

Caroline FABILOUX

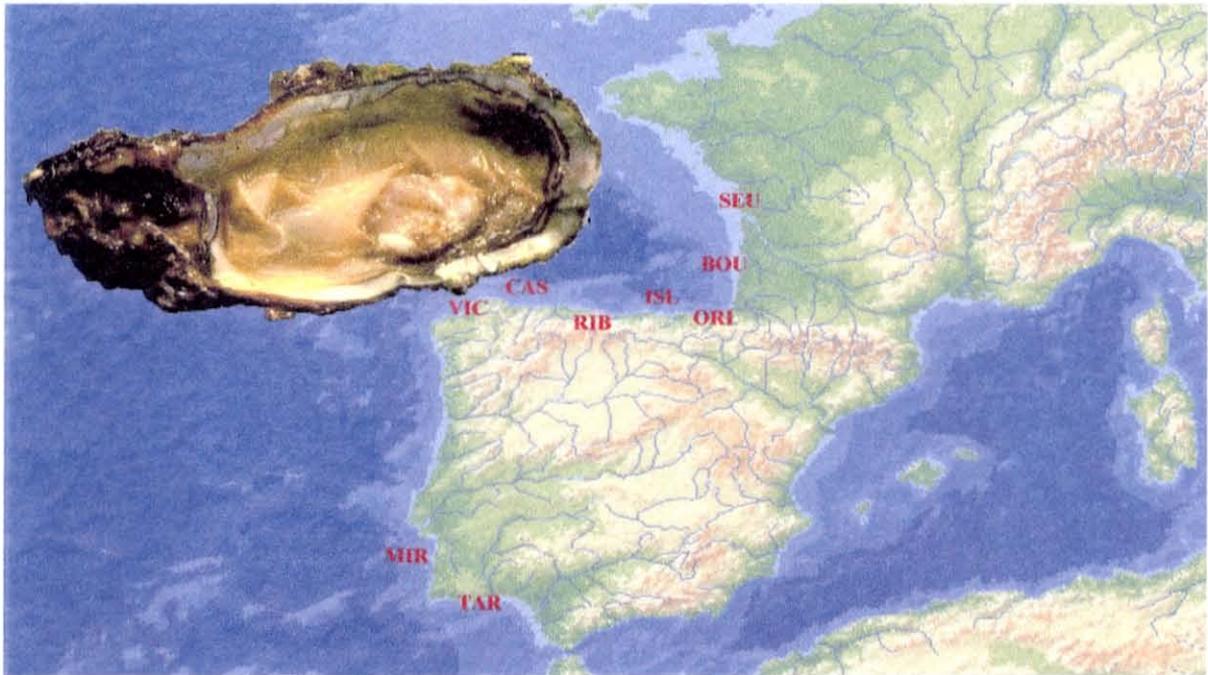
Université de Bretagne Occidentale
Institut Universitaire Européen de la Mer
Année 1999-2000

64651
OURUSOS
E400-FAB.D

Mémoire de DEA (Diplôme d'Etudes Approfondies)
Océanologie Biologique et Environnement Marin
Option Ressources Vivantes et Ecosystèmes Côtiers

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

**DIFFERENCIATION GENETIQUE ET HYBRIDATION
ENTRE LES
POPULATIONS NATURELLES D'HUITRES CREUSES
CRASSOSTREA GIGAS ET *CRASSOSTREA ANGULATA***



Composition du jury : Paul NIVAL
Marcel LEPENNEC
Yves Marie PAULET
Patrice CAYRE

*Stage effectué sous la direction de Pierre BOUDRY
Laboratoire IFREMER de Génétique et Pathologie, UMR 16
BP33, 17390 La Tremblade, France*

Ifremer

AVANT - PROPOS

J'ai réalisé mon stage de DEA au Laboratoire de Génétique et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade (Charente-Maritime). Les activités de recherche de l'équipe de génétique se regroupent en trois grands programmes :

- ✓ Le programme conservatoire de souches de l'huître creuse. L'objectif est, d'une part, la mise au point d'outils moléculaires pour l'analyse des différenciations intraspécifiques et interspécifiques, et d'autre part, l'étude des potentialités d'acclimatation d'espèces étrangères pour briser la situation de monoculture de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. En effet, plus de 98% de la production nationale est aujourd'hui consacrée à *Crassostrea gigas*.
- ✓ Le programme de sélection d'huîtres plates. L'objectif est de sélectionner des souches d'huîtres plates résistantes au parasite *Bonamia ostreae*, ce qui pourrait permettre de relancer la culture de cette espèce.
- ✓ Le programme cytogénétique, majoritairement la triploïdie. Il s'agit de produire des huîtres triploïdes par croisement. Ces huîtres orientent leur métabolisme vers la production de réserves glucidiques, ce qui permet d'obtenir une meilleure croissance et de produire des huîtres consommables même en été.

Mon sujet de recherche s'inscrit dans le cadre du programme de diversification de souches de l'huître creuse. Il complète un travail de thèse réalisé par Arnaud Huvet, "Ressources génétiques et phylogéographie chez *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* : variabilité, différenciation et adaptation des populations naturelles et introduites".

Au cours de ce stage, le travail en équipe a joué un rôle essentiel. En effet la mise au point des outils moléculaires nécessaires à cette étude a été faite en collaboration avec plusieurs personnes du laboratoire. De plus, des résultats obtenus au cours d'études précédentes ont été repris dans l'analyse globale afin de faire des comparaisons sur l'information apportée par chaque type de marqueur.

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Pierre Boudry qui m'a permis d'effectuer ce stage ainsi qu'à Arnaud Huvet. Tous deux ont pris le temps de me guider dans mon travail, de me fournir de patientes explications et de précieux conseils.

Merci également à André Gérard, directeur de Station, pour sa disponibilité durant les six mois que j'ai passés au sein du Laboratoire Génétique et Pathologie de l'IFREMER de La Tremblade.

Je remercie aussi Sylvie Lapègue qui a bien voulu consacrer du temps à la relecture de ce rapport.

Je souhaite dire un grand merci à toute l'équipe de génétique qui a toujours été présente pour répondre à mes questions ainsi qu'à Delphine Rousic et Martine Grasset pour la résolution des petits tracas administratifs et à Florence Albert-Rivet pour ses renseignements éclairés lors de mes recherches de publications.

D'une manière générale, je voudrais remercier très chaleureusement tous les collaborateurs de l'IFREMER de La Tremblade pour leur gentillesse et leur bonne humeur. J'ai réellement apprécié de travailler, au cours de ces six mois, dans une atmosphère chaleureuse et conviviale. Merci à tous.

J'ai utilisé pour mes travaux la séquence du gène amylase établie par J. Moal du Laboratoire de Physiologie des Invertébrés du centre IFREMER de Brest ainsi que celle du gène oIKK trouvée par J.M. Escoubas du Laboratoire de Défense et Résistance chez les invertébrés Marins de l'Université de Montpellier. Je les remercie tous deux.

Enfin, merci à M. Nival, M. Lepennec, M. Paulet et M. Cayre d'avoir accepté d'examiner ce travail.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	1
2. MATERIEL ET METHODES	4
2.1. Biologie de l'espèce étudiée.....	4
2.2. Echantillonnage.....	4
2.3. Amplification des fragments d'ADN.....	6
2.3.1.Extraction d'ADN.....	6
2.3.2.PCR (Polymerase Chain Reaction).....	6
2.4. Analyse du polymorphisme de longueur.....	7
2.4.1.Locus Amylase.....	7
2.4.2.Locus oIKK.....	8
2.4.3.Fragment anonyme obtenu par DALP.....	8
2.5. Analyse du polymorphisme de restriction.....	9
2.5.1.Fragment mitochondrial, COI.....	9
2.5.2.Locus microsatellite CG44R.....	9
2.6. Traitement de données.....	10
2.6.1.Estimation du taux d'hétérozygotie.....	10
2.6.2.Analyse de la variabilité génétique intrapopulation et interpopulation.....	10
2.6.3.Estimation du déséquilibre de liaison.....	11
3. RESULTATS	12
3.1. Le marqueur mitochondrial.....	12
3.2. Les marqueurs nucléaires.....	13
3.2.1.Marqueurs introniques, amylase et oIKK.....	14
3.2.2.Marqueur nucléaire anonyme, DALP 233.....	16
3.3. Insertion dans une séquence microsatellite, marqueur nucléaire CG44R.....	17
4. DISCUSSION	20
4.1. Structuration génétique des populations de <i>C. gigas</i> et de <i>C. angulata</i>	20
4.2. Hybridation naturelle entre <i>C. gigas</i> et <i>C. angulata</i>	22
4.3. Hypothèses sur l'évolution du marqueur CG44R.....	25
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	27
BIBLIOGRAPHIE	28

1. INTRODUCTION

Les huîtres sont des invertébrés marins appartenant à l'embranchement des mollusques et à la classe des bivalves. Ce phylum est l'un des plus complexes et des plus hétérogènes du règne animal. Il est formé de huit classes, de plus de quatre-vingt familles et les animaux qui le composent, présentent une grande diversité structurale et écologique. Au sein de la famille des *ostréidés*, les genres *Crassostrea* et *Saccostrea* regroupent une vingtaine d'espèces d'huîtres creuses. De nombreuses études sont réalisées sur des espèces d'intérêt aquacole comme, pour l'Europe, l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (Lamarck, 1819), l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* (Thunberg, 1793) ou l'huître plate *Ostrea edulis* (Linné, 1758).

Un bref historique de l'ostréiculture française permet de comprendre la répartition actuelle de ces trois espèces. Seule l'huître plate est indigène des côtes françaises. Elle fut cultivée à partir du 17^{ème} siècle dans des bassins aménagés de la côte Atlantique. Mais dès le début du 18^{ème} siècle, une surexploitation des stocks menaça la survie de l'espèce. A partir de 1860, pour pallier cette pénurie, des huîtres creuses portugaises venant de l'embouchure du Tage ont été importées dans le bassin d'Arcachon. "Le Morlaisien", l'un des navires transportant ces huîtres, fut pris dans une tempête et dut vider sa cargaison dans l'embouchure de la Gironde où il s'était réfugié. Cet événement marqua le début de l'implantation de *Crassostrea angulata* sur les côtes françaises. Cette espèce rustique proliféra rapidement ce qui permit une exploitation intense. Mais, de 1966 à 1973, deux épidémies successives provoquèrent une mortalité massive de l'huître portugaise. La première dite "maladie des branchies" fut causée par un iridovirus (Comps, 1970) et la seconde par un virus hémocytaire. Pour relancer l'activité ostréicole, des géniteurs de *Crassostrea gigas* furent importés de Colombie britannique (Canada), eux-mêmes originaires du Japon, et du naissain arriva directement du Japon (Grizel et Héral, 1991). Cette espèce, moins sensible au virus (Comps, 1972), remplaça totalement *Crassostrea angulata* et domina *Ostrea edulis* dans les zones ostréicoles. A l'heure actuelle, l'existence de populations naturelles de *Crassostrea angulata*, en Atlantique nord, serait limitée aux seules côtes espagnoles et portugaises (Boudry *et al.*, 1998). Les caractéristiques de *Crassostrea gigas*, telles ses capacités d'adaptation et sa résistance aux virus, en font une espèce tout à fait adaptée pour l'ostréiculture. Introduite dans le monde entier, elle représente aujourd'hui plus de 95% de la production mondiale d'huîtres (données FAO, 1996).

Des études comparatives entre les deux taxons ont été réalisées depuis l'introduction de *Crassostrea gigas* en Europe. Les observations faites ont remis en question leur classification

taxonomique. Thunberg (1793) et Lamarck (1819) ont décrit deux espèces distinctes. En effet, leurs répartitions géographiques étaient très éloignées, Japon pour *Crassostrea gigas* et Portugal pour *Crassostrea angulata*, et l'isolement géographique est l'une des causes majeures de spéciation. Pourtant, ces deux taxons sont indiscernables en terme de morphologie, que ce soit au stade larvaire ou adulte (Ranson, 1948 ; Menzel, 1974), en terme de polymorphisme enzymatique, estimé par des études sur les allozymes, (Mathers *et al.*, 1974 ; Buroker *et al.*, 1979 ; Mattuicci et Villani, 1983) ainsi qu'en terme de caryotype (Menzel, 1974 ; Leitão *et al.*, 1999). L'éloignement de leurs aires de répartitions était, à priori, contradictoire avec leurs similitudes génétique, morphologique et écologique et une question persistait quant à l'origine de ces deux taxons. Plusieurs hypothèses avaient été avancées à ce sujet. La première proposait l'existence d'un ancêtre commun fossile *Crassostrea gryphoides* (Stenzel, 1971). Mais l'absence de divergence au cours du temps malgré l'isolement géographique exclut cette hypothèse. La seconde était l'origine portugaise de l'espèce et son introduction accidentelle au Japon mais ceci était peu probable car des espèces apparentées à *Crassostrea gigas*, telle *Crassostrea sikamea*, ont été trouvées en Asie, ce qui indiquerait une présence de *Crassostrea gigas* dans cette zone. Ainsi, la dernière hypothèse proposait l'introduction de *Crassostrea angulata* au Portugal depuis l'Asie, sa région d'origine (Buroker *et al.*, 1979). Des outils moléculaires, mis au point par l'équipe de génétique du LGP de l'IFREMER de La Tremblade, ont permis de répondre à cette question et de confirmer l'origine asiatique de *Crassostrea angulata* (Boudry *et al.*, 1998). En particulier, un marqueur mitochondrial (un fragment de 710 paires de bases (pb) du gène mitochondrial de la sous-unité I de la Cytochrome Oxydase) a servi à étudier le polymorphisme au sein de populations naturelles, échantillonnées en Europe et en Asie. Une analyse phylogénétique basée sur du polymorphisme de longueur a mis en évidence le regroupement de populations portugaises et taïwanaises. L'introduction en Europe daterait du 16^{ème} siècle lors des traversées des vaisseaux de commerce portugais. Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux obtenus, dans le même temps par ÓFoighil *et al.* en 1998. Parallèlement, des calculs de *Fst* (Indice de Wright qui estime la différenciation génétique entre les populations) faits à partir de résultats obtenus avec des marqueurs microsatellites (séquence nucléotidique courte répétée en tandem dans une partie du génome nucléaire) donnent des valeurs significatives mais faibles (Huvet *et al.*, soumis). Au vu de ces résultats, il était intéressant d'étudier davantage les différences qui existent entre les informations fournies par les marqueurs mitochondriaux et nucléaires.

Un autre axe d'étude était la question de l'existence ou de l'absence de barrières reproductives entre ces deux taxons. Des croisements intertaxons donnent des hybrides viables

avec des taux de fertilisation et de développement en première génération identiques à ceux obtenus dans les croisements intrataxons (Menzel, 1974 ; Gaffney et Allen, 1993). De même, des hybrides fertiles ont été obtenus au LGP en 1999, ce qui confirme les résultats de Menzel en 1974. Ces données conduisent à la conclusion que *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* sont deux sous-espèces et non deux espèces distinctes.

La présente étude s'inscrit dans ce contexte de recherche et elle est la continuité logique de ces travaux. Elle consiste en l'analyse de populations naturelles de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* à partir d'échantillons récoltés dans des régions où les deux taxons sont supposés être en sympatrie. Le but est de déterminer si les deux sous-espèces s'hybrident dans la nature, s'il existe des zones d'introggression d'un taxon par rapport à l'autre et quelle est la composition génétique des différentes populations. Les deux seules régions au monde où il existe des zones potentielles de sympatrie sont, d'une part, une région entre le Japon (*C. gigas*) et Taiwan (*C. angulata*) sur les îles Ryū Kyū, et d'autre part, la côte atlantique de l'Espagne, intermédiaire entre la France (*C. gigas*) et le Portugal (*C. angulata*). Etant donné la difficulté d'obtenir des huîtres venant d'Asie, l'échantillonnage a été fait sur des populations européennes, au sud de la France, en Espagne et au Portugal. Ce travail de recherche a été décomposé en deux grands axes. Le premier est la recherche et la mise au point de nouveaux marqueurs moléculaires à partir de séquences de gènes, oIKK (Escoubas *et al.*, 1999) et amylase (Moal *et al.*, 2000), à partir de tout le génome nucléaire par la technique de DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism) et à partir de séquences microsatellites. En effet, une condition nécessaire à l'étude de l'hybridation dans les populations est de pouvoir distinguer les hybrides. Or, ils n'étaient pas repérables par des méthodes classiques d'analyses morphologiques ou enzymatiques à cause de la similarité des deux sous-espèces. La deuxième partie consiste à utiliser les marqueurs nucléaires et un marqueur mitochondrial sur les échantillons. Cette étude permettra de connaître la composition actuelle des populations d'huîtres creuses en Europe, de la comparer avec les données antérieures et d'envisager un scénario retraçant l'histoire de ces deux taxons. De plus, on pourra comparer l'information apportée par le locus mitochondrial et les locus nucléaires sur lesquels les pressions évolutives agissent différemment.

Ces travaux s'intègrent dans le cadre plus général de la recherche en aquaculture pour le maintien de la diversité génétique des souches mais aussi dans la conservation de la biodiversité.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. BIOLOGIE DE L'ESPECE ETUDIEE

Crassostrea gigas et *Crassostrea angulata* sont deux taxons d'huîtres creuses (Annexe 1-Classification taxonomique des organismes étudiés) ayant des caractéristiques biologiques et écologiques similaires. Ils sont présents dans les océans tempérés (et subtropical pour *C. angulata*) sur les fonds meubles ou durs depuis le médiolittoral jusqu'à quinze mètres de profondeur dans l'infralittoral, ainsi que dans des lagunes. Ces bivalves, de forme allongée dont la taille peut atteindre 30 cm à l'âge adulte, sont accrochés au substrat par leur valve gauche. C'est dans cette valve creuse que se développe la masse viscérale alors que l'autre valve est plate. La coquille est formée de dépôts crayeux feuilletés. Les huîtres creuses sont des hermaphrodites alternatifs. En milieu naturel, en Europe, la reproduction a lieu en juillet – août. De la fécondation externe sont issus de 20 à 100 millions d'œufs qui vont se transformer en larves nageuses trocophores d'environ 50 µm. Les larves évoluent jusqu'à atteindre un diamètre de 300 µm et se transforment ensuite en larves pédivelligères. Ce stade est marqué par l'apparition d'un œil sur la future coquille et d'un pied. Ensuite, la larve se fixe et perd son pied, c'est une post-larve. Le développement larvaire dure entre 21 et 28 jours suivant la température de l'eau. Dans les zones les plus chaudes, il y a deux cycles de reproduction par an. La grande plasticité morphologique de ces animaux explique les variations phénotypiques observées entre des huîtres vivant dans des régions différentes.

2.2. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage a été effectué dans sept populations naturelles des côtes atlantiques de France, d'Espagne et du Portugal. La carte de la répartition des populations échantillonnées est donnée en figure 1. Cinquante individus ont été prélevés à chaque fois, excepté sur quelques sites où des difficultés d'échantillonnage ont été rencontrées. La localisation et l'effectif des populations échantillonnées sont indiqués dans le tableau I. Dans ce tableau, les quatre populations repérées par un sigle "*" ont été échantillonnées antérieurement et déjà étudiées avec des marqueurs microsatellites. Elles vont servir à faire des comparaisons sur l'information apportée par chaque type de marqueur. Deux d'entre elles proviennent d'Asie.



Figure 1. Répartition des populations européennes échantillonnées

Tableau I. Présentation des populations échantillonnées

Population	Lieu de prélèvement	Effectif
SEU*	Anse de la Seudre, La Tremblade, France	48
BOU	Vieux Boucau, Landes, France	50
ISL	Islares, Pays Basque, Espagne	48
ORI	Orio, Pays Basque, Espagne	50
RIB	Ribadesella, est de Gijon, Espagne	50
CAS	Castropol, limite Asturie-Galice, Espagne	45
VIC	Ria del Barquero-Vicedo, Galice, Espagne	50
MIR*	Rio Mira, Portugal	30
TAR	Tavira, sud du Portugal	50
OGA*	Hiroshima, Japon	50
KAO*	Tungking, Taiwan	46

Le sigle "*" indique les populations échantillonnées au cours d'une campagne précédente

2.3. AMPLIFICATION DES FRAGMENTS D'ADN

2.3.1. Extraction d'ADN

L'ADN de 345 individus a été extrait selon la méthode phénol-chloroforme (Moore, 1993) (Annexe 2) à partir d'extraits de branchies conservés dans de l'alcool absolu. Après extraction, l'ADN est dilué (généralement à 5%) après quantification sur gel d'agarose, conservé dans une solution de TE 1 : 10 (Annexe 3-Composition des tampons et des réactifs) et placé à -20°C. L'ADN déjà extrait de 175 autres individus a également servi pour l'étude. Il s'agit des échantillons marqués du sigle "*" dans le tableau I.

2.3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une réaction de polymérisation exponentielle d'un fragment d'ADN, à partir d'une paire d'amorces spécifiques de la région du génome à amplifier. Cette méthode, décrite pour la première fois par Mullis en 1987, se décompose en trois étapes :

- ✓ La dénaturation de l'ADN double brin,
- ✓ L'hybridation des amorces avec la région complémentaire de l'ADN,
- ✓ La polymérisation des oligonucléotides grâce à l'enzyme *Taq* polymérase.

Chaque étape, basée sur des variations de température (Annexe 4-Principe de la réaction de PCR), est répétée sur trente cycles, automatisés grâce à un thermocycleur programmable (PTC 100™, MJ Research, USA). Les amorces sont choisies en fonction de la région du génome à amplifier et les programmes sont adaptés à chaque type de réaction. L'annexe 5 donne le nom des amorces, les séquences et la longueur des fragments amplifiés. Les programmes sont indiqués en annexe 6. Les réactions de PCR sont faites dans un volume de 20 ou 50 µl, avec de l'ADN, les amorces, des dNTPs, du MgCl₂, l'enzyme *Taq* polymérase et son tampon de réaction. Les proportions des composants, optimisées pour chaque couple d'amorces, sont détaillées en annexe 7.

Les différentes parties du génome amplifiées grâce à la technique de PCR sont utilisés comme marqueurs moléculaires pour cette étude. Le tableau II présente les données générales sur les marqueurs qui ont été utilisés au cours de l'étude.

Tableau II. Noms des marqueurs utilisés pour l'étude des populations de *C. gigas* et *C. angulata*, parties du génome ciblées, techniques d'analyses et références.

Fragment amplifié Nom du marqueur	Génome	Techniques d'analyses	Références
1-Cytochrome Oxydase I COI	mitochondrial	PCR-RFLP Gel d'agarose	Folmer <i>et al.</i> , 1994 Boudry <i>et al.</i> , 1998
2-Introns du gène amylase Amylase	nucléaire	PCR radioactive Gel d'acrylamide	Moal <i>et al.</i> , 2000
3-Introns du gène oIKK oIKK	nucléaire	PCR radioactive Gel d'acrylamide	Escoubas <i>et al.</i> , 1999
4-Région anonyme DALP233	nucléaire	PCR radioactive Gel d'acrylamide	Desmarais <i>et al.</i> , 1998 Huvet <i>et al.</i> , in prep.
5-Insertion dans séquence microsatellite CG44 CG44R	nucléaire	PCR-RFLP Gel d'agarose	Magoulas <i>et al.</i> , 1998 Huvet <i>et al.</i> , in prep.

2.4. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE LONGUEUR

Afin de repérer des différences de taille d'allèles allant de quelques pb à quelques dizaines de pb, les locus amylase, oIKK, "DALP233" et "DALP235" sont analysés sur gel d'acrylamide à 6% (Annexe 8-Migrations en gels d'agarose et de polyacrylamide) après un marquage radioactif des amorces de PCR au P33 (Annexe 9). Cette technique fournit une très bonne résolution puisqu'elle permet de séparer des fragments qui ne diffèrent que d'une base azotée mais elle est lourde à mettre en œuvre.

2.4.1. Locus Amylase

A partir de la séquence du gène nucléaire de l'amylase de l'huître creuse (Moal *et al.*, 2000), plusieurs couples d'amorces ont été dessinés en respectant quelques règles. Les amorces doivent faire environ 20 pb, avoir une Tm (Température optimale d'hybridation) comprise entre 62°C et 68°C et un pourcentage en bases C (Cytosine) et G (Guanine) compris entre 40% et 60%. De plus, il est préférable que les amorces correspondent à des régions codantes du génome, plus soumises à la sélection et donc plus conservées de génération en génération. L'un des couples testés, bH/Amy4bisBB, permet d'amplifier une zone intronique du gène de l'amylase d'environ 500 pb, qui est choisie comme marqueur nucléaire. Ces amorces sont d'abord utilisées sur quelques individus échantillonnés afin de mettre au point les conditions

expérimentales optimales (température d'hybridation pour la PCR, temps de migration en gel de polyacrylamide...) puis elles sont utilisées sur tous les individus.

2.4.2. Locus oIKK

Le gène oIKK (Escoubas *et al.*, 1999) est un gène homologue du gène IKK (IkB Kinase) existant chez les mammifères qui intervient dans des réactions de défense immunitaire. Sa séquence a permis de tester, sur quelques échantillons d'ADN, différents couples d'amorces. L'un d'eux, appelé D9T3/D9AP10, encadre une région intronique du gène de 700 pb environ. Après mise au point des conditions expérimentales sur un petit échantillonnage, la manipulation est faite sur tous les individus comme pour le locus amylase.

2.4.3. Fragment anonyme obtenu par DALP

Une nouvelle technique a servi à la mise au point d'un troisième marqueur. Cette technique appelée DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism) (Desmarais *et al.*, 1998) permet de trouver des marqueurs polymorphes, de les isoler et de les séquencer, le tout sans avoir recours à une banque génomique. Le principe général de la méthode est décrit ci-après. Des échantillons d'ADN des deux taxons sont amplifiés avec des couples d'amorces arbitraires (une amorce et sa séquence réverse), dessinées à partir d'une séquence universelle M13 identique pour chaque couple et d'une terminaison propre à chaque amorce. Les produits PCR migrent en gel de polyacrylamide. Les bandes qui présentent un polymorphisme de longueur ou de présence / absence entre les échantillons des deux taxons sont ensuite récupérées directement sur le gel et réamplifiées par PCR avec les mêmes amorces mises en quantité double. La température d'hybridation est augmentée pour obtenir plus de spécificité. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés, purifiés puis séquencés et des amorces permettant l'amplification de cette région du génome sont dessinées en respectant les contraintes citées dans la partie 2.4.1. Pour notre étude, six pools (trois de *C. gigas* et trois de *C. angulata*) de huit individus chacun ont été testés avec huit amorces universelles. Deux d'entre elles, DALP233 et DALP235 (les amorces et les marqueurs portent le nom de la technique utilisée pour les mettre au point), ont donné des profils avec des bandes présentant du polymorphisme entre les deux taxons. Les bandes intéressantes ont été récupérées, réamplifiées puis clonées grâce au kit "TA Cloning Kit" (Invitrogen, Netherlands). L'ADN à cloner a été inséré dans un vecteur plasmidique *pCRII*. Ensuite, des bactéries ont été transformées avec ce plasmide puis mises en culture. Un test PCR permet de sélectionner celles qui ont intégré l'ADN. Elles sont alors digérées par l'enzyme *EcoRI* pour vérifier si la bande a bien la taille attendue. Enfin, le

fragment est séquencé. Deux paires d'amorces ont été dessinées à partir de la séquence, DALP233Q1/DALP233Q2 et DALP235Q1/ DALP235Q2.

2.5. ANALYSE DU POLYMORPHISME DE RESTRICTION

2.5.1. Fragment mitochondrial, COI

Le premier marqueur analysé sur les échantillons est un fragment de 710 pb du gène mitochondrial de la Cytochrome Oxydase. L'analyse est faite par la méthode de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Elle consiste en un diagnostic des différences de longueur de fragments, d'une séquence d'ADN digérée par des enzymes de restriction après amplification par PCR (Botstein *et al.*, 1980). Quatre enzymes polymorphes (Boudry *et al.*, 1998) sont utilisées : *TaqI*, *MseI*, *Sau3A* et *HhaI* (Annexe 10-Données sur les enzymes de restriction).

Les produits de digestion sont ensuite visualisés sur gel d'agarose à 1% ou 1,5% (Annexe 8) grâce à du bromure d'ethidium (BET) qui s'intercale entre les bases d'ADN et devient fluorescent sous UV. L'électrophorèse en gel d'agarose est bien adaptée à la révélation des produits de digestion car elle offre un bon compromis entre le niveau de résolution, de 300 à 15000 pb, le pouvoir de séparation de 50 pb, et la grande simplicité de mise en pratique. Les fragments obtenus après digestion par les quatre enzymes diffèrent d'au moins 70 pb (Boudry *et al.*, 1998) et sont donc séparés et visibles sur gel d'agarose.

Il faut noter que chez les huîtres comme chez la plupart des eucaryotes, la transmission de l'information mitochondriale haploïde est maternelle et le génome ne recombine pas (Boursot et Bonhomme, 1986). Par conséquent, une analyse génétique basée sur l'ADN mitochondrial ne permet pas d'analyser les phénomènes d'hybridation potentiels. Ainsi, il est indispensable de disposer de marqueurs nucléaires.

2.5.2. Locus microsatellite CG44R

L'utilisation du microsatellite CG44 lors d'une étude de population (Huvet, 1997) a mis en évidence l'existence d'une différence de taille d'environ 24 pb entre la distribution moyenne de la taille des allèles de *C. gigas* et de *C. angulata*. Après clonage et séquençage de deux allèles (un de *C. gigas* et un de *C. angulata*), une confrontation des séquences montre que cette différence de taille n'est pas explicable par une variation du nombre de répétitions du motif "CA" du microsatellite. Par contre, on observe une insertion de 24 pb chez *C. angulata*, située en amont de la séquence microsatellite et absente chez *C. gigas* pour les deux individus

séquencés. De plus, cette insertion contient un site de coupure enzymatique pour l'enzyme *BsrGI*. Ainsi, cette séquence pourrait se révéler être un marqueur codominant spécifique (appelé CG44R), si la spécificité était confirmée pour l'ensemble des individus. La méthode de PCR - RFLP, avec les amorces CG44S/CG44AS et l'enzyme *BsrGI*, ainsi que la technique de migration en gel d'agarose décrites dans le paragraphe précédent conviennent aussi pour ce marqueur. La température d'hybridation du cycle PCR initialement à 58°C, trop stringente, a été descendue à 57°C pour obtenir de meilleures amplifications.

2.6. TRAITEMENT DE DONNEES

2.6.1. Estimation du taux d'hétérozygotie

Le taux d'hétérozygotie est estimé par population pour chaque marqueur grâce à l'indice de Nei (1987). Les résultats sont donnés par les deux indices suivant : "*H_o*" est l'hétérozygotie observée et "*H_b*" est un estimateur de l'hétérozygotie attendue, dans les conditions de Hardy Weinberg, corrigé pour le biais d'échantillonnage.

Rappel sur l'équilibre de Hardy (1908) et Weinberg (1908) : soit une population de taille infinie dont les individus possèdent un gène avec deux allèles A et a dont les fréquences respectives sont p et q ($q=1-p$). En l'absence de mutation, de migration et de sélection et si la reproduction se fait en panmixie (croisements aléatoires des individus), alors les fréquences alléliques ne changent pas d'une génération à l'autre et les fréquences des génotypes AA, Aa et aa sont respectivement p^2 , $2pq$ et q^2 . La population est alors à l'équilibre de Hardy Weinberg.

2.6.2. Analyse de la variabilité génétique intrapopulation et interpopulation

Un calcul des fréquences alléliques par marqueur et par population donne une première estimation de la variabilité. Ensuite, les données obtenues pour chaque locus sont analysées avec des outils mathématiques mis au point par Wright en 1951, les *F* statistiques. L'indice *F* mesure l'approche à la fixation d'un allèle, c'est aussi la perte d'hétérozygotie dans le cas d'organismes diploïdes. Pour des populations structurées en sous-populations, trois paramètres, décrits ci-dessous, permettent d'estimer la structuration des peuplements.

- ✓ *F_{is}* mesure les écarts à l'équilibre de Hardy Weinberg à l'intérieur d'une sous-population,
- ✓ *F_{st}* mesure le déficit total en hétérozygote dû à la structure en sous-populations,
- ✓ *F_{it}* représente l'indice de fixation d'un allèle pour la population totale.

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

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

Les indices de fixation de Wright sont calculés d'après les formules de Weir et Cockerham (1984) qui donnent un estimateur sans biais, *thêta*, de *F_{st}* dans un modèle de populations en îles. *Thêta* est calculé à partir de l'analyse des composantes intrapopulations et interpopulations de la variance (V) des fréquences alléliques.

$$\Theta = \frac{\sum(A_i)}{\sum(A_i + B_i + C_i)} \quad \text{où } A_i + B_i + C_i = V_i$$

A_i est la composante de la variance des fréquences alléliques due à la structure en sous populations, *B_i* est celle due à l'existence de différences interindividuelles et *C_i* est la composante de la variance due aux corrélations entre les gamètes au niveau individuel.

La significativité des valeurs de *F_{is}* (*F_{is} ≠ 0*) et de *thêta* (*Θ ≠ 0*) est testée par rééchantillonnage aléatoire des allèles pour *F_{is}* et des individus pour *F_{st}*, pour 1000 permutations avec pour hypothèse nulle *Θ = 0*. Cette technique permet de construire un intervalle de confiance des valeurs de *F_{is}* et de *F_{st}* significatives. Dans les tableaux de résultats, trois seuils de significativité sont indiqués : *p < 0,005 ** ; *p < 0,001 *** et *p < 0,001 ****. Les valeurs non significativement différentes de zéro ne portent pas d'indication.

2.6.3. Estimation du déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison entre deux locus a été calculé en reprenant les algorithmes du programme "LinkDisk" de Black et Krafur (1985). Soit *D₀* la valeur du déséquilibre de liaison entre les deux locus à la première génération, soit *r* la probabilité de recombinaison entre les locus et (1-*r*) la probabilité qu'il n'y ait pas recombinaison, on a la relation suivante :

$$D_1 = (1-r) D_0$$

Par récurrence on obtient la relation ci-dessous :

$$D_t = (1-r)^t D_0$$

D_t est le déséquilibre de liaison à la génération *t*.

Tous les calculs et les tests décrits dans la partie 2.6 ont été réalisés à l'aide du logiciel GENETIX™ 3.3 (Belkhir *et al.*, 1996).

3. RESULTATS

3.1. LE MARQUEUR MITOCHONDRIAL

La technique de PCR-RFLP appliquée au fragment d'ADN du gène de la Cytochrome Oxydase I, permet d'associer à chaque individu, quatre couples "enzyme/fragment de restriction" désignés par des lettres minuscules sur la figure 2 (les lettres correspondent, dans l'ordre, aux résultats des digestions par *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI*). La combinaison des différents profils obtenus permet de définir six haplotypes désignés par une lettre majuscule sur la figure 2.

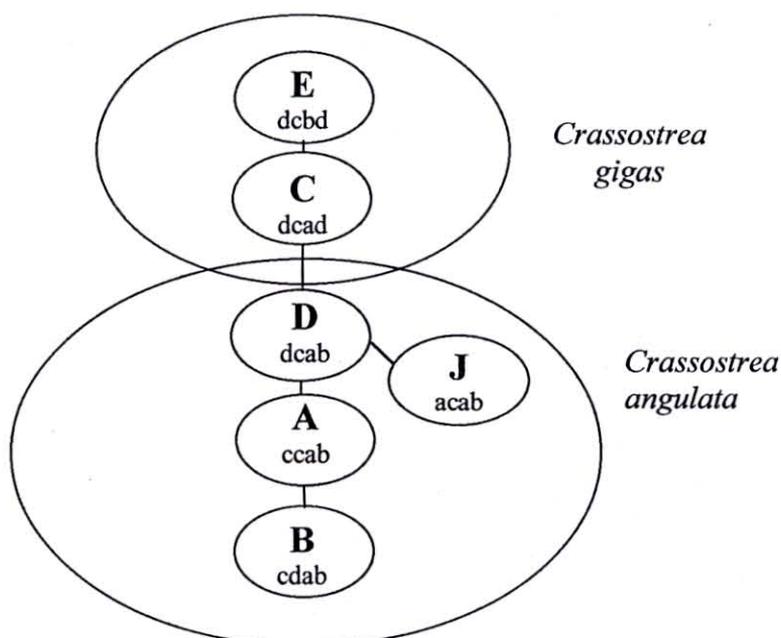


Figure 2. Schéma présentant les haplotypes obtenus par PCR-RFLP à partir des produits d'amplification de COI avec quatre enzymes de restriction *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI* et taxon associé aux haplotypes (d'après Boudry *et al.*, 1998)

Une relation a été établie (Boudry *et al.*, 1998) entre ces haplotypes et les deux taxons d'huîtres creuses. Ainsi, les types A, B, D et J semblent associés à *C. angulata* et les haplotypes C et E correspondraient à *C. gigas*, comme indiqué sur la figure 2. Les huîtres prélevées sur le terrain sont classées provisoirement dans l'un ou l'autre des taxons, avant toute analyse, en fonction de leur provenance géographique et des connaissances recueillies sur les populations. La référence taxonomique prise dans la suite de ce rapport correspond à celle établie à partir de ce marqueur mitochondrial. Les populations SEU, de la côte ouest de la France, et MIR, au sud du Portugal, serviront de référence pour la suite de l'étude car on connaît leur composition génétique grâce à des études antérieures. SEU, avec 97% d'haplotype C et 3% d'haplotype E est

composée de 100% de *C. gigas*, alors que MIR, monomorphe pour l'haplotype A, est *C. angulata*.

Le tableau III présente les fréquences de chacun des six haplotypes par population. L'un des haplotypes domine dans chaque population. L'haplotype C est majoritaire sur l'ensemble des populations avec, par exemple, 98% pour ORI et 94% pour VIC. TAR, RIB et BOU sont les populations les plus polymorphes avec trois ou quatre haplotypes différents alors qu'il y a en moyenne, deux haplotypes par population. Les fréquences supérieures à 0,75 sont en gras dans le tableau III. Les deux populations en gras sont les populations de référence.

Tableau III. Fréquences des différents haplotypes par population au locus COI

Population	Haplotypes					Effectif
	A	B	C	D	E	
SEU			0,97		0,03	42
OGA			0,96		0,04	46
ORI			0,98		0,02	50
ISL			1			47
RIB	0,04		0,93		0,03	45
CAS			1			43
VIC			0,94		0,06	50
BOU	0,06		0,89		0,03	95
TAR	0,75		0,15			40
MIR	1					30
KAO	0,9	0,07			0,03	40

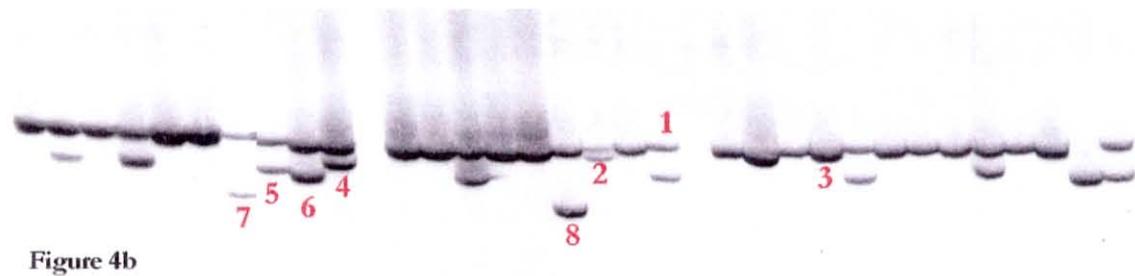
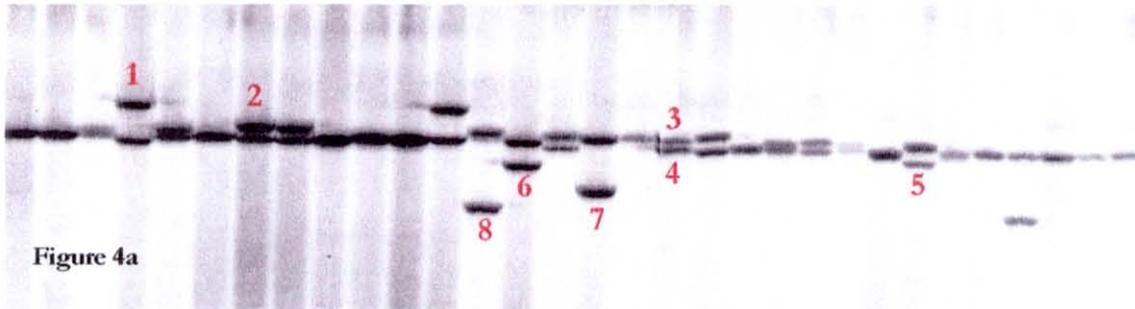
La structuration génétique des populations pour le locus COI a été étudiée avec l'indice *thêta*. Le *Fst* intrataxon est 0,03 pour les populations *C.gigas* et 0,044 pour les populations *C.angulata*. Le *Fst* intertaxon ($Fst = 0,687$) est beaucoup plus élevé que ceux calculés intrataxon. Ces valeurs de *Fst* confirment le fait que ce locus constitue un bon marqueur diagnostique des taxons *C. gigas* et *C. angulata*. Cependant, pour étudier la variabilité des populations de deux taxons aussi proches, il faut des marqueurs plus variables.

3.2. LES MARQUEURS NUCLEAIRES

Les quatre marqueurs suivants n'avaient jamais été utilisés sur des huîtres creuses *C. gigas* ou *C. angulata*. Après une phase technique de mise au point, une première analyse de ces locus a été faite sur les deux populations de référence SEU et MIR. Suivant le degré de spécificité de chaque marqueur et l'information apportée, l'étude a été étendue à l'ensemble des populations ou non.

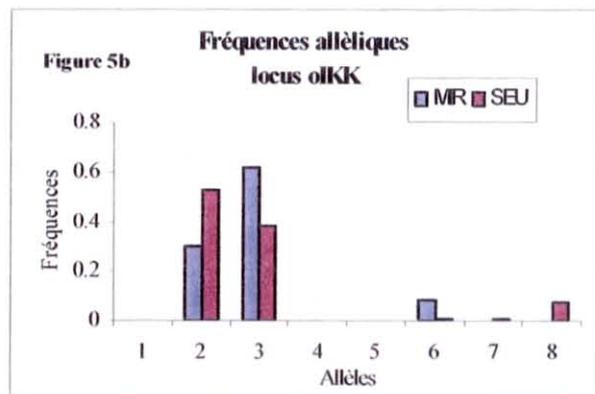
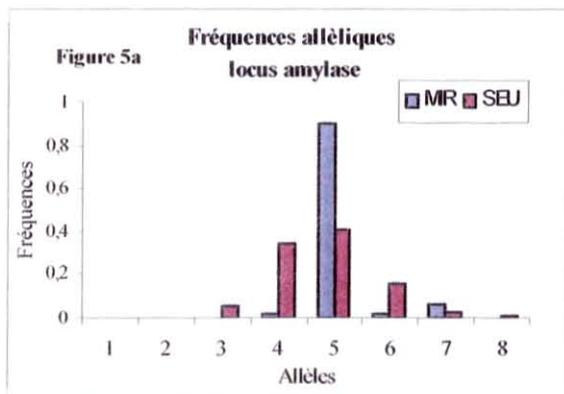
3.2.1. Marqueurs introniques, amylase et oIKK

Tous les allèles d'un locus donné sont répertoriés grâce à la lecture des photos de gel de polyacrylamide (figures 4a et 4b). Les allèles sont numérotés en commençant par le numéro un pour l'allèle le plus haut et en incrémentant d'une unité à chaque nouvel allèle rencontré. Les numéros des allèles sont indiqués en rouge sur la figure.



Figures 4a et 4b. Photos de gel de polyacrylamide 6% après migration des allèles du locus amylase (a) et oIKK (b). Numéro des allèles indiqués en rouge

La seconde étape consiste à analyser la distribution des fréquences alléliques dans les populations de référence (figures 5a et 5b) pour savoir s'il existe des allèles spécifiques de *C. gigas* (SEU) ou de *C. angulata* (MIR).



Figures 5a et 5b. Répartition des fréquences alléliques aux locus amylase (a) et oIKK (b) dans les populations de référence SEU (N=46) et MIR (N=30)

Les distributions obtenues pour les locus amylase et oIKK ne permettent pas de séparer les deux populations. En effet, les allèles dominants sont les mêmes dans les deux populations pour chaque locus, l'allèle 5 est dominant pour amylase et les 2 et 3 le sont pour oIKK.

Le taux de polymorphisme, représenté par le nombre moyen d'allèles par population, est de 6 au locus amylase et 7 au locus oIKK. Ces locus sont plus variables que le marqueur mitochondrial mais moins polymorphes que les microsatellites, très informatifs car hypervariables. Par exemple, le locus microsatellite CG44 (Magoulas *et al.*, 1998) compte en moyenne 23 allèles par population (Huvet, soumis). Il était donc intéressant de savoir quelle information ces marqueurs introniques allaient fournir sur la structure nucléaire des populations. Les deux locus ont été analysés dans sept autres populations pour estimer la variabilité intrapopulation et interpopulation.

Tableau IV. Fréquences alléliques aux locus amylase et oIKK

	Locus amylase											Locus oIKK									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RIB			0,05	0,25	0,6		0,06	0,02		0,01	0,01	0,02	0,44	0,41	0,03	0,01	0,03	0,04	0,01		0,01
ORI		0,02		0,06	0,71		0,1	0,03	0,01		0,01		0,17	0,62	0,02	0,01	0,02	0,03	0,11	0,01	
ISL				0,18	0,76	0,01	0,04						0,3	0,5	0,04	0,03	0,02	0,04	0,01	0,04	
CAS			0,05	0,23	0,53	0,1	0,06	0,03				0,01	0,33	0,48	0,02	0,04	0,02	0,04	0,04		
VIC			0,03	0,13	0,67		0,02	0,11		0,02	0,01		0,23	0,61			0,06	0,02	0,04	0,01	0,02
BOU		0,03	0,02	0,09	0,78		0,06			0,01	0,01	0,01	0,27	0,54	0,01	0,02	0,02	0,02	0,06		0,04
TAR	0,01		0,05	0,19	0,66		0,07	0,01					0,36	0,48	0,01	0,01	0,07	0,02	0,04		

La distribution des fréquences alléliques répertoriées dans le tableau IV indique que ces locus ont un ou deux allèles fréquents alors que les autres allèles sont rares. Les fréquences supérieures à 0,25 sont indiquées en caractères gras. Les valeurs d'hétérozygoties attendues et observées ainsi que l'écart aux conditions d'équilibre de Hardy Weinberg (*Fis*) et un test de significativité, avec hypothèse nulle $Fis = 0$, sont donnés par population dans le tableau V.

Tableau V. Hétérozygoties moyennes attendues (*Hnb*) et observées (*Ho*); écart type (\pm); calcul de *Fis* aux locus amylase et oIKK ; probabilité associée au test de significativité

Population	<i>Hnb</i>	<i>Ho</i>	Valeur de <i>Fis</i>		
			Amylase	oIKK	Amylase + oIKK
RIB	0,61 \pm 0,05	0,37 \pm 0,05	0,308***	0,487***	0,400***
ORI	0,53 \pm 0,06	0,38 \pm 0,05	0,295**	0,274**	0,280***
ISL	0,52 \pm 0,19	0,24 \pm 0,07	0,502**	0,565***	0,540***
CAS	0,65 \pm 0,02	0,33 \pm 0,04	0,440***	0,558***	0,500***
VIC	0,54 \pm 0,03	0,31 \pm 0,06	0,335***	0,537***	0,440***
BOU	0,51 \pm 0,18	0,33 \pm 0,04	0,217*	0,443***	0,360***
SEU	0,64 \pm 0,08	0,26 \pm 0,17	0,449***	0,757***	0,590***
TAR	0,57 \pm 0,09	0,38 \pm 0,16	0,004	0,577***	0,320***
MIR	0,36 \pm 0,24	0,19 \pm 0,02	-0,064	0,679***	0,490***

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, pas d'indication : $p > 0,05$

Toutes les populations ont un taux d'hétérozygotie observé inférieur à celui calculé sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy et Weinberg. Le test statistique sur le déficit en hétérozygotes réalisé avec le calcul de F_{is} selon la méthode de Weir et Cockerham (1984) met en évidence des valeurs extrêmement fortes. Les F_{is} pour les deux locus réunis sont comprises entre 0,590 (SEU) et 0,280 (ORI). En calculant les F_{is} par locus, on observe les mêmes résultats au locus oIKK avec un déficit en hétérozygotes significatif pour l'ensemble des populations et des valeurs comprises entre 0,274 (ORI) et 0,757 (SEU). Par contre, les résultats sont plus nuancés pour le locus amylase avec deux F_{is} non significativement différents de zéro pour TAR et MIR et une valeur négative pour MIR indiquant un excès en hétérozygotes. Le calcul du F_{st} , indice de fixation qui indique le niveau de structuration des populations est en moyenne de 0,035 par paire de populations avec des valeurs allant de 0 à 0,176. Cependant, ces valeurs doivent être biaisées par des F_{is} trop importants et ne sont donc pas informatives. Les valeurs obtenues seront discutées dans la partie 4.

Dans la suite de l'étude nous avons voulu comparer les informations apportées par les marqueurs amylase et oIKK et celles obtenues avec un marqueur conçu spécialement pour l'étude de deux ces taxons.

3.2.2. Marqueur nucléaire anonyme, DALP 233

Ce marqueur a été étudié sur les deux populations de référence SEU et MIR afin d'avoir des éléments de comparaison avec les résultats obtenus sur les autres marqueurs. Sur les deux paires d'amorces testées, seule DALP233 a été utilisée. Les premières amplifications ont permis de faire la mise au point des conditions expérimentales précisées en annexes 6 et 7. Le couple d'amorces DALP235 n'a donné aucun résultat d'amplification. Deux des raisons pouvant expliquer cette absence d'amplification sont soit des conditions de PCR trop sélectives, soit la séquence récupérée sur le gel d'acrylamide et utilisée pour faire les amorces n'était pas assez conservée pour permettre l'accrochage des amorces. Aucun essai supplémentaire n'a été fait avec ces amorces.

La diversité génétique estimée par le nombre moyen d'allèles au locus DALP233 est de 7,5 allèles par population. Leur répartition est représentée sur la figure 6.

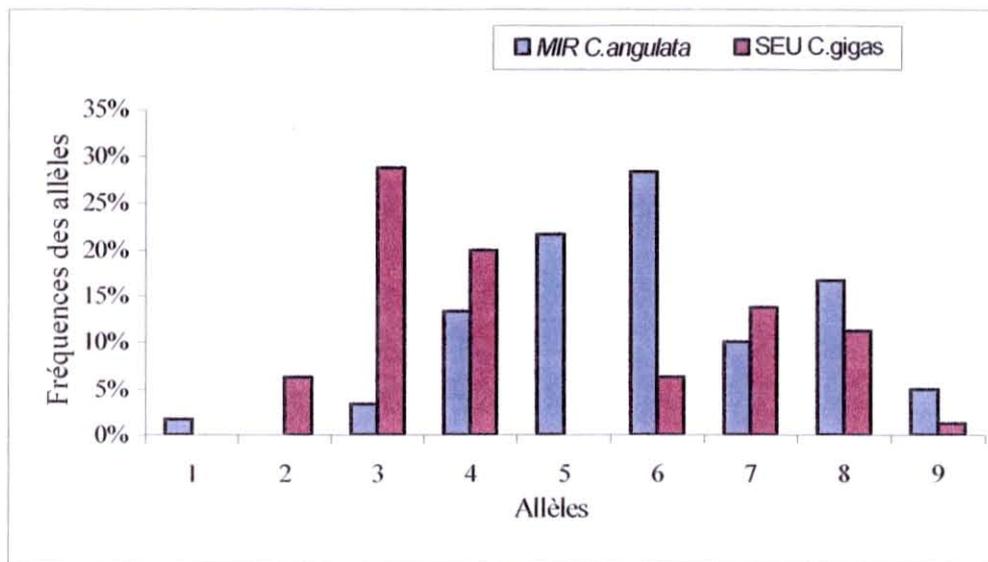


Figure 6. Fréquences alléliques au locus DALP233 dans les populations SEU (N = 46) et MIR (N =30)

Dans les deux populations testées, l'allèle 4 est spécifique de *C. angulata* mais tous les autres sont présents dans les deux taxons.

Les hétérozygoties attendues et observées sont respectivement 0,83 et 0,42 pour SEU et 0,82 et 0,43 pour MIR. Le calcul du *F_{is}* montre un écart à l'équilibre de Hardy et Weinberg significatif égal à 0,49 pour SEU et à 0,48 pour MIR et un *F_{st}* faible mais également significatif de 0,055.

3.3. INSERTION DANS UNE SEQUENCE MICROSATELLITE, MARQUEUR NUCLEAIRE CG44R

Les individus des populations MIR et SEU, dont on connaît le taxon, sur la base de l'analyse mitochondriale, ont servi à la mise au point des conditions expérimentales et à vérifier s'il y avait ou non spécificité du marqueur CG44R.

Les individus "témoins" ont confirmé l'existence d'une relation entre le génotype au marqueur CG44R et le taxon défini par le marqueur mitochondrial. Trois phénotypes sont observés sur gel d'agarose : NC pour "non coupé", il correspond à une bande haute de 250 à 350 pb, C pour "coupé" représenté par deux bandes basses d'environ 175 pb (correspondant à la coupure du fragment par l'enzyme *Bsr*GI) et enfin "NC/C" car le marqueur étant codominant, les individus hétérozygotes présentent une bande haute et une bande basse. Les trois génotypes sont visibles sur la figure 7, photo sous rayons UV du résultat d'une migration en gel d'agarose (pendant 30 min à 150V) après digestion par *Bsr*GI. La longueur de la séquence microsatellite amplifiée peut varier dans un intervalle de 86 pb, ces différences de taille sont visibles en gel d'agarose, notamment pour les allèles "NC".

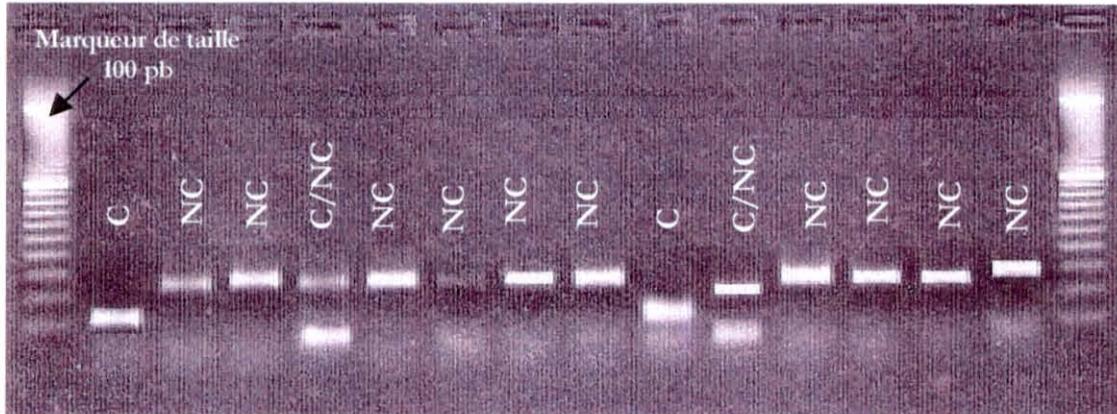


Figure 7. Photo de gel d'agarose après migration de fragments amplifiés de CG44R et digestion par *BsrGI*.

Cinq populations définies comme pures, *C. gigas* ou *C. angulata*, au locus mitochondrial, et deux en mélange ont alors été étudiées. La répartition des fréquences alléliques est représentée sur la figure 8 pour chaque population.

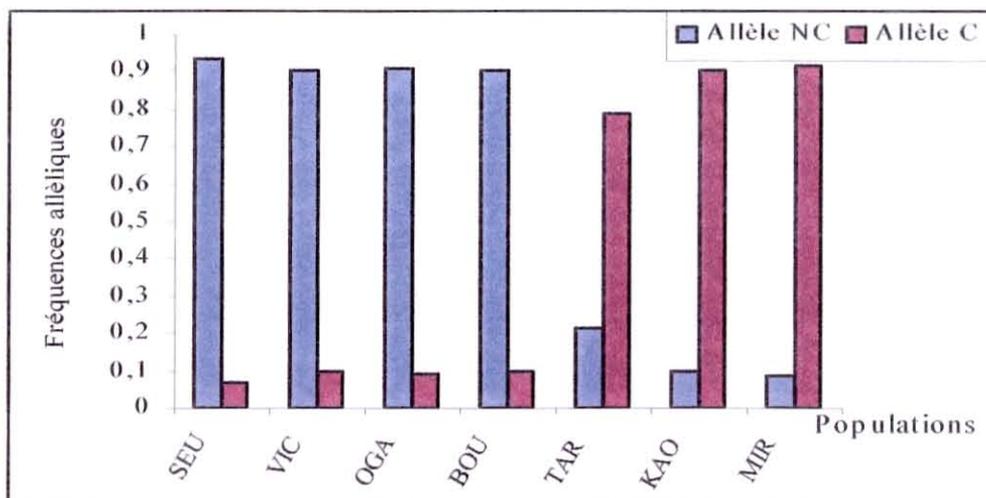


Figure 8. Diagramme populations / fréquences alléliques au locus CG44R

Les populations VIC, SEU, BOU et OGA sont composées à 90% d'allèles NC et à 10% d'allèles C et la répartition est inversée pour les populations MIR et KAO. La seule population dont les fréquences alléliques varient est TAR avec 21% pour l'allèle C et 79% pour l'allèle NC. C'est aussi la seule en mélange non négligeable au locus COI.

L'insertion CG44R se trouvant juste en amont de la séquence microsatellite CG44, un calcul de déséquilibre de liaison a été estimé entre ces deux marqueurs (CG44 et CG44R) sur cinq populations. Dans ce cas, le déséquilibre de liaison calculé n'est pas physique mais génétique. Ainsi, deux allèles physiquement liés peuvent devenir génétiquement indépendants si le taux de recombinaison entre les deux est important. Le taux de recombinaison entre deux

allèles liés augmente avec le nombre de générations, c'est-à-dire avec le nombre de méioses. Le tableau VI résume les valeurs obtenues.

Tableau VI. Coefficients de corrélation associés aux tests de déséquilibre de liaison entre les allèles de CG44 et CG44R

Population	SEU	OGA	BOU	MIR	KAO
Déséquilibre de liaison	0,16	0,16*	0,14	0,21*	0,15

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

Les valeurs des coefficients de corrélation sont faibles et significatives seulement pour deux populations. La valeur calculée pour l'ensemble des populations est 0,12. Elle n'est pas significativement différente de zéro. On ne peut donc pas conclure à l'existence d'un déséquilibre de liaison entre les allèles de la séquence microsatellite et les allèles de l'insertion. Comme pour les autres marqueurs, les taux d'hétérozygotie (H_o et H_{nb}), l'écart des populations à l'équilibre de Hardy et Weinberg (F_{is}) ont été calculés et un test de significativité a été réalisé. Les valeurs sont répertoriées dans le tableau VII.

Tableau VII. Hétérozygoties moyennes observées (H_o) et attendues (H_{nb}) par population et indice F_{is} au locus CG44R

Population	H_o	H_{nb}	F_{is}
VIC	0.17	0.19	0.141
SEU	0.10	0.19	0.452*
OGA	0.16	0.25	0.380**
BOU	0.14	0.17	0.184
TAR	0.30	0.34	0.116
MIR	0.17	0.16	-0.074
KAO	0.22	0.20	-0.114

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

Les valeurs de F_{is} observées sont en moyenne plus faibles que pour les autres marqueurs nucléaires et seulement deux populations présentent des valeurs significativement différentes de zéro.

4. DISCUSSION

Les études sur le polymorphisme enzymatique, sur les allozymes ou de caryotype réalisées sur *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* ne mettent pas en évidence de différences significatives entre les deux taxons. Les marqueurs nucléaires, amylase, oIKK et DALP233, utilisés au cours de cette étude, montrent une faible différenciation entre les différentes populations échantillonnées. Des flux de gènes naturels ou créés par les activités ostréicoles pourraient être à l'origine de la faible différenciation observée. Cependant, l'homogénéité révélée par les marqueurs pourrait aussi être due à une absence de signal dans les régions du génome étudiées. Les résultats obtenus avec le marqueur mitochondrial spécifique COI sont, à priori, contradictoires avec les précédents car ils mettent en évidence une forte structuration des populations. Le marqueur pseudo-spécifique nucléaire, CG44R, fournit des résultats concordants avec l'analyse mitochondriale et ils permettent d'étudier les phénomènes d'hybridation entre les deux taxons. Ainsi, seuls les marqueurs des régions génomiques présentant une divergence entre *C. gigas* et *C. angulata* permettent de mettre en évidence une structuration des populations. Les autres marqueurs ne révèlent aucun signal. L'analyse des résultats obtenus avec les deux marqueurs spécifiques ont permis de formuler des hypothèse concernant l'histoire des populations européennes.

4.1. STRUCTURATION GENETIQUE DES POPULATIONS DE *C. GIGAS* ET DE *C. ANGULATA*

La variation génétique entre les différentes populations européennes échantillonnées a été étudiée par des marqueurs introniques polymorphes, amylase et oIKK et par le marqueur anonyme DALP233. Le polymorphisme auquel on s'intéresse est par conséquent un polymorphisme supposé neutre suivant la théorie de Kimura, c'est-à-dire que les locus ayant des mutations silencieuses ne sont pas sélectionnés et qu'ils évoluent sous l'influence de la dérive. Les valeurs moyennes de F_{st} observées (F_{st} (amylase, oIKK) = 0,035 et (DALP233) = 0,055) ne mettent pas en évidence une structuration génétique significative entre les différentes populations. Ces résultats sont concordants avec les études faites sur des marqueurs microsatellites hypervariables (Huvet *et al*, soumis) et sur des locus enzymatiques (Mattiucci et Villani, 1983 et Moraga, 1989). L'observation de cette homogénéité génétique entre des populations distantes au minimum de 70 km (entre VIC et CAS en linéaire côtier) et au maximum de 2000 km (entre SEU et TAR) pourrait être expliquée par des flux géniques entre les différentes populations européennes.

L'existence d'un flux génique implique des événements de migration des huîtres d'une population à l'autre. Deux types de flux peuvent être envisagés (Ozaki et Fujio, 1985). Le premier est un flux génique naturel entre les populations et le second est un flux génique artificiel créé par le transport d'huîtres creuses d'une région ostréicole à l'autre. La dispersion se fait par les gamètes et les larves dans le premier cas et par des individus adultes dans le second. La capacité de dispersion des larves de mollusques est très importante (Cameron, 1986 et Butman, 1987), elle peut dépasser la centaine de kilomètres. Ces deux hypothèses sont valables pour les populations françaises et espagnoles car la disposition des populations échantillonnées est régulière et la distance maximale entre deux populations est de 225 km (entre Seudre et Vieux Boucau). Par contre, l'existence d'un flux génique entre les populations du nord de l'Espagne et du sud du Portugal est peu envisageable. En effet, une zone qui s'étend de La Corogne (pointe nord est de l'Espagne) jusqu'à Porto (ouest du Portugal) est dépourvue d'huîtres creuses et il semble peu probable que les larves passent cette zone sans jamais s'y établir. De plus, la distance entre Vicedo et Rio Mira, supérieure à 800 km est à la limite de la capacité migratoire, connue, des larves. Des phénomènes hydrodynamiques ou écologiques pourraient être à l'origine de cette absence d'huître. Ainsi, des courantstidaux ou de surface empêchent peut-être l'installation des larves dans cette zone ou le substrat pourrait ne pas convenir à la fixation des larves. Cette dernière explication est peu satisfaisante car des huîtres plates (*Ostrea edulis*) ainsi que des moules (*Mytilus edulis*) sont présentes dans cette région. Les conditions écologiques ne semblent donc pas défavorables à l'installation des bivalves. En résumé, s'il existe actuellement un flux génique entre le nord de l'Espagne et le sud du Portugal, il n'est pas naturel. Un troisième cas de figure envisageable pour expliquer l'homogénéité des populations est un flux de gènes ancestral, en Asie, antérieur à l'importation des huîtres creuses en Europe (Grizel, 1996). Introduites en Europe, ces huîtres auraient ensuite formé des populations isolées. Nous pouvons penser que la dérive qui s'est opérée depuis est trop faible pour que la divergence créée entre les populations soit mise en évidence par les marqueurs moléculaires utilisés.

Outre la faible différenciation génétique révélée par ces marqueurs, nous observons de forts déficits en hétérozygotes pour l'ensemble des échantillons. Les déficits en hétérozygotes sont couramment observés dans les populations de bivalves marins (Zouros et Foltz, 1984). Pourtant, ce phénomène paraît étonnant quand on considère les caractéristiques biologiques et écologiques de ces animaux. En effet, l'importance des effectifs des populations, le grand nombre de gamètes et de zygotes produits, ainsi que l'existence de formes de dispersion gamétiques et larvaires sont autant de propriétés qui pourraient permettre de remplir les

conditions nécessaires pour parvenir à l'équilibre de Hardy et Weinberg. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces observations. Tout d'abord, nous pouvons envisager l'existence d'un effet Wahlund (mélange de populations de fréquences alléliques différentes) mais dans ce cas, les valeurs moyennes de F_{is} ($F_{is} = 0,43$) seraient proches des valeurs moyennes de F_{st} ($F_{st} = 0,035$) or, elles sont plus de dix fois supérieures. L'effet Wahlund ne doit donc pas jouer un rôle majeur dans cette situation. Nous pouvons également envisager des phénomènes de consanguinité mais les déficits en hétérozygotes seraient alors aussi importants pour tous les locus. Or, ils sont beaucoup plus faibles, voire inexistant, pour le locus CG44R. L'existence d'allèles nuls ou non visibles (Pemberton *et al.*, 1995) pourrait expliquer une partie du déficit en hétérozygotes. Les allèles nuls sont générés soit par des mutations dans les séquences des régions homologues aux amorces de PCR, soit par des artefacts expérimentaux. On peut aussi émettre l'hypothèse d'une liaison génétique du marqueur avec les exons des gènes proches qui seraient sélectionnés mais il est rare que les hétérozygotes soient contre sélectionnés. Ces valeurs de F_{is} anormalement élevées peuvent introduire un biais dans les calculs de F_{st} .

Cette première série de marqueurs ne révèle pas de signal interpopulations car les populations ont trop peu divergé depuis leur séparation malgré leur isolement géographique. Etant donné la similitude génétique entre *C. gigas* et *C. angulata*, seuls des marqueurs spécifiques nucléaires permettent d'étudier la composition taxonomique intrapopulation et de révéler la présence d'hybrides.

4.2. HYBRIDATION NATURELLE ENTRE *C. GIGAS* ET *C. ANGULATA*

L'une des principales questions que nous nous sommes posées sur les populations européennes d'huîtres creuses de l'espèce *Crassostrea gigas* concerne les phénomènes d'hybridation entre les deux sous-espèces *C. gigas* et *C. angulata*. Les deux populations de références Seudre (SEU) et Rio Mira (MIR) ont une composition haplotypique pure, toujours déterminée par l'analyse mitochondriale. En effet, tous les individus provenant de la Seudre appartiennent au taxon *C. gigas* et tous ceux récoltés à Rio Mira au taxon *C. angulata*. Leur répartition géographique correspond respectivement aux limites nord et sud de la zone d'échantillonnage. Ainsi, il était intéressant d'étudier la composition des populations géographiquement intermédiaires. Nous pouvions nous attendre à observer des mélanges entre les deux taxons. Des études menées sur les moules révèlent la présence de zones d'hybridation

en patchs entre *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* le long des côtes françaises (Cousteau *et al.*, 1991).

Les résultats obtenus avec le marqueur mitochondrial COI sont forts différents de ceux envisagés par l'analyse des marqueurs nucléaires précédents. En effet, ils indiquent qu'à l'exception de Tavira (TAR) qui est en mélange conséquent ; de Ribadessella et de Vieux Boucau qui montrent des "traces" de mélange, le reste des échantillons n'ont que des haplotypes associés à *C. gigas*. Cette absence de mélange est inattendue étant donné les capacités de dispersion des mollusques évoquées dans la partie précédente, avec des phases de dispersion larvaires importantes. De plus, *C. angulata*, l'huître portugaise était présente au sud de l'Europe dès le 16^{ème} siècle et il est surprenant de ne pas en trouver davantage en Espagne alors qu'elle est présente au Portugal.

Les fréquences haplotypiques calculées montrent des "traces" de *C. angulata* au travers des haplotypes "A" dans la population espagnole de Ribadessella (RIB) et dans la population basque de Vieux Boucau (BOU) aux fréquences respectives de 0,04 et 0,06. Nous pouvons nous demander si l'absence des haplotypes associés à *C. angulata* dans les autres populations est réellement due à leur absence dans le milieu naturel ou si c'est un biais causé par un effectif d'échantillonnage trop faible pour mettre en évidence la présence sporadique de ces allèles. Dans les deux cas, ces résultats sont en accord avec l'absence de flux génique actuel entre le sud du Portugal et le nord de l'Espagne car s'il existait, les individus *C. angulata* seraient plus nombreux au nord de l'Espagne. Par contre, ils semblent révéler l'existence d'un polymorphisme ancestral. Les quelques individus ayant des haplotypes associés à *C. angulata* indiquent que cette sous-espèce était présente dans le passé.

Dans l'interprétation des résultats, nous devons souligner le fait que nous travaillons sur un marqueur mitochondrial aux propriétés particulières. En effet, le génome mitochondrial est haploïde, sa transmission est maternelle et il ne recombine pas (Boursot et Bonhomme, 1986). Pour toutes ces raisons, sa taille effective est réduite par rapport à celle du génome nucléaire, ce qui le rend plus sensible aux phénomènes de dérive génétique, de goulot d'étranglement ou de mutation. Ces propriétés font de ce locus mitochondrial un bon outil de comparaison entre deux taxons proches. Mais du fait de l'haploïdie, il ne permet pas d'étudier les phénomènes d'hybridation. Ainsi, si l'analyse du génome cytoplasmique met en évidence la coexistence des deux sous-espèces dans trois des sept populations étudiées, il ne permet pas de savoir s'il existe de l'hybridation dans ces populations en mélange. Seule l'étude du génome nucléaire permettrait de répondre à cette question.

L'analyse faite par la suite avec le nouveau marqueur pseudo-spécifique CG44R met en évidence le même schéma taxonomique que celui obtenu précédemment, à savoir une séparation nette entre les populations décrites comme *C. gigas* ou *C. angulata* par le marqueur COI. On parle de marqueur pseudo-spécifique car les populations définies comme pures *C. gigas* au niveau mitochondrial ont des fréquences alléliques de 0,9 pour l'allèle "NC" et 0,1 pour l'allèle "C" et les populations définies comme pures *C. angulata* au niveau mitochondrial ont des fréquences alléliques inverses, à savoir 0,1 pour l'allèle "NC" et 0,9 pour l'allèle "C". Comme pour le marqueur mitochondrial, la population de Tavira a des fréquences alléliques intermédiaires entre les deux distributions décrites ci-dessus. Ces fréquences sont 0,25 pour l'allèle "NC" et 0,75 pour l'allèle "C". Ainsi, les analyses du génome mitochondrial et celle du génome nucléaire sont concordantes et indiquent qu'il existe une seule population réellement en mélange parmi les neuf échantillonnées en Europe. Ces données permettent de conclure à des phénomènes d'hybridation et plus seulement à de la sympatrie car ils mettent en évidence la présence d'individus hétérozygotes *C. gigas* / *C. angulata*. Avant l'introduction de *C. gigas*, *C. angulata* était le taxon majoritairement présent au Portugal. Depuis quelques années, une activité ostréicole se développe dans la région de Tavira. L'hybridation observée dans ce site est certainement le résultat de la mise en présence des *C. gigas* de culture avec les *C. angulata* déjà présentes dans cette zone. Ainsi, des croisements ont lieu entre les deux taxons lorsqu'ils sont mis en contact. D'autres populations échantillonnées se trouvent près de zones ostréicoles comme Castropol (CAS) ou Seudre (SEU) mais dans ces cas là, l'activité est plus ancienne qu'au sud Portugal et le taxon *C. angulata* semble être absent de ces populations. L'omniprésence actuelle des individus *C. gigas* dans presque toutes les populations échantillonnées doit être mise en relation avec l'importance de l'activité ostréicole. Il ne faut pas perdre de vue que les huîtres *C. gigas*, à la base des cultures, ont été introduites du Japon à partir de 1971 (Grizel et Héral, 1991) et que ce sont aussi ces huîtres que l'on retrouve dans les populations étudiées. *C. angulata* est présente depuis plus longtemps en Europe mais c'est aussi une espèce introduite. Le terme populations naturelles n'est donc pas approprié ici, il serait préférable d'employer le terme semi-naturelles ou pseudo-naturelles ou encore naturalisées. Une des hypothèses qui pourrait expliquer la dominance des *C. gigas* dans les populations serait un phénomène de fertilisation préférentielle par les individus *C. gigas*, par rapport à *C. angulata*. Des études menées sur des embryons (Huvet *et al.*, soumis) révèlent une contribution plus importante que celle attendue des mâles *C. gigas*, pour la fécondation des femelles *C. angulata*. Ajouté à cela sa rusticité et son fort potentiel biologique, *C. gigas* semble réunir des caractères qui pourraient en faire une espèce proliférante. Tavira serait alors dans une situation

intermédiaire entre la phase initiale du début de la colonisation de la population *C. angulata* par des individus *C. gigas* et la dominance totale de ces dernières entraînant la disparition des *C. angulata* dans les populations

Pour comprendre la situation actuelle des populations européennes nous pouvons émettre des hypothèses sur l'évolution du marqueur CG44R.

4.3. HYPOTHESES SUR L'EVOLUTION DU MARQUEUR CG44R

Nous supposons que l'insertion de la séquence CG44R, en amont du microsatellite CG44, est un événement unique qui s'est produit dans un seul taxon. La mutation se serait produite chez un individu *C. angulata* car 90% des individus définis comme *C. angulata*, au niveau mitochondrial, portent l'allèle "C". La constance dans les fréquences alléliques, 0,1 et 0,9 pour toutes les populations définies comme pures par le marqueur COI est surprenante. Ces résultats suggèrent plusieurs hypothèses. Pour expliquer que les deux allèles soient présents dans toutes les populations, il faut envisager l'existence d'un mélange. Cependant, s'il existait un flux génique actuellement en Europe, nous pouvons penser que le mélange des allèles serait plus important, comme c'est le cas pour Tavira. De plus, il serait révélé par le marqueur COI, excepté si ce flux est trop faible pour être mis en évidence. Mais cette dernière hypothèse est peu probable étant donné les caractéristiques biologiques des huîtres. Nous pouvons envisager l'existence d'un flux génique ancestral, antérieur à l'introduction des huîtres en Europe. Cette idée est soutenue par l'analyse du locus CG44R dans deux populations asiatiques. Les fréquences des allèles "C" et "NC" sont respectivement 0,9 et 0,1 pour KAO (Taiwan) une population pure *C. angulata* (au locus mitochondrial) et 0,1 et 0,9 pour OGA (Japon) pure *C. gigas*. La répartition des allèles en fonction du taxon est donc la même pour les populations européennes et pour les populations asiatiques. A partir de ces données, nous pouvons établir un scénario retraçant l'histoire des marqueurs mitochondrial (COI) et nucléaire (CG44R). Partons de l'époque de l'existence d'un ancêtre commun à *C. gigas* et *C. angulata*, juste avant la divergence. Des études ont estimé la divergence entre *C. gigas* et *C. sikamea*, deux espèces proches, au pliocène il y a 2 millions d'années (Banks *et al.*, 1994). De plus, nous savons que *C. gigas* est génétiquement plus proche de *C. angulata* que de *C. sikamea* (Gaffney et Allen, 1993). La divergence entre nos deux sous-espèces a été estimée entre un à deux millions d'années (ÓFoighil *et al.*, 1998). Une glaciation au pléistocène aurait entraîné une régression des océans autour du Japon et la formation de ponts de terre infranchissables par les organismes marins (Durham, 1963). Ces événements géologiques ont généré la cladogenèse de nombreuses

espèces par isolement géographique (Majima, 1989). Cet isolement aurait pu avoir pour conséquence la divergence mitochondriale et nucléaire (mutation dans la séquence microsatellite) entre *C. gigas* et *C. angulata*. Lors de la fonte des glaces, les deux sous-espèces auraient pu être remises en contact. Des flux de gènes, établis sur une courte durée, auraient alors permis un faible mélange des deux taxons, ce qui expliquerait les fréquences alléliques 0,1 et 0,9 au locus CG44R. Pour que ces fréquences se soient maintenues au cours du temps nous pouvons imaginer une seconde séparation géographique "peu" de temps après la remise en contact. Les traces du mélange au niveau mitochondrial auraient disparu sous l'action de la dérive alors qu'elles seraient encore présentes dans une fraction du génome nucléaire. La dérive du génome mitochondrial est plus rapide car la taille effective des "populations mitochondriales" est plus petite. Les populations européennes ayant été constituées à partir d'huîtres importées du Japon, les proportions de 0,1 d'allèles "C" dans les populations *C. gigas* et "0,1" d'allèle NC dans les populations *C. angulata* ont été conservées, d'une part par absence de flux génique et d'autre part parce que le temps écoulé depuis l'introduction de ces huîtres en Europe est trop court pour que les effets de la dérive soient visibles.

L'analyse du marqueur CG44R peut nous fournir d'autres indications sur les événements moléculaires qui ont eu lieu à ce locus. Le calcul du déséquilibre de liaison entre le microsatellite CG44 et l'insertion CG44R, située juste en amont, ne montre pas de déséquilibre de liaison entre les deux locus. Ce résultat pourrait être interprété en terme de temps écoulé depuis l'apparition de l'insertion. Ceci reviendrait à dater approximativement cette mutation. En effet, plus le nombre de générations passées depuis l'événement de mutation est grand plus la probabilité de recombinaison entre les locus est grande et plus le déséquilibre de liaison diminue. Cependant, une condition nécessaire pour réaliser cette datation est de pouvoir estimer les vitesses relatives d'évolution des deux locus. La séquence microsatellite hypervariable évolue beaucoup plus rapidement que l'insertion. Ces données permettront peut être de donner une estimation de l'époque de la divergence entre les deux taxons *C. gigas* et *C. angulata* pour cette partie du génome.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La situation actuelle de la répartition des deux sous-espèces d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*, en Europe, établie par cette étude, est la suivante : des phénomènes d'hybridation naturelle entre les deux taxons ont été mis en évidence au Portugal, dans la région de Tavira. Ainsi, l'hybridation naturelle entre *C. gigas* et *C. angulata* existe le long des côtes européennes. Cependant, elle n'est présente que dans les régions où les activités humaines ont mis les deux taxons en contact. En France et en Espagne, les populations échantillonnées ne sont constituées que par le taxon *C. gigas*, excepté 3 individus *C. angulata* sur 357 analysés et la différenciation génétique observée est très faible.

Les huîtres *C. gigas* se sont largement répandues en Europe depuis leur introduction à partir de 1971. Au vu des résultats de cette étude, nous nous interrogeons sur la pérennité de la sous-espèce *C. angulata*.

- ✓ Ce taxon ne risque-t-il pas de disparaître d'Europe ? Il serait intéressant d'établir un suivi des populations européennes afin de connaître l'évolution des deux sous-espèces dans les zones déjà échantillonnées, en considérant les importations grandissantes de *C. gigas* dans le sud de l'Europe.
- ✓ De plus, ne faudrait-il pas développer des programmes de conservation de souches pour des espèces telle *C. angulata* dont la survie semble aujourd'hui menacée ?

A la suite de cette étude, il serait intéressant de réaliser une étude équivalente en Asie. *C. gigas* étant présente au Japon et *C. angulata* à Taiwan. Un site qu'il faudrait prospecter est la côte des îles Ryû-Kyû situées entre le Japon et Taiwan. Si les deux sous-espèces étaient présentes sur ces îles, ce serait un site idéal pour l'étude de l'hybridation naturelle entre *C. gigas* et *C. angulata*. Des connaissances sur la situation actuelle dans cette région permettraient aussi de retracer l'évolution des deux taxons.

Le marqueur CG44R, découvert au cours de cette étude, a constitué un outil moléculaire puissant pour l'étude de l'hybridation entre les deux taxons. Il nous a aussi permis de trouver des indications concernant l'histoire évolutive de l'espèce *Crassostrea gigas* en faisant un lien entre les populations européennes et asiatiques. L'une des perspectives de ce travail serait d'étudier le marqueur CG44R chez des espèces d'huîtres creuses phylogénétiquement proches de *C. gigas*, comme par exemple *C. sikamea*. Ces analyses constitueraient des données supplémentaires pour l'étude de l'évolution de ces espèces.

BIBLIOGRAPHIE

- Banks M.A., McGoldrick D.J., Borgeson W. et Hedgecock D.(1994). Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C.sikamea*. *Marine Biology*, 121 : 127 - 135
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L. et Bonhomme F. (1996). Genetix, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, Université de Montpellier II
- Black W.C. et Krafur E.S (1985). A FORTRAN program for the calculation and analysis of two-locus linkage disequilibrium coefficients. *Theoretical and Applied Genetics*, 70 : 491 - 496
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. et Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*, 32 : 314 - 331.
- Boudry P., Heurtebise S., Collet B., Cornette F. et Gérard A. (1998). Genetic differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226 : 279-291
- Boursot P. et Bonhomme F. (1986). Génétique et évolution du génome mitochondrial des métazoaires. *Genetic Selfish Evolution*, 18 : 73 -98
- Buroker N.E., Hershberger W.K. et Chew K.K. (1979). Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine biology*, 54 : 157-169
- Buroker N.E., Hershberger W.K. et Chew K.K. (1979). Populations genetics of the family Ostreidae. II. Intraspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Marine biology*, 54 : 171-184
- Butman C.A. (1987). Larval settlement of soft sediment invertebrates : the spatial scales of patterns explained by active habitat selection and the emerging role of hydrodynamic processes. *Oceanography Marine Biology Annual Revue*. 25 : 113 - 165
- Cameron R.A. (1986). Introduction to the invertebrate larval biology workshop : a brief background. *Bull. Mar. Sci.*, 32 : 145 - 161
- Comps M. (1970). La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. *Revue des travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 34 : 23-44
- Comps M. (1972). Observations sur la résistance d'huîtres du genre *Crassostrea* au cours de la mortalité massive de 1970-1971 dans le bassin de Marennes Oléron. *ICES CM*, 22 pages.
- Cousteau C., Renaud F. et Delay B. (1991). Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. *Marine Biology*, 111 : 87-93
- Desmarais E., Lanneluc I. et Lagnel J. (1998). Direct amplification of length polymorphism (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*, 26 : 1458-1465

- Durham J.W. (1963). Paleogeographic conclusions in light of biological data. *Proc. of Pacific scientific congress*, 10 : 355 - 365
- Escoubas J.M., Briant L., Montagnani C., Hez S., Devaux C. et Roch P. (1999). Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Letters*, 453 : 293-298
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. et Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase c subunit from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5) : 294 – 299
- Gaffney P.M. et Allen S.K. Jr. (1993). Hybridisation among *Crassostrea* species : a review. *Aquaculture*, 116 : 1-3
- Grizel H. (1996). Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 15 : 401 – 408
- Grizel H. et Heral H. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil International pour l'Exploitation de la Mer*, 47 : 399-403
- Huvet A. (1997). Différenciation génétique de deux huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* : apport des marqueurs microsatellites. Rapport de DEA. 25 pages.
- Huvet A., Lapègue S., Magoulas A. et Boudry P. (2000). Mitochondrial and nuclear phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. Soumis à *Conservation genetics*
- Huvet A., Baladaud K., Bierne N. et Boudry P. (2000). Microsatellite analysis of 6-hour embryos reveals no preferential fertilization between two cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. Soumis à *Marine Biotechnologies*
- Leitão A., Boudry P. Labat J.P. et Thiriou-Quévieux C. (1999). Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia*, 41(1) : 175 - 186
- Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V. et Zouros E. (1998). Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics*, 29 : 63 – 72
- Majima R. (1989). Cenozoic fossil naticidae (Mollusca : Gasteropoda) in Japan. *Bulletin Americain de Paléontologie*, 96 : 1-159
- Mathers N.F., Wilkins N.P. et Walne P.R. (1974). Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2 : 453-456
- Mattiucci S. et Villani F. (1983). Studio elettroforico dei sistemi gene-enzima in ostriche classificate come *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca : Ostreidae). *Parasitologia*, 25 : 21-27
- Menzel R.W. (1974). Portuguese and Japanese Oysters are the same species. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31 : 453-456
- Moal J., Daniel J.Y., Sellos D., Van Wormhoudt A., et Samain J.F. (2000). Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. *Journal of Comparative Physiology B*, 170 : 21-26
- Moraga D., Osada M., Lucas A. et Nomura T (1989). Génétique biochimique de populations de *Crassostrea gigas* (côte atlantique) et au Japon (Miyagi). *Aquatic living resources*, 2 : 135 134

- Ófoighil D., Gaffney PM., Wilbur AE. et Hilbish TJ. (1998). Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Marine Biology*, 131 : 497-503
- Ozaki O. and Fujio H. (1985). Genetic Differentiation in Geographical Populations of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku. Journal of Agriculture research*, 36 : 49 – 61
- Pemberton J.M., Slate J., Bancroft D.R. et Barrett J.A. (1995). Non-amplifying alleles at microsatellite loci : a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4 : 249 - 252
- Ranson G.(1948). Ecologie et répartition géographique des Ostréidés vivants. *Revue de Science*, 86 : 469 - 473
- Stenzel H.B. (1971). Oysters. *In Treatise on invertebrate paleontology* (K.C. Moore, ed.), Geological Society of America Inc. and the University of Kansas, Boulder, Colorado
- Weir B. et Cockerham CC. (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 : 1358 - 1370
- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15 : 323 – 354
- Zouros E. et Foltz D.W. (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia*, 25 : 583 – 591
- Zouros E. et Foltz DW. (1984). Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oysters populations. *Developmental genetics* 4 : 393 – 405

ANNEXES

- ANNEXE 1** CLASSIFICATION TAXONOMIQUE DES ORGANISMES ETUDIES
- ANNEXE 2** PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'EXTRACTION D'ADN AU PHENOL/CHLOROFORME
- ANNEXE 3** COMPOSITION DES TAMPONS ET DES REACTIFS
- ANNEXE 4** PRINCIPE DE LA REACTION DE PCR
- ANNEXE 5** DONNEES GENERALES SUR LES MARQUEURS
- ANNEXE 6** CYCLES D'AMPLIFICATION PCR
- ANNEXE 7** PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE PCR
- ANNEXE 8** MIGRATIONS EN GELS D'AGAROSE ET DE POLYACRYLAMIDE
- ANNEXE 9** PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE PCR PAR MARQUAGE RADIOACTIF
- ANNEXE 10** DONNEES SUR LES ENZYMES DE RESTRICTION

ANNEXE 1 - CLASSIFICATION TAXONOMIQUE DES ORGANISMES ETUDIES

→ Embranchement : Mollusques

→ Classe : Bivalves lamellibranches

→ Sous-classe : Filibranches

→ Ordre : Pterioida

→ Famille : Ostreidea

→ Genre : *Crassostrea*

→ Espèce : *gigas*

→ Sous espèces : Japonaise : *gigas*

Portugaise : *angulata*

Noms complets :

Huître creuse japonaise : *Crassostrea gigas gigas*

Huître creuse portugaise : *Crassostrea gigas angulata*

Dans le texte, les sous-espèces sont désignées par *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*.

ANNEXE 2 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL D'EXTRACTION D'ADN AU PHENOL/CHLOROFORME

Première étape : lyse des cellules

Mettre dans un tube eppendorf :

- ✓ Un fragment de branchie
- ✓ 400 µl de tampon d'extraction
- ✓ 10 µl de protéase K (10 µM)

Placer à 55°C pendant 4 heures minimum

Deuxième étape : déprotéinisation

Ajouter 500 µl de phénol (pH 8), homogénéiser

Centrifuger 10 minutes à 10000 tours.min⁻¹ à 4°C

Prélever le surnageant

Ajouter 500µl de chloroforme pour retirer les traces de phénol, homogénéiser

Centrifuger 10 minutes à 10000 tours.min⁻¹ à 4°C

Prélever le surnageant

Troisième étape : précipitation des acides nucléiques

Ajouter 500µl d'éthanol pur, homogénéiser

Placer à -20°C pendant deux heures minimum

Centrifuger 10 minutes à 12000 tours.min⁻¹ 4°C

Retirer l'éthanol et conserver le culot

Ajouter 500µl d'éthanol 70°

Centrifuger 5 minutes à 8000 tours.min⁻¹ à 4°C

Vider l'éthanol et faire sécher le culot

Quatrième étape : conservation de l'ADN

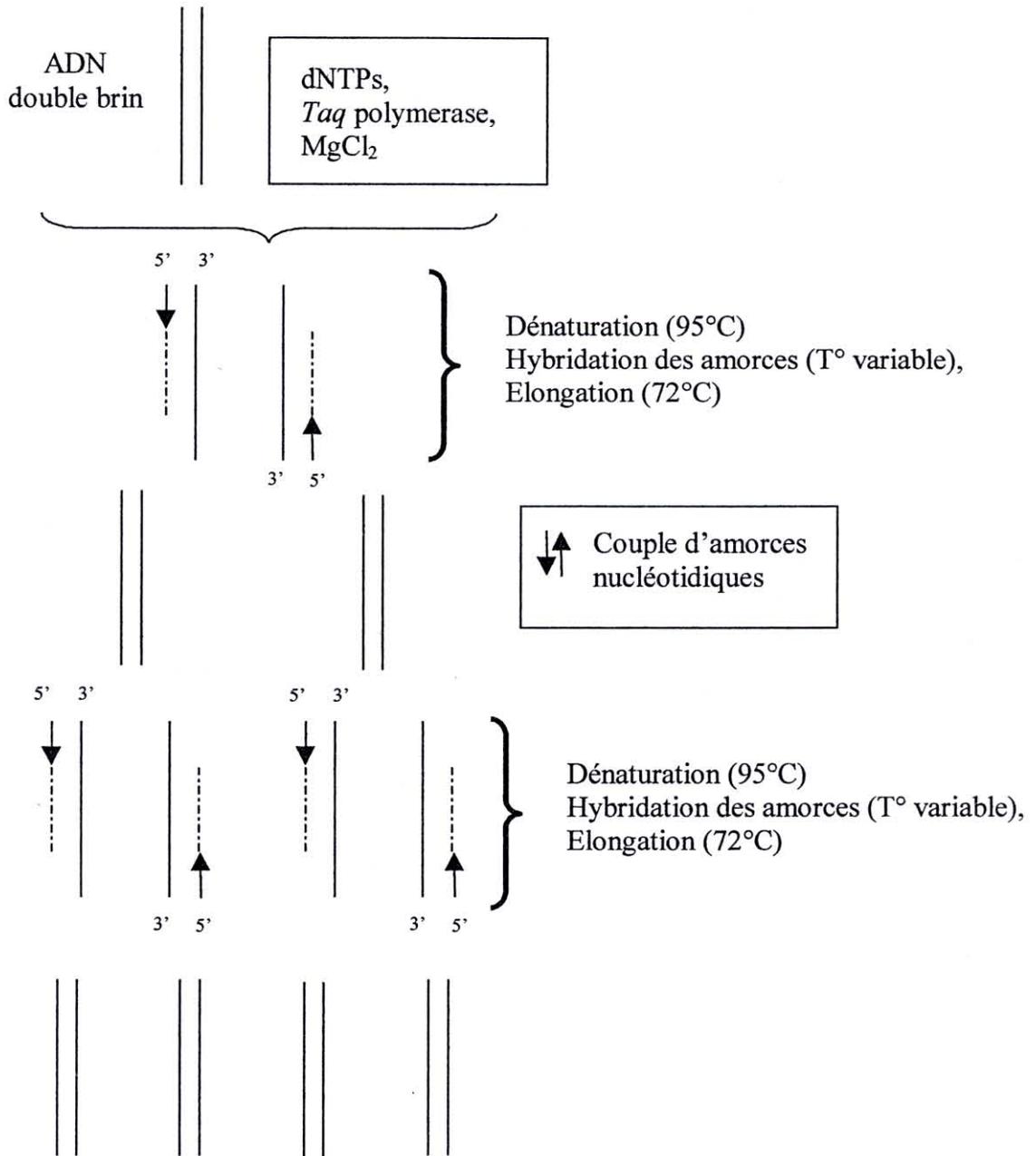
Reprendre le culot dans 75µl de TE 1 :10

Conserver au réfrigérateur pour une utilisation à court terme ou à -20 °C pour une conservation prolongée.

ANNÉXE 3 - COMPOSITION DES TAMPONS ET DES REACTIFS

Tampon d'extraction:	1,5g Tris 2,93g EDTA 5g SDS H ₂ O qsp 250ml
Tampon TE 1 : 10 :	500µl Tris HCl (Tris HCl 10mM, pH 7,4) 100µl EDTA (EDTA 20mM, 0,5 M) H ₂ O qsp 50ml
Ladder 100 pb :	20µl gel loading buffer 6X 24 µl super ladder-mid 1(200 ng.µl ⁻¹) 76µl H ₂ O qsp 120µl
TBE 10X pH 8,8 ::	162g Tris 27,5g Acide borique 50ml EDTA 0,5M H ₂ O qsp 1 litre
Tampon de charge :	24µl ladder 100 bp à 200ng.µl ⁻¹ H ₂ O qsp 120µl
APS liquide :	1g APS 10ml d'eau distillée
Acrylamide liquide 6% :	210g urée 75ml Acrylogel 50ml TBE 10X H ₂ O qsp 500ml Solution à conserver à 4°C
Gel d'acrylamide :	70ml acrylamide liquide 6% 360µl APS 70µl TEMED

ANNEXE 4 - PRINCIPE DE LA REACTION DE PCR



Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation des amorces sont répétées sur trente cycles grâce à un thermocycleur où chaque phase est programmée.

ANNEXE 5 - DONNEES GENERALES SUR LES MARQUEURS

Marqueur	Amorce	Séquence	Longueur de la séquence	Pourcentage de CG	Longueur du fragment amplifié
COI	HCO	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT C	25 pb	36 %	710 pb
	LCO	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	25 pb	32%	
Amylase	bH	TGA GGG GGT CCC ATC CAG C	19 pb	68 %	≅ 720 pb
	AMY 4bis BB	TGG CTG AGG ACC TGG GGG GAC C	22 pb	72,7 %	
oIKK	D9T3	TTT GTG GAG GTA CTC TAC AGC	21 pb	47,6 %	620 pb
	D9AP10	CAG CCA GAG CAG AGA GGT G	19 pb	63,2 %	
DALP233	DALP233Q1	TGC CTC GGA AGT ATC AGG TG	20 pb	55 %	≅ 420 pb
	DALP233Q2	CAT ATT CGA GCA TGG TAT CCG	21 pb	47,6 %	
CG 44R	CG44 S	GAA GAA TGT CAT AGA TTG ATG G	22 pb	36,4 %	260 -350 pb
	CG44 AS	CAT GCC TGT TTA CCA GTA TTC	21 pb	42,9 %	

ANNEXE 6 - PROGRAMMES DES CYCLES D'AMPLIFICATION

Etape	COI	Amylase*	OIKK*	DALP 233*	CG 44R
1 - Dénaturation	2 min. à 95°C	1 min. à 95°C	1 min. à 95°C	1 min. à 95°C	2 min. à 95°C
2 - Dénaturation	1 min. à 95°C	30 sec à 95°C	30 sec à 95°C	30 sec à 95°C	1 min. à 95°C
3 - Hybridation	1 min. à 50 °C	30 sec à 56 °C	30 sec à 51 °C	30 sec à 52 °C	1 min. à 57 °C
4 - Elongation	1 min. à 72°C	30 sec à 72°C	30 sec à 72°C	30 sec à 72°C	1 min. à 72°C
5 - Etapes 2,3 et 4	30 cycles				
6 - Elongation finale	7 min. à 72°C	7 min. à 72°C	7 min. à 72°C	5 min. à 72°C	5 min. à 72°C

Le sigle "*" signifie que les amorces de PCR sont marquées radioactivement.

ANNEXE 7 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE PCR

Produits	Nom du locus amplifié			
	COI		CG 44R	
	Volume en μl	Concentration finale	Volume en μl	Concentration finale
Tampon 10 X	5	1X	2	1 X
dNTP 20 μM	5	2 μM	2	2 μM
MgCl ₂ 50 mM	1,5	1,5 mM	1,2	3 mM
Amorce 1 20 μM	1	0,4 μM	0,28	0,28 μM
Amorce 2 20 μM	1	0,4 μM	0,28	0,28 μM
Taq Polymérase 5U. μl^{-1}	0,35	0,035 U	0,07	0,0175 U
ADN 5%	2	0,2 %	2	0,5 %
Eau bidistillée	34,15		12,17	
Volume total	50		20	

Les volumes indiqués dans le tableau correspondent au traitement d'un échantillon. Le protocole expérimental est donné ci dessous :

✓ Dans un tube eppendorf de 1,5 μl mettre tous les composants indiqués dans le tableau sauf la *taq* polymérase qui est thermosensible et l'ADN. Les quantités de chaque composant sont fonction du nombre d'échantillons. Le tube doit être maintenu dans de la glace afin d'éviter la dégradation des produits.

✓ Déposer l'ADN à l'aide d'une propipette dans des microtubes de 0,2 μl adaptés au thermocycleur. Changer le cône de la pipette entre deux dépôts pour éviter les contaminations.

✓ Dans le tube Eppendorf contenant les autres composants, rajouter la quantité adéquate de *Taq* polymérase.

✓ Mettre 48 μl de mélange, ou mix, dans chaque microtube puis déposer les tubes dans le thermocycleur préalablement programmé.

ANNEXE 8 – MIGRATION EN GEL D'AGAROSE ET DE POLYACRYLAMIDE

✓ GEL D'AGAROSE

L'agarose en poudre est dilué dans du tampon TAE 1X (1g pour 100 ml de tampon). Mettre à chauffer au micro-onde. La solution doit être translucide sans résidu d'agarose.

Ajouter du BET (SIGMA CHIMICAL CO, USA) (5 µl pour 100 ml) d'agarose liquide (tampon et agarose) ; Il permettra de visualiser les ADN après migration en passant le gel sous rayons Ultra Violets (BIOBLOCK SCIENTIFIC).

Verser l'agarose dilué dans la cuve (SIGMA) où les peignes qui formeront les puits ont été disposés. La cuve est reliée à un générateur (APELEX). Une fois que le gel est solidifié, déposer les ADN dans les puits après les avoir alourdis avec du tampon de charge.

Faire migrer environ 30 min entre 90 V et 150 V suivant la taille de la cuve utilisée.

✓ GEL DE POLYACRYLAMIDE

Préparation du gel

Préparer deux plaques en verre. L'une doit être recouverte de silicone (Sigmacote, SIGMA) pour faciliter le démoulage du gel par la suite. Les mettre l'une sur l'autre en les séparant avec des espaceurs de 0,4 mm, maintenus par des pinces.

Préparer dans une éprouvette : 70 ml d'acryl liquide (Acrylogel 5, BDH, England) à 6 %, 350 µl d'APS et 70µl de TEMED (Tétraméthyl Etylenediamine, SGMA). Verser dans un "biberon". Homogénéiser.

Couler le gel en promenant le biberon à la limite des deux plaques en évitant les bulles, placer les peignes à l'envers pour former un front rectiligne.

Laisser le gel polymériser une heure minimum. Ensuite, enlever les puits et les remettre à l'endroit en les enfonçant d'environ 1 mm dans le gel. Retirer les pinces.

Migration

Mettre la plaque verticalement dans une cuve (Model S2, GIBCO BRL Sequencing system), fermer la vanne de vidange et mettre 1000 ml de tampon TAE 0,5 X répartie entre les réservoirs inférieur et supérieur de la cuve.

Déposer 3,7 ml de produits PCR par puits après avoir rajouter du bleu de charge.

Brancher la cuve au générateur. La migration se fait à 55W, 1900 V. Le temps de migration est variable, entre 4 heures et 8 heures, suivant la taille des fragments que l'on veut visualiser.

Demoulage

Après migration, démouler le gel en enlevant la plaque recouverte de silicone et déposer sur le gel un papier WATMAN de même taille. Le décoller de l'autre plaque. Recouvrir d'un film plastique et le mettre à sécher sous vide à 80 °C pendant une heure.

Révélation

Ensuite, enlever le film plastique et le mettre dans une cassette (Monote Cassette, SPECTROLINE, USA) en le recouvrant d'un film photographique (film Biomax, Kodak). Cette manipulation se passe en chambre noire sous lumière rouge. Laisser impressionner pendant 8 heures environ.

Révèler le film comme pour une photo classique. Tremper 3 min. dans un bain de révélateur. Rincer. Tremper 3 min. dans le fixateur. Rincer à l'eau et laisser sécher pendant une heure.

ANNEXE 9 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE PCR RADIOACTIVE

Préparer un mix comme pour une PCR classique mais sans l'amorce marquée avec les proportions indiquées dans le tableau suivant. Les quantités sont indiquées pour un échantillon.

Produits	Nom du locus amplifié			
	Amylase et oIKK		DALP 233	
	Volume en μl	Concentration finale	Volume en μl	Concentration finale
Tampon 10 X	2	1 X	2	1 X
dNTP 20 μM	2	2 μM	1	1 μM
MgCl ₂ 50 mM	1,2	3 mM	0,72	1,8 mM
Amorce non marquée 10 μM	0,4	0,2 μM	0,5	0,25 μM
Amorce marquée * 10 μM	1	0,5 μM	1	0,5 μM
Taq Polymérase 5U. μl^{-1}	0,1	0,025 U	0,1	0,025 U
ADN	4	1 %	2	0,5 %
Eau bidistillée	9,3		12,68	
Volume total	20 μl		20 μl	

- * Marquage de l'amorce :

Préparer un mix avec les proportions décrites dans le tableau ci-dessous sans le P33.

Produits	Amylase et oIKK	DALP 233
	Volume en μl	
Tampon kinase 10 X	0,1	0,1
Amorce 10 μM	0,23	0,3
kinase	0,06	0,06
P33	0,1	0,1
Eau qsp 1 μl	0,51	0,44

Dans une salle aménagée pour manipuler la radioactivité, ajouter la quantité de P33 nécessaire puis mettre le tube au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes.

ANNEXE 10 - DONNEES SUR LES ENZYMES DE RESTRICTION

Enzyme	Site de restriction	Température d'action
<i>Taq</i> I	5'...T↓CGA...3' 3'...AGC↑T...5'	65°C
<i>Sau3A</i> I	5'...↓GATC...3' 3'...CTAG↑...5'	37°C
<i>Hha</i> I	5'...GCG↓C...3' 3'...C↑GCG...5'	37°C
<i>True9</i> I ou <i>Mse</i> I	5'...T↓TAA...3' 3'...AAT↑T...5'	65°C
<i>Bsr</i> GI	5'...T↓GTACA...3' 3'...ACATG↑T...5'	37°C

Les symboles « ↓ » et « ↑ » indiquent le site où l'enzyme coupe la séquence.

	Volume en µl	
	<i>Taq</i> I, <i>Sau3A</i> I, <i>Hha</i> I, <i>True9</i> I	<i>Bsr</i> GI
Produit PCR	10	10
Tampon	2	2
Eau	7,5	7,3
Enzyme	0,5	0,7
Total	20 µl	