

Conseil International pour
l'Exploration de la Mer

C.M. 1981 / F : 45
Cté de la Mariculture

ETUDE ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES DU MUSCLE ADDUCTEUR DE
L'HUITRE JAPONAISE CRASSOSTREA GIGAS (THUNBERG)

Y. PICHOT et P. PICHOT

Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, 1 rue Jean Vilar, 34200 Sète
(France)

Résumé

Cette note rapporte les premiers résultats d'une étude des protéines solubles du muscle adducteur de l'huître Crassostrea gigas (Thunberg) réalisée par électrophorèse. Un polymorphisme existant au niveau d'une fraction de mobilité moyenne est mis en évidence. Il répond à un déterminisme génétique : l'hypothèse d'un contrôle héréditaire invoquant deux allèles codominants est en accord avec la loi de Hardy-Weinberg.

Summary

The adductor muscle proteins of the Japanese oyster, Crassostrea gigas (Thunberg) were studied by electrophoresis. The protein patterns reveal a polymorphism located on a fraction of intermediate mobility. This polymorphism seems to be genetically controlled : the hypothesis of a hereditary control by two co-dominant alleles is in agreement with the expected Hardy-Weinberg distribution.

Introduction

L'huitre japonaise Crassostrea gigas Thunberg est une espèce qui présente actuellement en France un grand intérêt commercial. Importée depuis 1971 elle a remplacé l'huitre portugaise Crassostrea angulata Lamarck, décimée par une épizootie grave.

Par la suite, d'autres espèces ont également fait l'objet de tentatives d'introduction, à titre cependant exclusivement expérimental, comme C. rhizophorae Guilding ou C. commercialis Iredale et Roughley.

Pour ce qui concerne C. gigas l'introduction de cette espèce fut essentiellement effectuée par l'importation de naissain du Japon qui permit de poursuivre l'élevage en attendant la constitution de nouveaux gisements ou de géniteurs provenant de Colombie britannique. Par la suite des tentatives d'introduction d'huitres adultes provenant d'Italie, ou de naissain d'écloseries d'origines diverses (Grande-Bretagne, Californie) ont dû être interdites ou suspendues pour des causes variées (mortalité importante, présence d'agents pathogènes).

Si la distinction des genres de la famille des Ostreidae paraît désormais être clairement établie (MARTEIL, 1976), la détermination des espèces reste toujours difficile en raison du caractère très polymorphe de la coquille adulte, et de la difficulté de trouver d'autres caractères permettant de les séparer aisément et avec certitude. Cette difficulté se retrouve très amplifiée lorsque l'on veut étudier les populations qui peuvent exister éventuellement à l'intérieur d'une espèce donnée.

L'intérêt que présente l'analyse électrophorétique des protéines et enzymes sériques ou tissulaires dans le cadre de la systématique, l'importance prise par l'étude du polymorphisme électrophorétique pour la définition des populations naturelles nous ont conduit à entreprendre un travail particulier en ce domaine, dont les premiers résultats sont rapportés dans cette note.

Matériel et méthode

Un lot de 32 huitres C. gigas provenant du Japon et qui avait été stocké en Italie a été étudié. Par ailleurs, les espèces suivantes ont fait l'objet d'analyses simultanées, à titre de comparaison : C. angulata, huitre provenant du Portugal et stockée à Arcachon (France) : 20 individus ; C. commercialis, huitre d'Australie stockée à La Rochelle (France) : 4 individus.

Enfin une dizaine d'huitres appartenant au genre Ostrea edulis Linné et récoltées à Sète (France) ont également été analysées.

Tous les spécimens vivants ont été traités dès l'arrivée au laboratoire. La partie translucide du muscle adducteur est recueillie et broyée à l'aide d'un microhomogénéiseur réfrigéré (23 000 tours par minute). Le solvant d'extraction est un tampon phosphate pH 7,5 (di-sodium hydrogenophosphate 0.0156 M - Potassium phosphate monopotassique 0.0035 M) utilisé dans le rapport poids-volume 1/1. Après solubilisation pendant

24 heures à + 4°C, l'homogenat est centrifugé à 20 000 g et 4°C durant 30 minutes. Le surnageant recueilli est conservé à - 25°C jusqu'au moment de l'analyse qui intervient dans un délai court.

Il faut noter que le muscle adducteur a été choisi de préférence à d'autres tissus tels le manteau, les branchies, les palpes labiaux, les diverticules digestifs, le coeur, le sang qui se sont avérés moins riches en protéines, soit quantitativement, soit qualitativement, dans nos conditions d'extraction.

L'électrophorèse est réalisée sur plaque de gel de polyacrylamide à 7,5 % en utilisant un tampon Tris 0,026 M, glycine 0,066 M, acide aspartique 0,004 M, de pH 8,7 que ce soit dans le gel ou dans les bacs à électrodes.

La migration s'effectue horizontalement en cuve réfrigérée. Les échantillons (40 µl) sont déposés dans de petits réservoirs situés du côté cathodique du gel (PICHOT, 1973). Une différence de potentiel de 25 volts/cm est appliquée durant 1h15 environ. Ce gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie selon le procédé d'URIEL, 1968. Les gels ont été photométrés au moyen d'un densitomètre intégrateur Vitatron.

Résultats

De nombreuses fractions protéiques sont mises en évidence chez C. gigas (fig. 1). On distingue tout d'abord trois fractions très anodiques (1, 2 et 3) assez nettement séparées les unes des autres. Puis vient un ensemble assez flou constitué de deux fractions 4 et 5. A la photométrie (fig.2) chacune de ces dernières apparaît souvent hétérogène et formée de deux sous-fractions. La fraction 6 précède une zone où l'on peut décrire un polymorphisme portant sur une fraction 7 qui est quantitativement très importante. Chez certains individus cette fraction 7 est voisine de 6 et donc en position proche de l'anode. Sa valeur relative est forte, 20 % environ. Nous l'appellerons M₇ A. Elle est souvent suivie d'une fraction quantitativement faible a'. D'autres individus montrent une fraction 7 proche de 8 en position relativement cathodique. Nous la nommons M₇ B. Sa valeur relative est toujours forte (20 % environ) et elle est précédée d'une fraction faible a qui occupe la place de M₇ A. Enfin certaines huîtres présentent deux fractions M₇ A, M₇ B de valeur relative sensiblement égale (10 à 15 %). L'ensemble suivant est constitué de trois fractions 8, 9 et 10 qui apparaissent hétérogènes à la photométrie. Il en est de même pour la fraction 11 qui est proche du point de dépôt. C. angulata montre un schéma sensiblement identique à celui qui vient d'être décrit pour l'huître japonaise. Seules quelques légères différences existent peut-être au niveau des fractions les plus anodiques (1, 2 et 3) ou au niveau de la fraction 8. Un polymorphisme semblable au précédent peut être décrit pour la fraction 7. C. commercialis et Ostrea edulis montrent des schémas électrophorétiques très différents de celui des deux espèces précitées. De nombreuses fractions (12) sont présentes chez la première espèce alors que la seconde n'en présente que 4.

Une première analyse du polymorphisme existant au niveau de la fraction M_7 a été entreprise. Elle porte sur un échantillonnage restreint notamment pour C. angulata ($n < 20$). L'hypothèse d'un contrôle héréditaire invoquant deux allèles codominants M_A et M_B paraît cependant en accord avec la loi de Hardy-Weinberg (tabl. 1).

Conclusion

Les premiers résultats obtenus par l'étude électrophorétique des protéines du muscle adducteur de l'huître C. gigas montrent qu'il existe tout d'abord de nombreux points communs entre cette espèce et C. angulata.

Nos conclusions se rapprochent de celles formulées par RANSON (1960) ou par MENZEL (1974) qui considèrent que ces deux huîtres appartiennent à la même espèce, le premier se basant sur les caractères morphologiques de la prodissoconque, le second sur la facilité d'hybridation et l'existence de meiose et de mitose normales chez les hybrides.

Seules quelques légères variations observées au niveau des fractions les plus anodiques et déjà notées par MORE (1969) pourraient peut-être permettre de dire que ces huîtres appartiennent à des espèces différentes. Une analyse plus fine, par isoélectrofocalisation, a été mise en oeuvre afin de préciser cette possibilité. L'électrophorégramme très particulier de C. commercialis nous donne à penser que l'hypothèse selon laquelle cette huître tuberculée pourrait appartenir à un genre différent Saccostrea, ainsi que l'a proposé STENZEL (1971), pourrait éventuellement être un jour considérée.

Notre étude a enfin permis de mettre en évidence chez C. gigas et C. angulata un polymorphisme au niveau d'une fraction protéique de mobilité moyenne. Un polymorphisme semblable avait déjà été mis en évidence au niveau d'une fraction M_{pi} des protéines du muscle adducteur de C. gigas séparées sur gel d'amidon par BUROKER et coll. (1975). L'application de ce polymorphisme électrophorétique à l'étude de populations d'huîtres d'origines diverses est actuellement en cours. D'autres systèmes, enzymatiques notamment, font également l'objet de recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- BUROKER N.E., HERSHBERGER W.K., CHEW K.K., 1975. - Genetic variation in the Pacific oyster Crassostrea gigas. - J. Fish. Res. Board Can. 32 : 2471-2477.
- MARTEIL L., 1976. - La conchyliculture française. 2ème partie : biologie de l'huître et de la moule. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 40 (2) : 149-346.
- MENZEL R.W., 1974. - Portuguese and japanese oysters are the same species.- J. Fish. Res. Board Can., 31 : 453-456.
- MORE P., 1969. - Contribution à l'étude des protéines solubles du muscle adducteur de l'huître. Thèse, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Nantes, 206 pp.
- PICHOT P., 1973. - Etude sérologique et biochimique de trois espèces de merlus M. merluccius (L.), M. senegalensis Cadenat, M. cadenati Doutré. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 37 (2) : 233-247.
- RANSON G., 1960. - Les Podissoconques (coquilles larvaires) des ostreidés vivants. - Bull. Inst. Océanogr. Monaco, 1183 : 1-41.
- STENZEL, H.B., 1971. - Oysters. In "Treatise on Invertebrate Paleontology". N° 953-N 1244 pp. Part N, Vol. 3 (of 3), Mollusca 6 (K.C. Moore, ed). Geological Society of America Inc. and the University of Kansas. Boulder, Colorado.
- URIEL J., 1968. - Méthode d'électrophorèse dans des gels d'acrylamide-agarose. In FINE J.M., ROPARTZ. Techniques d'électrophorèse de zones. Applications à l'étude des protéines sériques. Edit. La Tourelle, St Mandé : 151-165.

	n	<u>Phénotypes (1)</u>			<u>Fréquence des allèles</u>		χ^2	df	P
		AA	AB	BB	A	B			
<i>C. gigas</i>	32	10 (10.7)	17 (15.6)	5 (5.7)	0.578	0.422	0.25	1	0,9 > P > 0,5
<i>C. angulata</i>	20	8 (8.45)	10 (9.10)	2 (2.45)	0.650	0.350	0.20	1	0,9 > P > 0,5

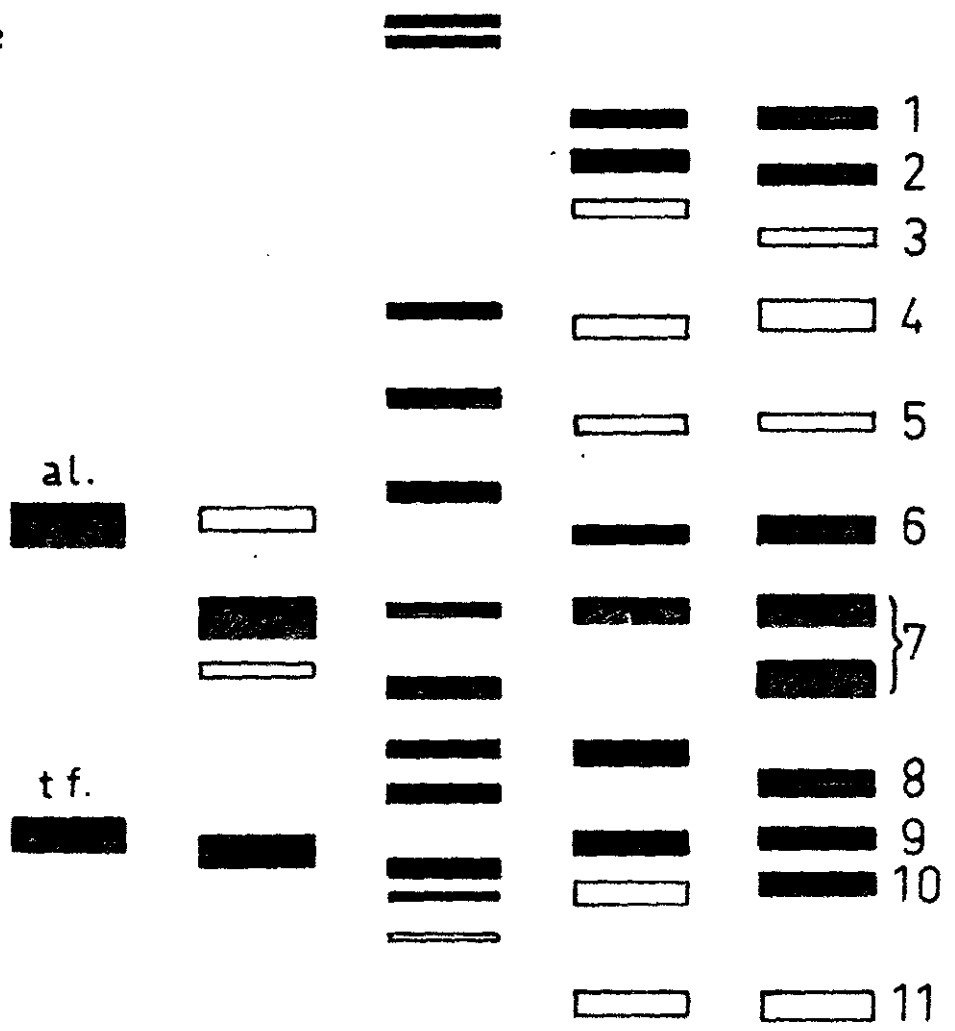
Tableau 1 - Fréquence des phénotypes de la protéine M₇ du muscle adducteur.

(1) Les valeurs entre parenthèses sont celles des fréquences calculées.

fig. 1

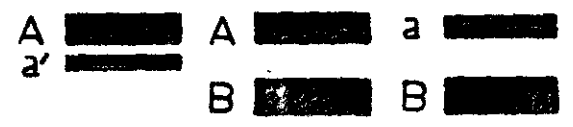
anode

sens de migration ↑



ligne depôt

S.H. O.e. C.c. C.a. C.g.



C. gigas
et C. angulata

LEGENDES DES FIGURES

Fig. 1. - Représentation schématique de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines du muscle adducteur de quatre espèces d'huîtres : Ostrea edulis (O.e.), Crassostrea commercialis (C.c.) C. angulata (C.a.), C. gigas (C.g.). Sont mentionnées les positions de l'albumine (al.) et la transferrine (t.f.) pour le sérum humain de référence (S.h.). Sur la partie droite de la figure représentation du polymorphisme de la fraction 7.

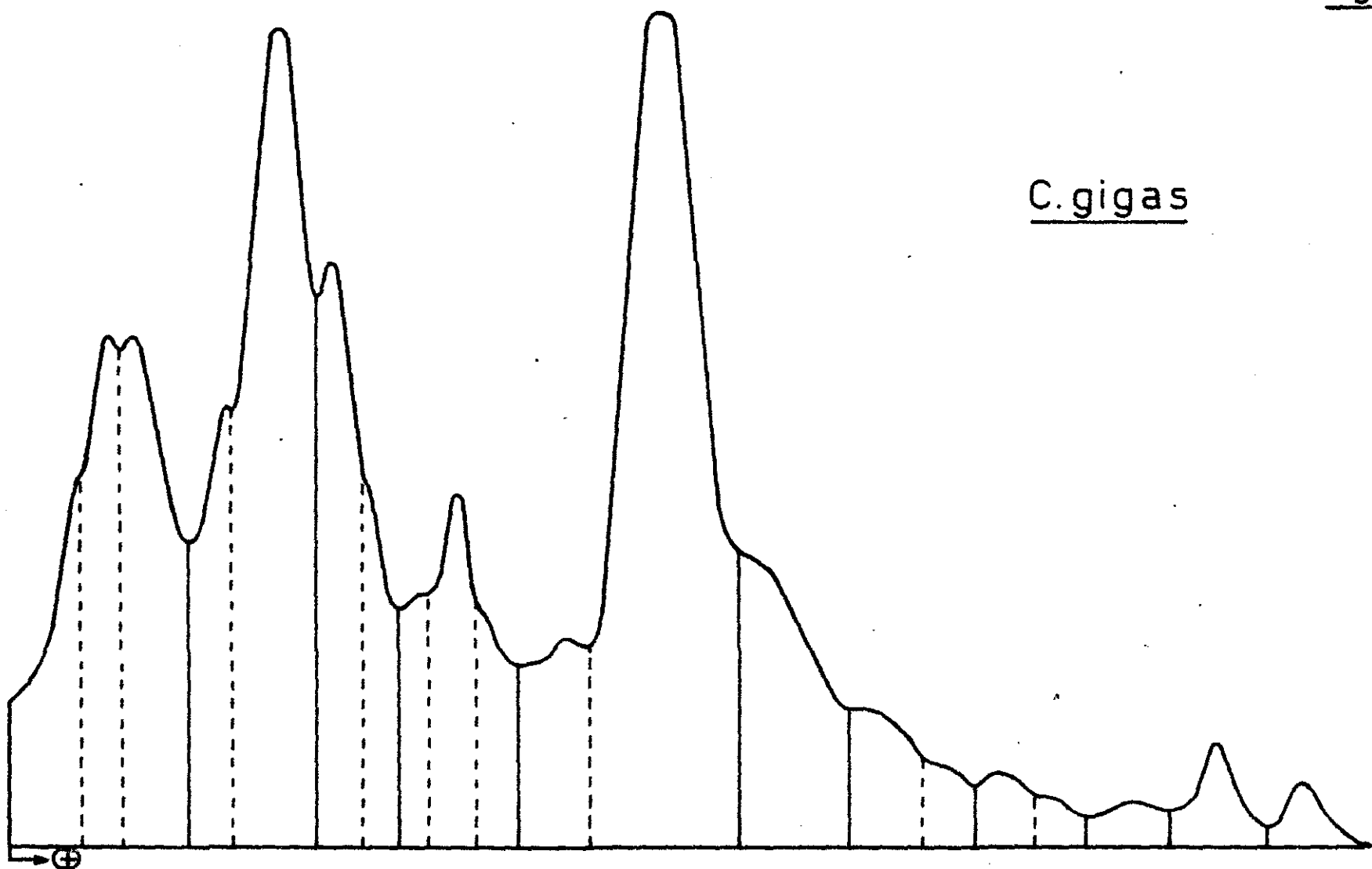
Fig. 2. - Enregistrement photométrique de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines du muscle adducteur de C. gigas.



50004

fig. 2

C. gigas



11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
% 19.50	22.58	8.11	9.27	25.10	7.34	4.05	1.54	0.39	1.35	0.77

