGAAGTTGAAAAGAGCCAACTCCAATGCAAAACAACCTGGAGAA	0,935
snp607_CU682656	TTCAACAATACAGTCTGAAAGCAACCTTTGAGACATCTCACTCATGAGAAATCACAGGT	A/G	GTAATAATTAATTTAGCAACGACATTTCCAGCTGTCAAAATCATAGAATTTAGCCATAAATC	0,935
snp270_EW779445	CTCCTACAGATAAGACAAAGAAACAGGCTTGAGAATGGTAGAAGGTTTCGAGCAAGA	T/C	GATAAGCAAGCAAGTGGTGGCTGTGTTTGTCTAAAAGAAAAGTTTATGGAGAAAAGTCTC	0,934
snp630_CU685657	GCTGACAAGAAAAGCTCGGAATACACAGGGAACTTCGCCATTGATGACGAGGTTCTGAC	C/G	AGTGACAGGATTAATGACCTTGATCAGTACGCCCTGGGTCCAGGTAGTACCTTGCCTCCCT	0,932
snp288_FU60SJA01B 0232	CGTGGAGTACACCCAAATCTGCGATGAAGTGGAGTCCATTTTACCITCAAGGAGCTAGA	A/G	AAGGCACCGCTCCAGGAGGTTGGTCCCATTTCAAAACCTCCAGAGGAGTGGAAAGCAAAAATGC	0,931
snp645_BQ426333	TACTCCATGGGTGGATCGAAAATGCTAACTACATTACAGTCAATGTTGAGACTGAAAAGGC	A/C	ATTGGAGATGAATACACCACACTTAAAGGTGTACAAAAGCTTTCAGGAACTGAGAGAGAA	0,931
snp035_FU60SJA01B 4HRR	AAGATGTCATAAAGCTGGATGAAGAAAGAGGAAGACTCGAAGGAAAGACCAAGAAAC	A/G	GAAGAAAAGACAGAAAACAACAGCAGAGGACACTAAGAAAAGACAAAAGAGAAAGAAAA	0,929
snp194_AM857828	TGAAGGAAATGAAACAATTTACAGTCAATTTCAAGTGAACAAATGCAACAGACTTTGGTGA	A/G	GAAGATTTGAAATCGGAGGAAAGGTATGCCACACATGATGCAGACCACCATTTATTGTA	0,929
snp303_FP000183	GCAGAGGAACTGAAAAAGCAACAAGAGCTGAGGAAAAAGAAAGCTGAAGAAAGAGG	A/G	AAAGAGAAAAGCTACAGAAAAGCTGAAAAGGAAAGCTAAAAGAAAAGGCTGAAAAAGAA	0,929
snp283_E5789127	CAAGAAATCTACTACTCTGGAGTGAACCACTTCTGATCTGAAACATGAAGAGTTTGT	A/G	AAATACAAATGGCTGAAGAAAGCTCTTTAAAAGATGGAGGATTTCAAGCTACCTTGCCT	0,928
snp333_GT0533596	GCCGACCGGGGACTACAGCTTCTGGCTGGAAATGAACGAGTATGGAGACATGACCAA	T/C	GAGGAGTTCCGTAGTACCATGAACGGCTACAAGATGAGGAAACGGCACTAGCCCGGATC	0,928
snp156_AF075688	CTTCACCTACCTTGACACCACTGGACCCCGTCAATGTCATCCACAATCAACCTAGT	T/C	GAGCAGCATCCAGGACTTCCAGCTCCACTACACTTCCAGAAAGCTGTTGTTGTACAG	0,926
snp217_CU991986	CTGTTTATTGACCTATAGCTGTGATCATATCATGTTGTTGACTGATCAAAAATCAGGGTAGAA	A/T	GTCTAGTGGCCTAGGGGTACACAACAAAATAAATGGTTTACAACCTGTGATTTTATTACACCG	0,926
snp487_AM866663	CTTATTTCCCTTTGTAATTTTGGGAAAAAAAACAATAATGATTTTCAGGAAAAAAAATTAAT	A/G	CTGTGTGGATTGAATTTTATTTGTGGATTTTGCACGTTTGTAGTATCATTTGTAATAATA	0,926
snp725_FU60SJA01A P0LO	ACACAAATTTAGTCGCCGATAACTTAATGACAAAAGACTATCCAGCATCAAGGCATGGCA	A/G	AAGGAAAACACTACCACAAATCCATGATGCATTTCAAGGAAAACAAAAGAGCTTGAGGAAGG	0,926

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

1. Article soumis

Flahauw, E., Quèllec, S., Davenel, A., Dégremont, L., Lapègue, S., Hatt, P.-J., 2012. Gonad volume assessment in the oyster *Crassostrea gigas*: Comparison between a histological method and a magnetic resonance imaging (MRI) method. *Aquaculture*, 370–371, 84–89.

2. Article en préparation

Lapègue, S., Harrang, E., Heurtebise, S., **Flahauw, E.**, Martins, F., Gayral, P., Genestout, L., Barbotte, L., Haffray, P., Klopp, C.. Development of SNP genotyping arrays in two non-model shellfish species – en préparation.

Flahauw, E., Lapègue, S., Quèllec, S., Davenel, A., Quillien, V., Fabioux, C., Hatt, P.-J.. Temporal monitoring of the gametogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, by Magnetic Resonance Imaging (MRI) – en préparation.

Flahauw, E., Heurtebise, S., Boury, C., Hatt, P.-J., Lapègue, S.. Detection of QTLs for reproductive effort in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* – en preparation.

Gagnaire, P.-A., **Flahauw, E.**, Dégremont, L., Heurtebise, S., Cornette, F., Pontreau, B., Martins, F., Bierne, N., Lapègue, S.. Detection of QTLs for survival to summer mortality in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* – en preparation.

3. Présentation orale

Flahauw, E., Hatt, P.-J., Davenel, A., Quèllec, S., Heurtebise, S., Dégremont, L., Lapègue, S.. Temporal monitoring of the gametogenesis in *Crassostrea gigas* by Magnetic Resonance Imaging and detection of quantitative trait loci (QTL) for reproductive effort. *Physiomar 12*, Santiago de Compostela (Spain), 4-8 sept. 2012.

4. Poster

Flahauw, E., Davenel, A., Quèllec, S., Quillien, V., Dégremont, L., Lapègue, S., Hatt, P.-J.. Evaluation of the gonad volume throughout Magnetic Resonance Imaging in *Crassostrea gigas* and comparison with the histological method. *Physiomar 12*, Santiago de Compostela (Spain), 4-8 sept. 2012. (voir page suivante)

Evaluation of the gonad volume throughout Magnetic Resonance Imaging in *Crassostrea gigas* and comparison with histological method

Emilie FLAHAUW¹, Armel DAVENEL², Stéphane QUELLEC², Virgile QUILLIEN³, Lionel DEGREMONT¹, Sylvie LAPEGUE¹, Philippe-Jacques HATT¹

1. Ifremer, LGP, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France
 2. Irstea, IRMFoood, 17, avenue de Cucillé, 35044 Rennes Cedex
 3. Ifremer, UMR LEMAR, 29280 Plouzané, France

Email: emilie.flahauw@ifremer.fr



Introduction

Biological parameters of the cupped oyster *Crassostrea gigas* such as growth, reproductive effort (duration of the gametogenesis, date of spawning, and fecundity) differ widely among oysters in the same location. Furthermore, most of the traditional methods, like histological observations, could lead to large variability on the observations and the measurements of these traits, and large uncertainties on their changes over time. These can be drastically reduced by using Magnetic Resonance Imaging (MRI) which is a non invasive method allowing to measure the same individual during its development.

Materials & Methods

- 300 oysters observed for 6 MRI sessions (fig. 1A):
 - 5 during gametogenesis (April, May, June, July, August)
 - 1 session after gametogenesis
 - Gonad area and volume estimated by number of voxels in grey levels higher than 166
- 40 oysters sacrificed for histology after 3 MRI sessions (fig. 1B):
 - 10 in April,
 - 10 in May,
 - 20 in June.
 - Gonad area measured on histological slides by number of pixels composing gonadic cells

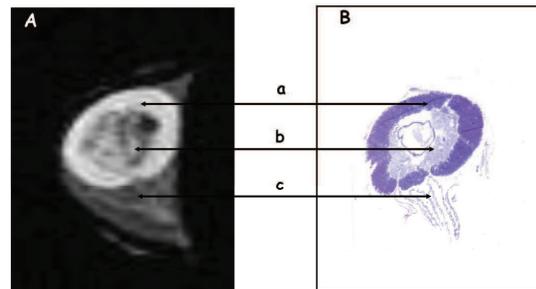


Figure 1: Sections of one oyster by MRI (A) and by histology (B). Gonad (a) appears in higher greyscale on MRI slice and in dark purple on histological slide. On both pictures, visceral mass (b) and gills (c) can also be observed.

Results

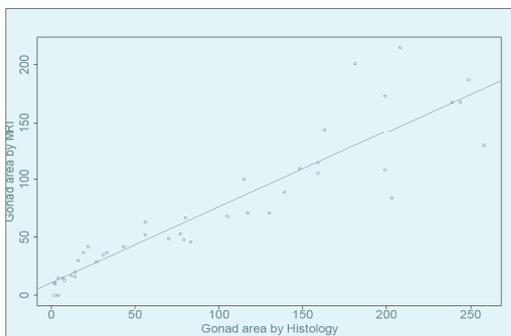


Figure 2: Gonad surface on histological slide and gonad surface by use of MRI.

This highly significant linear relationship between the two methods ($R^2=0.84$) allows us to use MRI instead of histology to monitor reproductive effort of oysters.

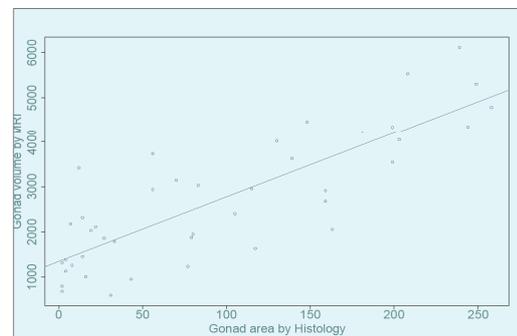


Figure 3: Gonad surface on histological slide and gonad volume by use of MRI.

This highly significant linear relationship between the two methods ($R^2=0.68$) demonstrate that MRI is appropriate to assess the reproductive effort of Pacific oysters.

Conclusion & Perspectives

MRI is a non-destructive method which makes it possible to assess individual evolution of reproductive effort and to compare individuals with a precision level as good as with traditional and destructive method of histology.

However, it remains to reduce measurement uncertainties due mainly to the voxel size: a voxel might contain gonadic and somatic cells (eg vesicular cells). This can therefore lead to an overestimation of gonad volume.

Results from this study will allow us to try to detect parts of the genome (QTLs) correlated to reproductive effort of *Crassostrea gigas*.

ABSTRACT

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is a major aquacultured species whose production represents an economic interest at worldwide, european and french levels. However, this species undergoes summer mortalities recorded from the beginning of the 20th century and, since 2008, this phenomenon increased and threatens mainly juvenile oysters. Aquaculture production of oysters suffers consequences of mass mortalities, that's why this phenomenon has been studied for many years. In France, the bacterium *Vibrio splendidus* and the Ostreid virus Herpes Virus 1 (OsHV-1) are often associated with mass mortality outbreaks of juveniles oysters and it was demonstrated that selected individuals for resistance to summer mortality were able to slow the increasing in viral load OsHV-1 in their tissues and then to decline it. These same individuals also present a lighter reproductive effort than individuals selected for their sensitivity to summer mortality.

In this context, this study aimed to improve the knowledge of genetic architecture of reproduction of *C. gigas* by identifying some regions of the genome called QTLs (Quantitative Trait Loci) involved in reproductive effort and highlighting possible genetic relationships between reproduction and survival; QTLs involved in survival being already detected.

To characterize the reproductive effort, it was necessary to develop a set of new tools. From a biological point of view, 21 F2 families were produced from lines selected for their contrasting response to summer mortality. From a molecular point of view, new SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) were developed to increase density of the genetic map already available for *C. gigas*. On a technical point of view, Magnetic Resonance Imaging (MRI) allowed to observe the gametogenesis of 300 individuals of the same family F2 during eight sessions over two years while previous studies were limited to a one-time observation because of the conventional methods of observation of gametogenesis leading necessarily to the death of the animals. A strong correlation was found between observations by MRI and observations by the conventional method of histology.

In addition to the estimation of gonadic index (index traditionally used to characterize the reproductive effort), MRI also revealed individual variations in kinetics of gametogenesis and differences between males and females, the sex being identifiable on MRI images. In parallel, 300 individuals from two F2 families were sacrificed to estimate the gonadic index by histology. This approach enabled the detection of QTLs involved in many gametogenesis traits.

Individuals from the three families characterized for F2 reproductive effort were characterized for survival during a summer mortality outbreak. This study was able to detect QTLs involved in the trait "survival." These QTLs correspond to some of those detected in a previous study. In addition, these QTLs are often collocated with QTLs involved in reproductive effort. Although the reproduction of the Pacific oyster is a complex trait to follow, the new tools used in this thesis allowed acquiring new knowledges. The sequencing of genome of *Crassostrea gigas* and Next-Generation Sequencing technologies may be able to help to refine the detected QTL regions.

Keywords: Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, summer mortality, survival, reproductive effort, Magnetic Resonance Imaging, histology, microsatellites, SNPs, Linkage mapping, QTL detection.

RESUME

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est une espèce dont la production aquacole représente un intérêt économique tant au niveau mondial qu'aux niveaux européen et français. Cependant, cette espèce subit des mortalités estivales enregistrées dès le début du 20^{ème} siècle et, depuis 2008, ce phénomène s'est amplifié et menace essentiellement les huîtres juvéniles. La production aquacole d'huître creuse subit les conséquences de ces mortalités massives ; c'est pourquoi ce phénomène est étudié depuis de nombreuses années. En France, la bactérie *Vibrio splendidus* et le virus Ostreid Herpes Virus 1 (OsHV-1) sont le plus souvent associés aux épisodes de mortalités massives d'huîtres creuses juvéniles et il a été démontré que les individus sélectionnés pour leur résistance aux mortalités estivales étaient capables de ralentir l'augmentation de la charge virale en OsHV-1 dans leurs tissus puis de la faire régresser. Ces mêmes individus présenteraient également un effort reproducteur plus modeste que des individus sélectionnés pour leur sensibilité aux mortalités estivales.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte et a donc eu pour principal objectif d'améliorer la connaissance de l'architecture génétique de la reproduction de *C. gigas* en identifiant des régions du génome ou QTLs (Quantitative Trait Loci) impliquées dans l'effort reproducteur et de mettre en évidence d'éventuelles relations génétiques entre survie et reproduction, des QTLs impliqués dans la survie ayant déjà été détectés.

Afin de caractériser l'effort reproducteur, il a été nécessaire de développer un ensemble de nouveaux outils. D'un point de vue biologique, 21 familles F2 ont été produites à partir des lignées sélectionnées pour leur réponse contrastée aux mortalités estivales. D'un point de vue moléculaire, de nouveaux marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont été développés afin d'augmenter la densité de la carte génétique déjà disponible pour *C. gigas*. D'un point de vue technique, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) a permis d'observer la gamétogenèse de 300 individus d'une même famille F2 au cours de huit sessions réparties sur deux années alors que les études précédentes étaient limitées à une observation ponctuelle ; les méthodes classiques d'observation de la gamétogenèse entraînant nécessairement la mort des animaux. Une forte corrélation a été mise en évidence entre les observations par IRM et par la méthode classique de l'histologie.

En plus de l'estimation du rapport gonado-somatique (indice traditionnellement utilisé pour caractériser l'effort reproducteur), l'IRM a également permis d'observer des variations individuelles de la cinétique de la gamétogenèse ainsi que des différences entre les mâles et les femelles ; le sexe étant identifiable sur les images obtenues par IRM. Parallèlement, 300 individus de deux autres familles F2 ont été sacrifiés pour estimer le rapport gonado-somatique par histologie. Cette approche a ainsi permis de détecter des QTLs impliqués dans de nombreux traits concernant la gamétogenèse.

Des individus provenant des trois familles F2 caractérisés pour l'effort reproducteur ont été caractérisés pour la survie à un épisode de mortalités estivales. Cette étude a permis de détecter des QTLs impliqués dans le caractère « survie ». Ces QTLs correspondent, pour certains, à ceux détectés au cours d'une étude précédente. De plus, ces QTLs sont parfois colocalisés avec des QTLs impliqués dans l'effort reproducteur.

Bien que la reproduction de l'huître creuse soit un caractère complexe à suivre, les nouveaux outils utilisés au cours de ce travail de thèse ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances. Le séquençage du génome complet de *Crassostrea gigas* ainsi que les nouvelles méthodes de séquençage pourront peut-être permettre d'affiner les régions QTLs détectées.

Mots clés : Huître creuse du Pacifique, *Crassostrea gigas*, mortalités estivales, survie, effort reproducteur, Imagerie par Résonance Magnétique, histologie, marqueurs microsatellites, marqueurs SNP, cartographie de liaison, détection de QTL.