

64655
OUR M61
E400 ar. UER.P .

Université de La Rochelle.

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADÉ

Maîtrise de Biologie des populations et des écosystèmes, mention environnement.

2000

PHYLOGEOGRAPHIE DES HUÎTRES CREUSES DES
MANGROVES DE L'ATLANTIQUE SUD PAR L'APPORT
DES MARQUEURS MOLECULAIRES.



VERDON Béatrice.

Stage effectué au laboratoire Génétique et Pathologie de la Tremblade.

IFREMER.

B.P. 133. Ronce les bains.

17390 La Tremblade.

Responsable de laboratoire : A. GERARD.

Responsables de stage : S. LAPEGUE, P. BOUDRY et P. GARCIA-MEUNIER.

SOMMAIRE :

1.INTRODUCTION :.....	2
2.MATERIEL ET METHODES :.....	5
2.1.Prélèvement des échantillons.....	5
2.2.Electrophorèse.....	6
2.3.Extraction de l'ADN.....	6
2.4.Amplification des fragments à étudier.....	7
2.5.Détection du polymorphisme :	8
2.5.1.polymorphisme de longueur : PCR-RFLP.....	8
2.5.2.polymorphisme de conformation : PCR-SSCP.....	9
3.RESULTATS ET DISCUSSION :.....	10
3.1.Confirmation de la présence de <i>C. gasar</i> en Amérique du sud:.....	10
3.2.Mise au point de nouveaux marqueurs :	11
3.2.1.Optimisation des dilutions des ADN extraits.....	11
3.2.2.Amplification avec des amorces nucléaires.....	12
3.2.3.Mise au point de la température d'hybridation des amorces ITS.....	13
3.2.4.Mise au point du protocole de SSCP :	13
3-3.Etude de l'ITS :.....	14
3.3.1.PCR.....	14
3.3.2.PCR-RFLP.....	15
3.3.3.PCR-SSCP.	16
4.CONCLUSION :.....	17
5.REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	20
ANNEXES :.....	23

1. INTRODUCTION :

Les huîtres sont des invertébrés marins de l'embranchement des Mollusques et de la classe des Bivalves. Elles possèdent une très large répartition géographique, en effet, elles sont présentes sur presque toutes les côtes tempérées et tropicales du monde où elles peuvent faire l'objet d'une culture intensive. Les huîtres creuses du genre *Crassostrea* sont peut-être les plus connues, mais les espèces qui les constituent sont difficiles à différencier.

Les espèces marines semblent présenter un degré de différenciation géographique plus faible que les espèces animales des milieux continentaux (Hedgecock, 1994 ; Ward et al., 1994). Ce phénomène est généralement expliqué par la nature ouverte des océans, par les tailles énormes des populations d'un grand nombre de ces espèces, ainsi que par leur fort potentiel dispersif, souvent lié à une phase larvaire planctonique.

De plus, la description de ces espèces est difficile à interpréter du fait de la plasticité de la coquille et de la morphologie interne de ces animaux (Gunter, 1954). En effet, les caractères externes ne suffisent pas toujours à distinguer les espèces les unes des autres car l'aspect de la coquille est fortement influencé par le milieu. Des individus d'une même espèce peuvent avoir des apparences très différentes selon les conditions du milieu dans lequel les huîtres vivent et en fonction de leur âge. (Seed, 1968).

La répartition géographique, longtemps utilisée comme critère distinctif et descriptif des espèces, n'est à présent plus une référence suffisante, notamment du fait de l'introduction d'espèces étrangères par l'ostréiculture (Littlewood, 1994). Par ailleurs, il est parfois possible d'obtenir des hybrides viables lors de croisements entre individus de différentes espèces (Allen et Gaffney, 1993 ; Boudry et al. 1999). Ceci rend encore plus difficile la définition de l'espèce face au flux génique.

Face à ces difficultés taxonomiques, l'étude génétique des espèces peut donner des informations indispensables à la clarification de la systématique des huîtres (Hedgecock et al., 1999).

L'étude des populations d'huîtres creuses de l'Atlantique Sud et notamment celles conservées au laboratoire de génétique et pathologie de la Tremblade, peut apporter un début de réponse quant à leur classification dans telle ou telle espèce et par extension sur la phylogéographie de ces huîtres dans l'Atlantique Sud.

Il semblait, à priori, que dans cette région les côtes de l'Amérique du Sud (Guyane, Martinique, Brésil) étaient occupées par *Crassostrea rhizophorae*, espèce vivants dans les mangroves fortement influencée par la mer et semblant remplacer *Crassostrea virginica* des côtes de l'Amérique du Nord (Rodriguez-Romero et al., 1979b ; Rodriguez Romero et Garca Montes de Oca, 1998 ; Littlewood, 1994 ; Ladron de Guevara et al., 1996). Cependant un autre auteur (Singarajah, 1980) décrit dans ces régions quatre espèces : *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) ; *C. sp.* ; *C. paraibanensis* et *C. rhizophorae* (Guilding 1828). Mais, cet auteur considère comme une seule et même espèce *C. brasiliiana* et *C. rhizophorae*. Néanmoins, des études plus récentes effectuées sur des allozymes montrent que *C. brasiliiana* et *C. rhizophorae* seraient des espèces biologiques distinctes (Ignacio et al., 2000).

De nombreuses recherches, en génétique notamment, ont été effectuées sur le groupe *C. virginica* – *C. rhizophorae* en raison de l'importance économique de *C. virginica*. (Littlewood, 1994 ; O'Foighil et al., 1995).

Les côtes de l'Afrique de l'Ouest sont elles peuplées par *C. gasar* (Adanson, 1757). Cette espèce est également inféodée aux mangroves. Elles commencent à faire l'objet d'une aquaculture notamment au Sénégal (Gilles, 1991). Il apparaît que cette espèce semble supporter des variations importantes du milieu en particulier de la salinité (Ajana, 1976 ; Gilles, 1991). Cependant les recherches sont encore peu développées en Afrique en ce qui concerne la génétique de cette espèce.

Au sein du génome, il existe de très nombreux polymorphismes moléculaires : la même information génétique peut-être codée de plusieurs façons au niveau nucléotidique. Chaque forme d'une même information génétique est appelée allèle. Les différents allèles sont utilisés comme marqueurs génétiques, car ils sont répétables grâce à leur spécificité de séquence. Les marqueurs génétiques permettent entre autre une cartographie des génomes, la localisation de gènes défectueux ou d'intérêt, l'analyse des flux de gènes entre les populations etc (Desmarais et al., 1995).

Les marqueurs moléculaires permettent une approche très fine de la phylogéographie. L'étude de ces marqueurs ouvre de nouveaux axes de recherches en taxonomie. L'analyse de séquences de fragments d'ADN permet de distinguer des espèces d'huîtres très proches. (Burocker et al., 1979; Banks et al., 1993; O'Foighil et al., 1998).

L'étude des marqueurs génétiques permet d'intégrer, en plus, l'information historique de la structuration des populations. Il existe plusieurs types de marqueurs, avec différentes propriétés, qui permettent de répondre à des questions biologiques évolutives à des échelles différentes.

Le génome mitochondrial est un ADN cytoplasmique, de petite taille, et sa forme est très conservée d'un embranchement à l'autre. Son contenu en gènes est très modeste et présente peu ou pas de forme non codante le rendant moins exposé aux forces évolutives, telle que la sélection.

Les RFLP (Analyse de polymorphisme de fragments de restriction) de l'ADN mitochondrial est typiquement une bonne technique pour l'étude de la divergence génétique entre les population à large aire géographique, ce qui est le cas des huîtres. (Avisé et al., 1987 ; Seutin et al., 1993). Cependant, la transmission exclusivement maternelle et non recombinant de l'ADN mitochondrial, ainsi que son comportement haploïde (Boursot et Bonhomme, 1986) lui confère une sensibilité accrue à la dérive (Moritz et al., 1987). Ceci lui confère également un taux d'évolution spécialement élevé (de 1 à 10 fois plus rapide que le taux globale de génome nucléaire) (Avisé et al., 1987).

L'étude de fragments d'ADN mitochondrial 16S, amplifié par PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) (Mullis, 1983), digérés par des enzymes de restriction (PCR-RFLP) permet de visualiser les mutations touchant les sites de restrictions qui permettent de déterminer l'appartenance des populations à telle ou telle espèces. Ainsi, des populations d'Amérique du Sud ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Crassostrea gasar*, alors que celle-ci n'y avait jamais été décrite. (Boutet, 1999).

L'ADN nucléaire peut également apporter des informations importantes dans la structuration des populations.

L'ADN ribosomal est une classe d'ADN nucléaire (sous unités 5.8S et 18S) et mitochondrial (16S) répétitif apparaissant en tandem et codant pour l'ARN ribosomal.

Beaucoup de ces séquences sont conservées à travers les taxons, tandis que d'autres régions sont assez variables (ITS: Internal Transcribed Spacer). Parmi les régions variables il existe notamment les introns ou régions entre gènes qui ne sont pas soumis aux forces de l'évolution pouvant ainsi accumuler les mutations influençant le niveau de polymorphisme dans et entre les populations. Le taux de substitution de cette partie du génome étant l'un des plus élevés après celui de l'ADN mitochondrial (Li et al., 1985), ces molécules sont très utilisées dans la détermination des relations phylogéographiques, soit dérivées anciennement soit plus récemment (Hillis et Dixon, 1991).

Il est donc très intéressant de rechercher des marqueurs nucléaires polymorphes. Les régions étudiées se situent au niveau d'introns de gènes et d'ITS. Ces marqueurs permettraient d'étudier le flux de gènes qui peut éventuellement exister dans les régions où les espèces sont en sympatrie. Ils permettraient donc l'étude du polymorphisme intra et inter-spécifique et donnent ainsi une idée de la divergence entre les espèces.

A ce stade du travail, le but est de chercher s'il existe des différences entre les populations de *Crassostrea gasar* d'Afrique et d'Amérique. Pour détecter du polymorphisme intra spécifique, les marqueurs 16S ne sont pas assez variables. C'est pourquoi il était intéressant de rechercher des marqueurs nucléaires plus polymorphes que les marqueurs mitochondriaux afin d'essayer de différencier les populations d'Afriques de celles d'Amériques.

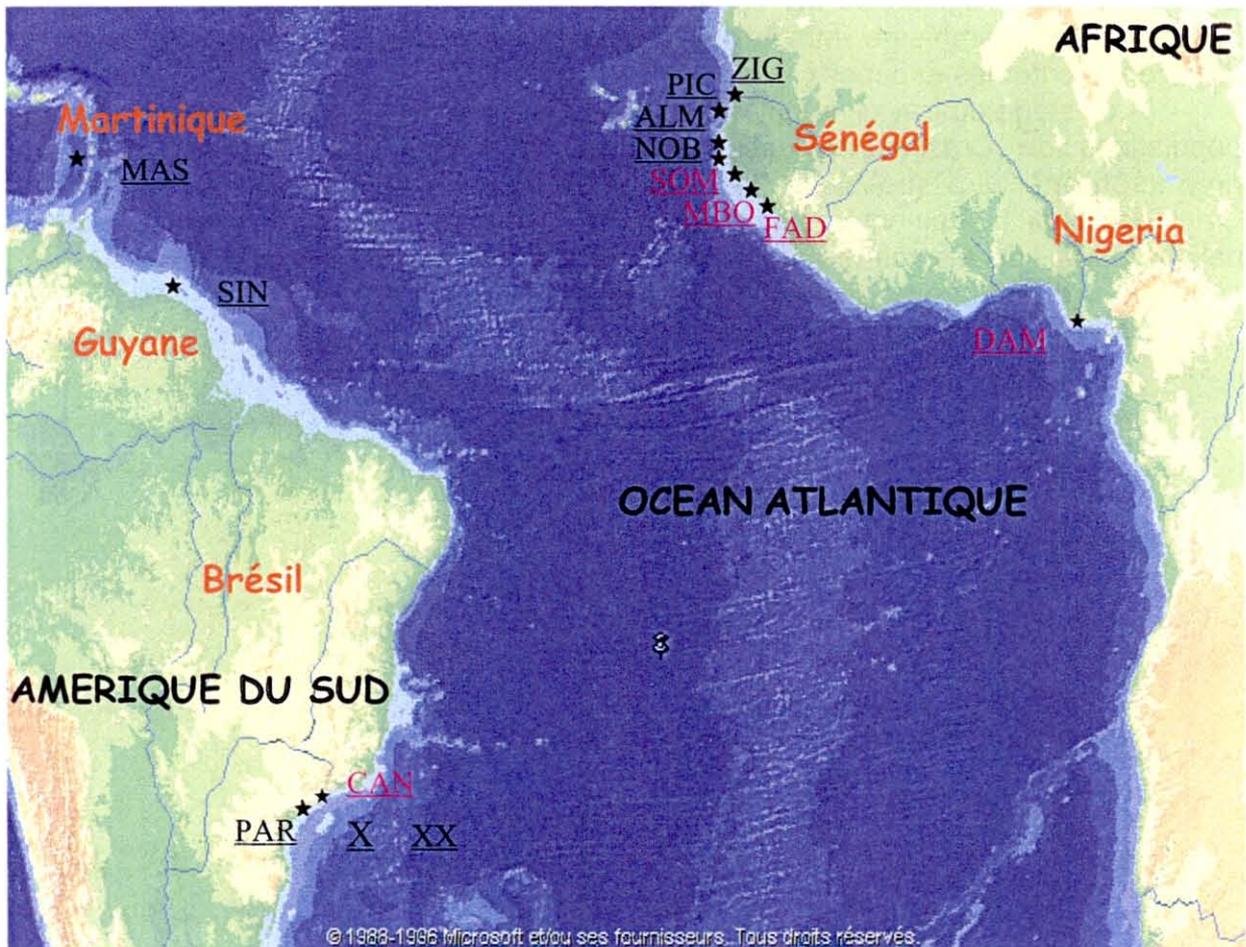


Figure 2.1 : Localisation des populations étudiées

En noir sont indiquées les populations étudiées en 1999 (Boutet).

En rouge sont présentées les nouvelles populations étudiées.

2. MATERIEL ET METHODES :

Pour toutes les études de phylogéographie des populations par les marqueurs génétiques, il est nécessaire de passer par différentes étapes afin de détecter du polymorphisme. Il faut, en premier lieu, extraire l'ADN des différents individus à notre disposition. Puis pour obtenir une quantité suffisante des fragments d'ADN intéressants les extraits sont amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avec différentes amorces. Ces produits de PCR peuvent ensuite révéler du polymorphisme de longueur par migration sur gel d'acrylamide ou être soumis à des digestions enzymatiques (RFLP) afin de détecter du polymorphisme de fragments de restriction ou enfin être dénaturés avant de migrer sur un gel de polyacrylamide (SSCP) pour détecter du polymorphisme de conformation.

2-1. Prélèvement des échantillons :

Les prélèvements sont réalisés par biopsie sur des animaux vivants du conservatoire, anesthésiés par une solution de $MgCl_2$ (Annexe 1). Dans d'autres cas les échantillons sont envoyés de l'étranger dans de l'alcool absolu.

Dans tous les cas les échantillons sont soumis à l'extraction.

La liste des sites de prélèvement et des noms des populations sont présentés en tableau 2.1.

Population	Espèce supposée	Lieu de prélèvement
DAM	<i>C. gasar</i>	Nigeria - Delta du Niger.
CAN	<i>C. rhizophorae</i>	Brésil - Cananéia.
SOM	<i>C. gasar</i>	Sénégal - Somone. (Mangrove).
FAD	<i>C. gasar</i>	Sénégal –Joal-Fadiout. Sine Saloum. (mangrove)
MBO	<i>C. gasar</i>	Sénégal.-Lagune de M'Bodiene (sous M'Bour) (mangrove)
ALM	<i>C. gasar</i>	Sénégal - Pointe des Almadies.
XX	<i>C. rhizophorae</i>	Brésil - Baie de Paranagua. (Palétuvier).
MAS	<i>C. rhizophorae</i>	Martinique – Massy-Massy
SIN	<i>C. gasar</i>	Brésil – Baie de Paranagua. Palétuvier

Tableau 2.1 : les populations, leur l'espèce présumée et leur lieu de prélèvement.

En bleu sont indiquées les nouvelles populations.

En noir sont présentées les populations précédemment étudiées.

La carte 2.1 indique les lieux de prélèvement des différentes populations.

Les différentes techniques utilisées dans cette étude vont maintenant être détaillées.

2-2. Electrophorèse :

L'électrophorèse est utilisée pour vérifier certaines étapes des protocoles et pour visualiser le polymorphisme.

Cette technique est basée sur la possibilité de faire se migrer des molécules biochimiques sous l'action d'un champ électrique. Les acides nucléiques portent des charges négatives et seront donc attirés par le pôle positif du champ. Il faut également ajouter un tamis sur la route de l'ADN afin de pouvoir séparer, différencier les différents fragments.

Plus la molécule sera grosse, plus elle sera retenue par les « obstacles » qu'elle rencontre. Il en résulte ainsi un tri des molécules en fonction de leur taille.

L'électrophorèse nécessite la fabrication d'un gel d'agarose ou de polyacrylamide (composition en annexe 1 et 2) qui comporte des puits dans lesquels les échantillons seront déposés. Un courant de voltage constant, dans un tampon de migration, est ensuite appliqué pour entraîner la migration de l'ADN. Le bromure d'éthidium (BET) permet la visualisation des fragments d'ADN en s'intercalant dans la double hélice d'ADN. Il est ensuite révélé par les UV.

2-3. Extraction de l'ADN :

L'ADN est extrait par la méthode dite du « phénol chloroforme » (Desmarais et al., 1995).

Cette technique d'extraction des acides nucléiques se déroule en trois étapes (protocole en annexe 3) :

-dissociation des tissus et destruction des membranes cellulaires par l'action pendant une nuit à 55°C :

~ de la protéinase K qui dégrade la partie protéique des échantillons par rupture des liaisons esters entre les acides aminés.

~ du tampon d'extraction contenant : du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) qui est un détergent ionique se fixant uniformément sur les protéines et les dénaturant en les chargeant négativement, de l'EDTA qui est un agent chélateur complexant les ions Ca^{2+} indispensable à la cohésion cellulaire (composition du tampon en annexe 3).

-extraction au phénol - chloroforme :

~ au tampon d'extraction est ajouté du phénol qui est un déprotéinisant puissant. La phase aqueuse, contenant les acides nucléiques, est prélevée après centrifugation.

~ à ce surnageant est ajouté du chloroforme isoamylique afin d'éliminer les traces de phénol résiduelles.

-lavage par précipitation des ADN :

~à la phase aqueuse prélevée après centrifugation du mélange contenant le chloroforme est ajouté de l'éthanol 100° à une température de -20°C, ce qui permet la précipitation des ADNs pendant 2 à 3 h.

~une nouvelle centrifugation permet de se débarrasser des produits ayant servi à l'extraction. Un rinçage avec de l'éthanol 70° est réalisé, avant de sécher les culots.

~l'ADN est enfin solubilisé dans du TE (Tris-EDTA) 10 :1 (composition du TE en annexe 3).

Cette technique permet donc d'obtenir un mélange d'ADN et d'ARN. Mais lors de la PCR, seul l'ADN sera amplifié car la Taq polymérase est une enzyme ADN dépendante.

2-4. Amplification des zones étudiées par PCR (Réaction de polymérisation en chaîne).

La PCR (Saïki et al.,1985) est une technique qui permet de sélectionner, d'isoler et d'amplifier *in vitro* une partie choisie d'ADN, et d'en obtenir une quantité suffisante pour permettre l'application d'autres techniques.

Cette technique a permis d'alléger certains protocoles de biologie moléculaire, en rendant possible son utilisation dans un grand nombre de problématiques de biologie des populations (Bonhomme et al., 1995).

La PCR est basée sur les caractéristiques du processus de réplication. En effet, elle consiste à effectuer de multiples réplifications de l'ADN à l'aide de deux amorces (séquences en annexe 4) d'orientation opposée, et complémentaires des extrémités des séquences à amplifier. Le nombre de copies croît de manière exponentielle avec le nombre de cycle.

Cette technique se décompose en trois étapes :

-La dénaturation : l'ADN à amplifier doit se trouver sous forme monocaténaire. Ceci nécessite donc une phase de dénaturation de la double hélice à 95°C. cette dénaturation permettra, dans l'étape suivante, l'appariement des amorces avec les séquences spécifiques de l'ADN simple brin.

-L'hybridation des amorces ou "annealing" :c'est durant cette phase que, suivant la complémentarité des bases, les amorces se fixent spécifiquement à la matrice. Cet appariement a lieu à des températures situées entre 40°C et 60°C. Il faut préciser que plus la température est élevée dans cet intervalle plus l'hybridation est spécifique.

-L'élongation : une enzyme, la Taq polymérase ADN dépendante thermorésistante, extraite et purifiée à partir d'une Bactérie thermophile ,*Thermus aquaticus*, (Larzul, 1993), permet la néosynthèse à partir des extrémités 3'-OH des amorces. L'élongation se fait dans la zone optimale de température de cette enzyme

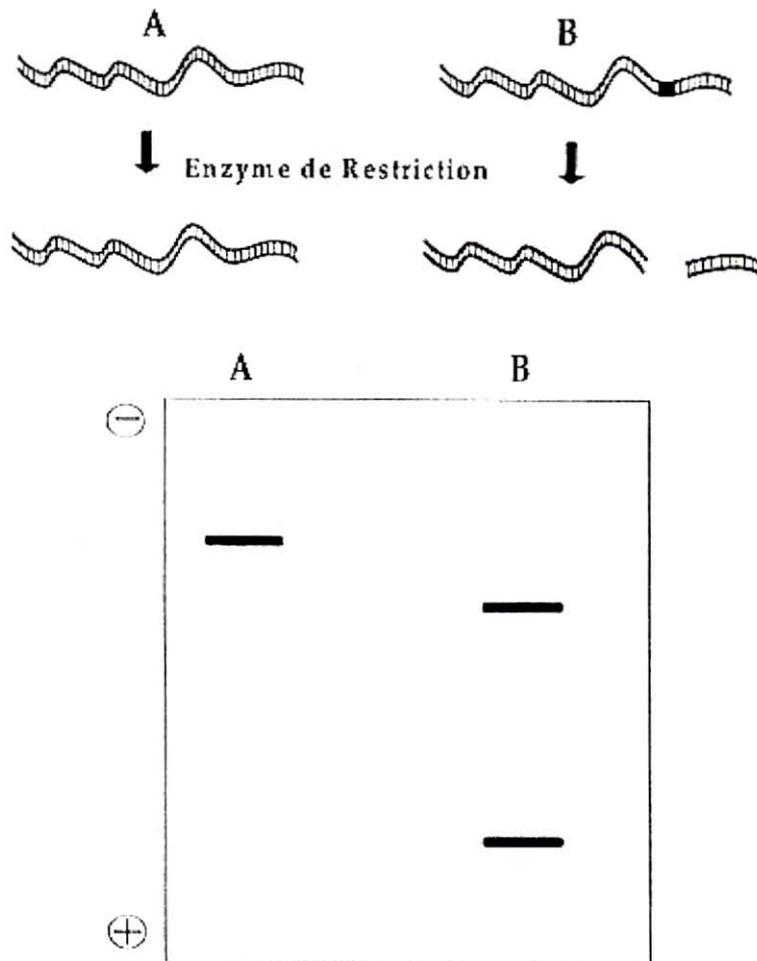


Figure 2.5.1 : Analyse de polymorphisme de fragments de restriction (RFLP).

Deux individus A et B diffèrent par leurs séquences nucléotidiques. Cette variation entraîne la création d'un site de coupure pour une enzyme de restriction. L'ADN de deux individus est digéré à l'aide de cette enzyme et déposé sur un gel d'électrophorèse. La présence d'un site de coupure chez l'individu B entraîne la production de deux fragments de restriction à la place d'un seul chez A (Desmarais et al., 1995).

c'est à dire à 72°C après l'élongation, un nouveau cycle peut commencer (Détails de cycle en annexe 4).

Condition de réalisation de la PCR (protocole en annexe 4) :

Afin que la PCR puisse se dérouler dans de bonnes conditions, le mélange réactionnel doit contenir un certain nombre d'éléments :

- ~un aliquote de l'ADN à amplifier, qui servira de matrice ;
- ~une solution de désoxynucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) permettant la synthèse des nouvelles chaînes ;
- ~les amorces qui sont indispensable a l'élongation par la Taq polymérase qui a besoin d'une extrémité 3'-OH libre pour polymériser ;
- ~du tampon réactionnel qui permet de maintenir l'enzyme dans les bonnes conditions de pH ;
- ~une solution de MgCl₂, le Mg²⁺ étant un cofacteur de la polymérase ;
- ~de la Taq permettant la copie du fragment.

Deux types d'amorces ont été utilisés : les amorces mitochondriales 16S et les amorces nucléaires ITS; OIKK et Amylase.

L'ITS (Internal transcribed spacer) correspond à une région nucléaire de la famille des gènes de l'RNA 18S (Wilbur and Gaffney, 1997).

OIKK est un intron du gène OIKK (Escoubas et al., 1999) qui est un gène homologue du gène IKK (IkB Kinase) existant chez les mammifères et intervenant dans les réactions immunitaires.

Les amorces de l'amylase correspondent à des introns du gène dessinés à partir du gène nucléaire de l'amylase de l'huître creuse (Moal et al., 2000).

2-5.Détection du polymorphisme :

2-5-1.PCR-RFLP (polymorphisme de longueur de restriction)

Cette technique est l'association entre les techniques d'amplification et d'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restrictions. Ces enzymes sont synthétisées par des bactéries, afin de lyser l'ADN, généralement pour se protéger des génomes viraux. Elles permettent de repérer directement des variations dans les séquences primaires d'ADN.

En effet, la présence ou non d'une mutation au niveau des sites de restrictions des différentes enzymes peut entraîner ou non la coupure du fragment. Il est ainsi possible de distinguer des haplotypes correspondant aux différentes populations. Ainsi, des différences de taille des fragments des restrictions après digestion par une même enzyme chez deux individus, distinguent deux haplotypes.

Si un polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) est constaté, cette séquence de nucléotides connue, devient un marqueur moléculaire d'espèce facilement détectable.

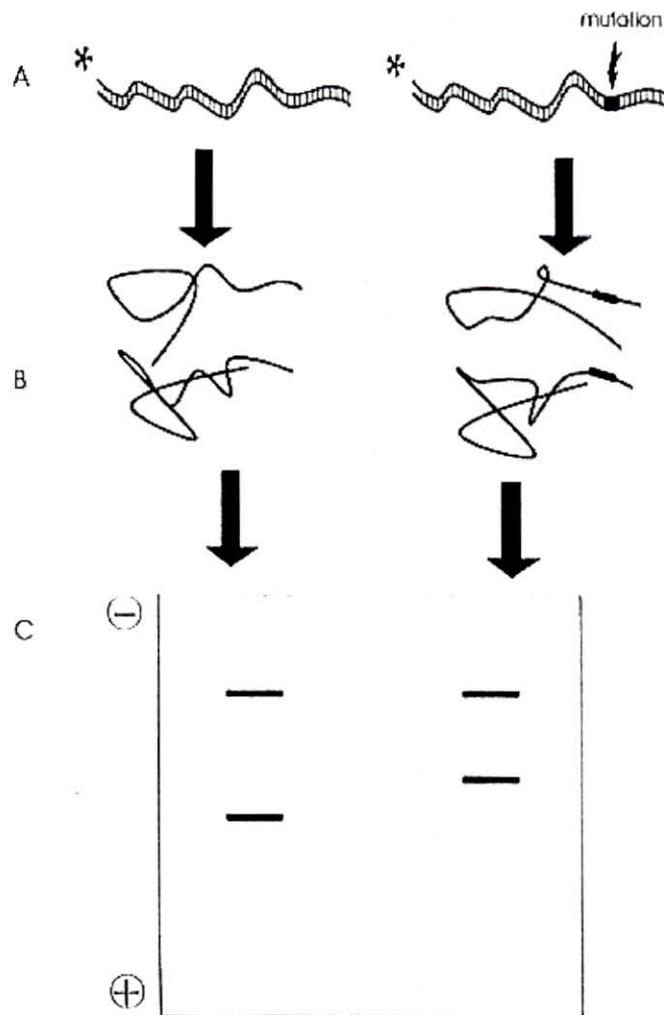


Figure 2.5.2 : Principe de la SSCP

Les échantillons A et B ne portent pas la même séquence à un locus précis. Tous les deux sont amplifiés en parallèle (A). ils sont ensuite dénaturés et migrent dans un gel d'acrylamide (B). la présence d'une mutation entraîne dans cet exemple précis une différence de configuration ce qui implique un encombrement différent et donc un décalage de position sur une seule des deux bandes produites par la dénaturation (C) (Desmarais et al., 1995).

2-5-2.PCR -SSCP

La SSCP est une méthode d'électrophorèse dont le but est de révéler d'éventuels polymorphismes, et donc de détecter d'éventuelles variations de séquences entre différents individus

Les deux molécules simples brins produites par la dénaturation de l'ADN bicaténaire adoptent chacune en se dénaturant une structure secondaire ou configuration qui est dépendante de leur séquence nucléotidique. Ainsi, entre deux ADN dont les séquences ne diffèrent que d'une seule paire de bases, il peut apparaître des polymorphismes de structure secondaire après dénaturation.

Le nombre de bandes obtenu peut varier selon le genre étudié (haploïde ou diploïde) et l'hétérozygotie.

Après amplification par PCR, la molécule à analyser est dénaturée par chauffage à 95°C dans une solution de bleu dénaturant, qui permet le maintien des deux brins séparés (composition du bleu dénaturant en annexe 6). Chacun des deux brins peut alors adopter une conformation particulière. Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant (composition en annexe 1). La migration de l'ADN simple brin est dépendante de la conformation qu'il adopte dans la maille de polyacrylamide : la distance parcourue par le fragment ne dépend plus seulement de sa taille, mais aussi de sa structure secondaire et donc de sa séquence nucléotidique.

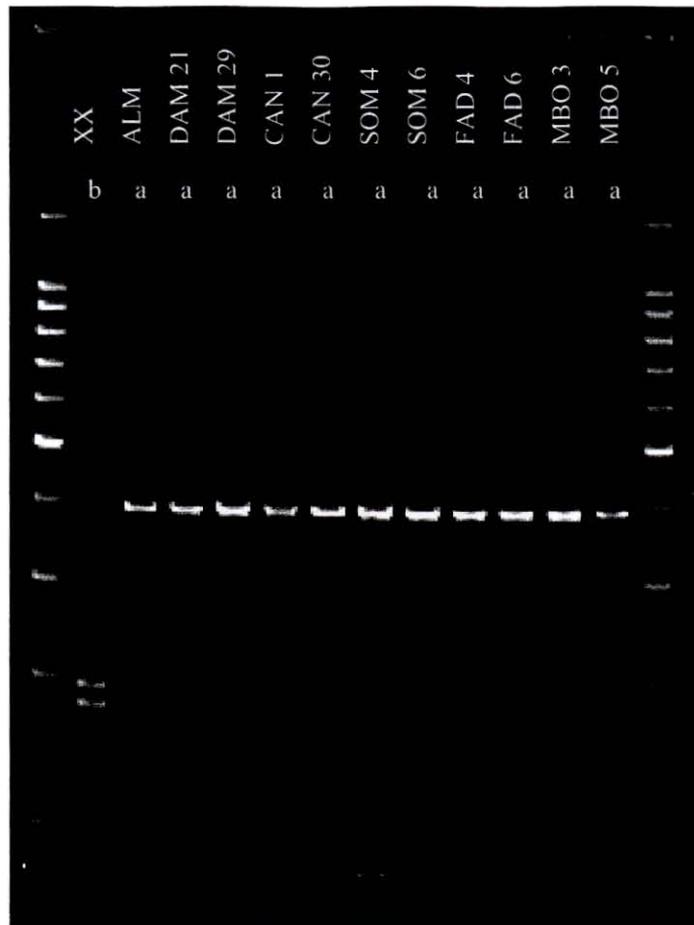


Figure 3.1.a : profils de restriction de TaqI, du fragment 16S, pour les différentes populations sur gel d'acrylamide 8%.

TaqI permet d'obtenir :

-2 fragments pour *Crassostrea gasar* qui détermine le profil a.

1 de 390 pb.

1 de 80 pb.

-3 fragments pour *Crassostrea rhizophorae* qui détermine le profil b.

1 de 190 pb.

1 de 180 pb.

1 de 80 pb.

3. RESULTATS ET DISCUSSION :

3-1. Confirmation de la présence de *C. gasar* en Amérique du Sud :

L'étude sur la taxonomie et la phylogéographie des huîtres creuses dans l'Atlantique Sud effectuée en 1999 par Isabelle Boutet, a permis d'identifier des enzymes de restriction, du marqueur 16S, présentant des profils différents entre les espèces *C. gasar* et *C. rhizophorae* (Tableau 3.1). Ces enzymes permettent de déterminer des haplotypes caractéristiques de l'une ou l'autre espèce.

L'information apportée par plusieurs enzymes étant apparue redondante, deux seulement ont été choisies : TaqI et HindIII.

Les résultats de la PCR-RFLP sont présentés dans le tableau 3.1.

Population	Nombre d'individus étudiés	Profil de restriction		Haplotype
		TaqI	HindIII	
DAM	12	a	a	I
SOM	12	a	a	I
FAD	6	a	a	I
MBO	6	a	a	I
CAN	6	a	a	I
ALM	1 (témoin)	a	a	I
XX	1 (témoin)	b	b	II

Tableau 3.1 : résultats des PCR-RFLP effectuées à partir des fragments 16S mitochondriaux.

Le vert correspond aux populations Africaines.

En rouge apparaît la nouvelle population de *C. gasar* du Brésil.

Au vue de ces profils (figure 3.1.a et 3.1.b) il apparaît que toutes les nouvelles populations présente l'haplotype I qui correspond donc à l'espèce *C. gasar*.

Ces résultats confirment donc la présence de cette espèce en Amérique du Sud.

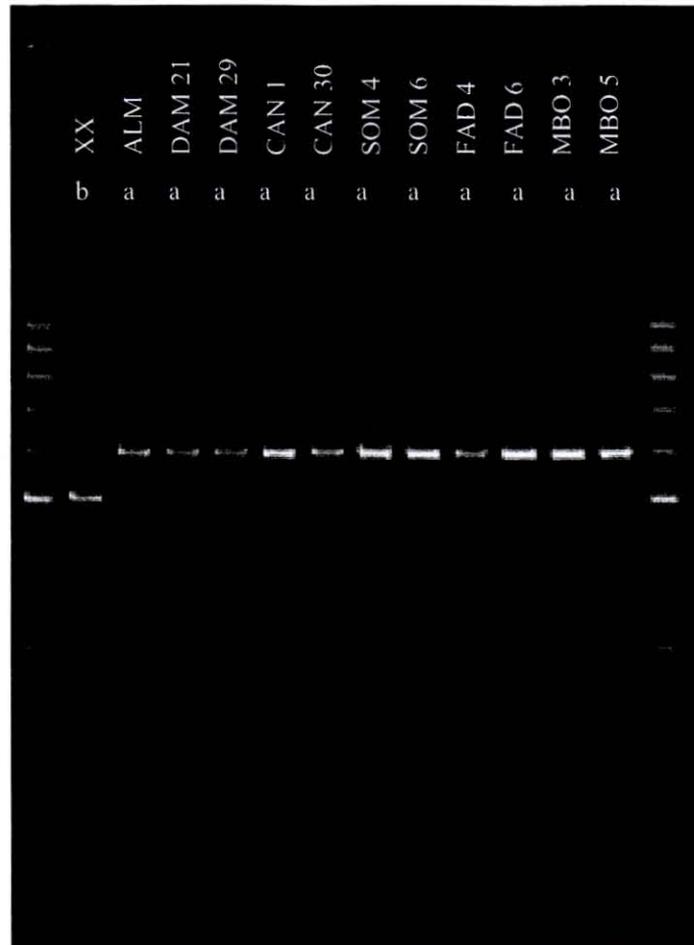


Figure 3.1.b : profils de restriction de HindIII, du fragment 16S, pour les différentes populations sur gel d'acrylamide 8%.

HindIII permet d'obtenir :

1 fragment de 570 pb pour *Crassostrea gasar* qui détermine le profil b.

Au moins 2 fragments pour *Crassostrea rhizophorae* qui détermine le profil a.

1 de 510 pb.

1 petit non visible.

3-2. Mise au point de nouveaux marqueurs :

Différentes mises au point ont dû être réalisées afin d'amplifier des fragments d'ADN nucléaire et d'en étudier le polymorphisme.

3-2-1. Optimisation des extractions et de la dilution des ADN extraits :

L'extraction d'un grand nombre d'individus s'est révélée difficile du fait de la mauvaise qualité de conservation des échantillons. Ceci étant le plus souvent dû à une quantité d'alcool non proportionnelle à la quantité de tissus prélevée. Ainsi certains échantillons ont dû être extraits à deux reprises afin d'augmenter le rendement d'extraction.

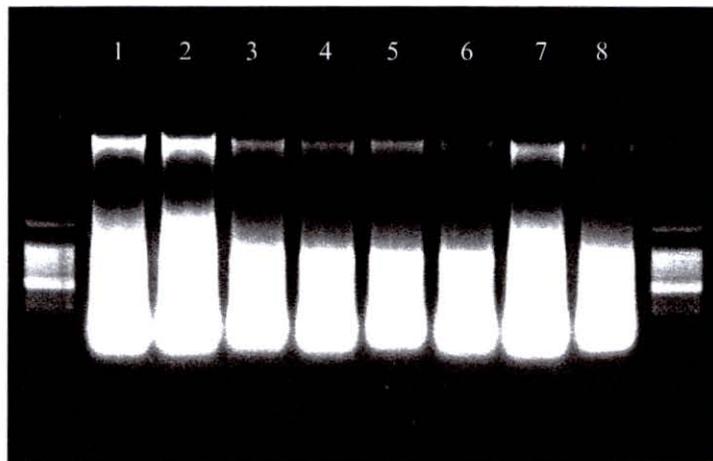


Figure 3.2.1 : Exemple de migration des extraits sur gel d'agarose 1%.

Par exemple sur cette photo de gel (figure 3.2.1), 6 individus présentent un signal suffisant pour être amplifié (1, 2, 3, 4, 5, 7).

Un des facteurs déterminant lors de la PCR est la dilution des ADN. Ainsi les individus 1, 2 et 7 ont été dilués à 10% et les autres individus amplifiés à 5%.

Malgré cela, certains individus n'ont pas donné un signal suffisant et n'ont donc pas pu être amplifiés ni avec les amorces mitochondriales ni avec les amorces nucléaires. Ceci est peut-être dû à des facteurs présents dans les échantillons et inhibant l'amplification.

3-2-2. Amplification avec des marqueurs nucléaires :

Des essais avec différentes amorces ont été réalisés à basse température (50°C). Les amorces utilisées sont des amorces qui ont été dessinées pour *Crassostrea gigas*, elles ne sont donc pas spécifiques des espèces de l'Atlantique Sud. Cependant, nous sommes partis du fait qu'au niveau du genre, nous pouvions espérer l'existence d'une homologie suffisante pour permettre l'hybridation de certaines amorces.

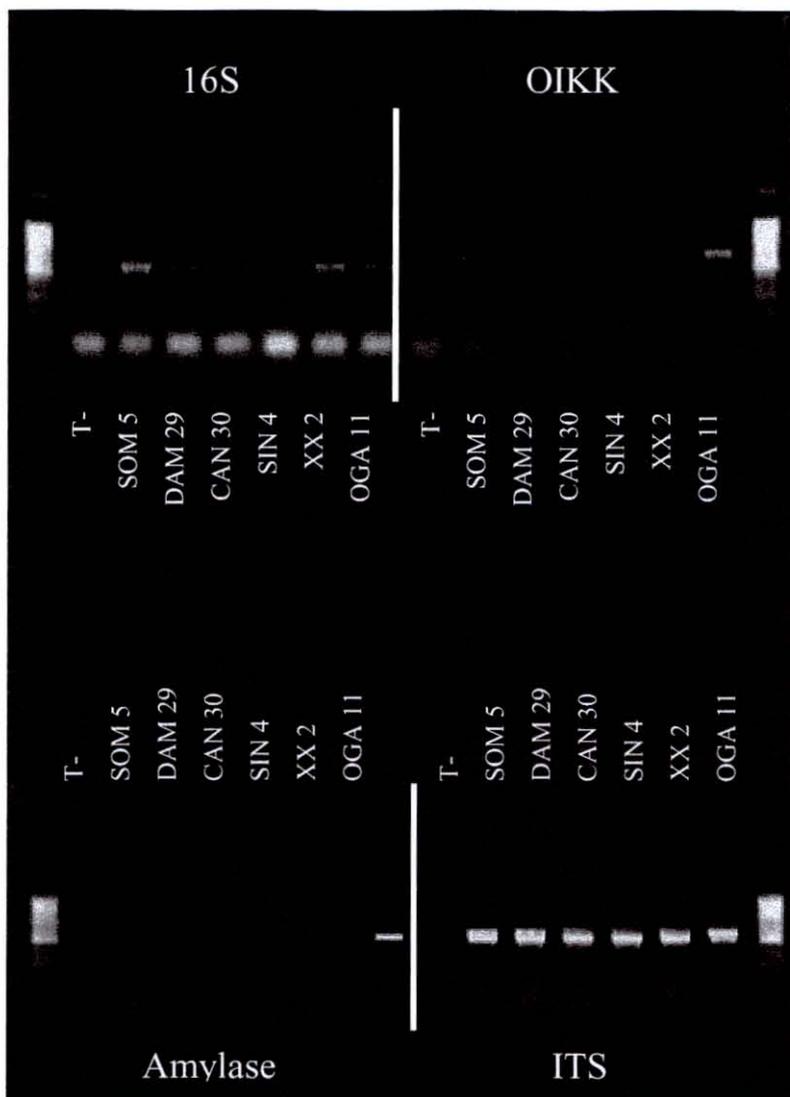


Figure 3.2.2 : PCR à 50°C avec différentes amorces : 16S (mitochondriales) ; OIKK (intonique) ; Amylase (Intronique) ; ITS (séquence intercalaire du gène 16S ribosomal).

Sur la figure 3.2.2 sont présentés les résultats d'amplifications effectuées avec les différentes amorces. Pour chaque essai d'amplification, un individu de différentes populations : 2 populations de *C. gasar* d'Afrique (SOM et DAM) et 2 populations *C. gasar* d'Amérique (CAN et SIN). Deux témoins ont systématiquement été associés : un témoin négatif pour vérifier l'absence d'éventuelles contaminations et un témoin positif OGA 11 (individu *C. gigas* prélevé au Japon) permettant de vérifier la réussite de l'amplification.

Cette photo (figure 3.2.2) montre que la PCR a fonctionné car les témoin *C. gigas* présentent un signal.

Pour les espèces qui nous intéressent, seul les amorces 16S, servant également de témoin d'amplification, et ITS montrent un signal.

La suite des travaux va donc se focaliser sur les amplifications nucléaires par les amorces ITS.

3-2-3. Mise au point de la température d'hybridation des amorces ITS :

L'amplification par les amorces de l'ITS montre un signal très intense. Etant donné la température d'hybridation très basse il est probable que l'hybridation présente un caractère aspécifique. Des essais d'hybridation à des températures plus élevées ont été réalisés : 52°C, 55°C et 57°C. A 57°C l'amplification ne se faisait plus que sur certains individus, ce sont donc les amplifications à 55°C qui ont été choisies pour la détection du polymorphisme.

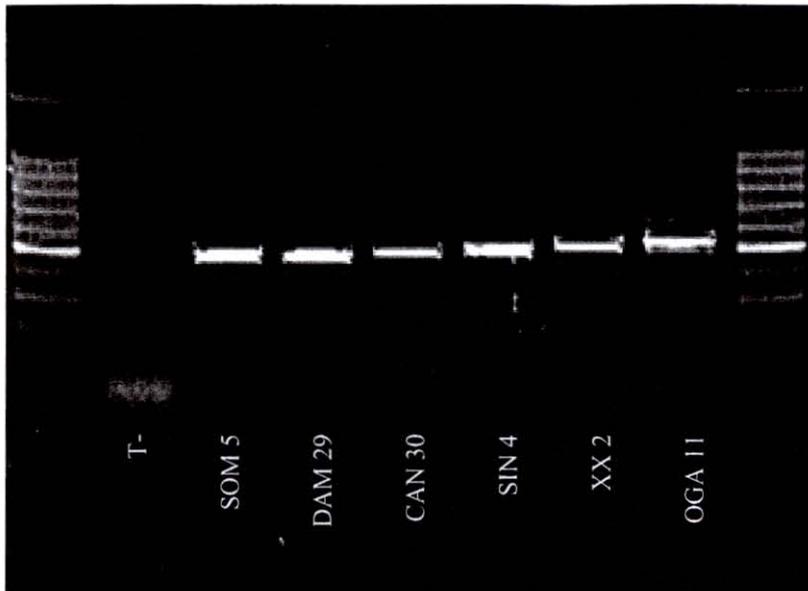


Figure 3.2.3 : PCR à 55°C avec les amorces ITS.

3-2-4. Mise au point du protocole de SSCP :

Les premiers essais de SSCP n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, différents changements de protocole ont été apportés afin d'essayer de résoudre les problèmes.

-Les premiers changements ont été apportés au protocole de migration.

Tout d'abord, le voltage appliqué lors de la migration a été diminué pour ralentir la progression des fragments et surtout moins dégrader le gel qui doit supporter un fort voltage pendant de longues heures.

Ensuite des fragments de PCR ont été déposés dans un gel de SSCP à 6% au lieu de 8%, permettant une migration plus rapide des fragments, et mis à migrer pendant 8h au lieu de 14h. Ceci a permis de visualiser plus nettement les fragments. Cependant, les résultats obtenus se sont révélés non répétables.

-Puis les changements ont porté sur la taille des fragments.

Des essais ont été réalisés à partir de fragments d'ADN digérés par des enzymes de restriction. Les fragments étant ainsi plus petits doivent migrer plus loin sur le gel pour un même voltage. Dans ce cas des bandes apparaissent mais très faiblement et ne permettent pas de distinguer les différences.

Il faut noter que le BET se fixe dans la double hélice d'ADN, or avant la migration dans le gel de SSCP l'ADN est dénaturé par chauffage pour séparer les deux brins. Ainsi il est plus difficile au BET de se fixer et de révéler les fragments.

De plus la quantité d'ADN digérée étant faible, il est possible que les bandes n'apparaissent pas car il n'y a pas assez d'ADN pour permettre la visualisation des

signaux. Une augmentation assez nette de la concentration en ADN dans les digestions et lors de la migration n'a permis de visualiser que de faibles bandes. (Figure 3.2.4).

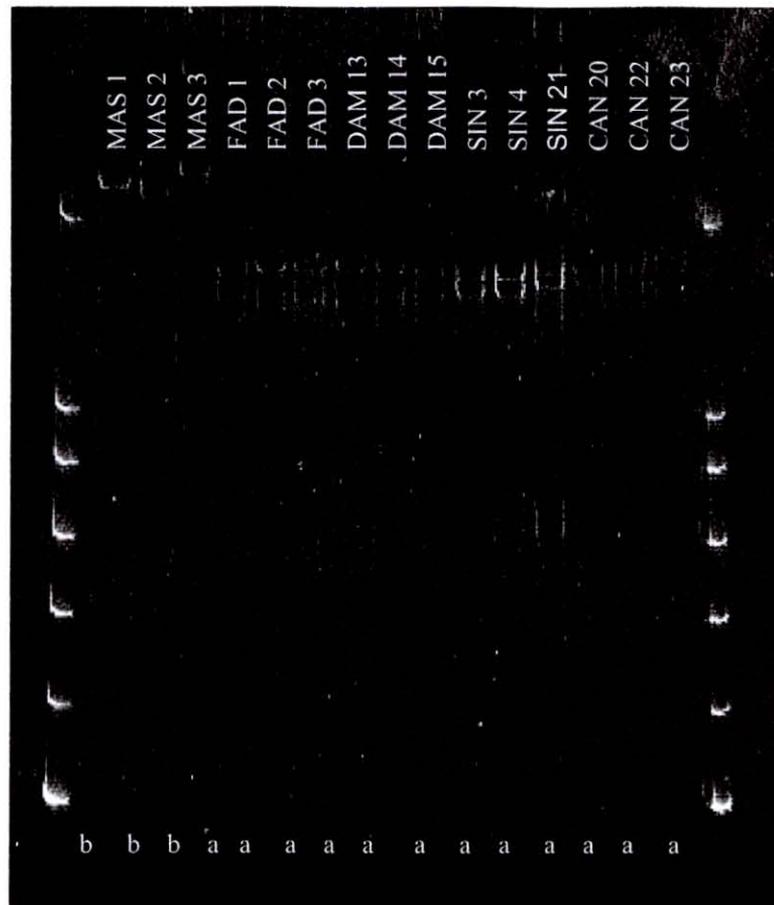


Figure 3.2.4 : Migration en SSCP des fragments de restriction obtenus par l'enzymes TaqI

Il existe une différence nette de profil entre les MAS qui sont des *C. rhizophorae* et les autres populations appartenant à l'espèce *C. gasar*.

3-3. Etude de l'ITS :

3-3-1. PCR :

La migration des fragments de PCR sur gel d'acrylamide 8% n'a pas permis de détecter plus de polymorphisme inter spécifique que de polymorphisme intra spécifique. En effet il existe du polymorphisme entre les individus d'une même espèce.

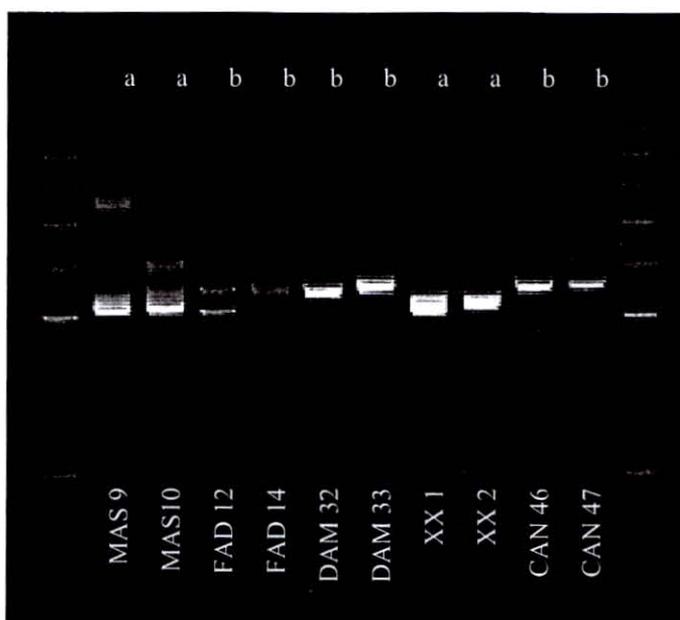


Figure 3.3.1 : Migration sur acrylamide 8% de fragments de PCR.

Les populations MAS et XX présentent le même profil (a) qui correspondrait à l'espèce *C. rhizophorae* et les autres populations présentent globalement une taille de fragments d'amplification différente et supérieure qui correspondrait à *C. gasar* : profil b.

La présence de multiples bandes parasites semble être due à une hybridation non spécifique des amorces qui n'a pas été supprimée par l'augmentation de température des PCR.

Ces premiers résultats sont plutôt encourageant mais non encore interprétables.

Une purification de fragments de PCR de plusieurs individus a été réalisée puis envoyée au séquençage. Malheureusement les échantillons n'étaient pas assez "propre" pour donner de résultats même après une double PCR (PCR à partir de fragments repris du gel d'acrylamide). Il faut noter que la température d'hybridation n'est pas le seul facteur de spécificité de l'hybridation des amorces, peuvent également intervenir notamment le $Mg\ Cl_2$ et le choix des amorces. Il est donc encore nécessaire de faire des mises au point pour l'amplification de ce fragment.

3-3-2. PCR-RFLP :

La digestion des fragments de PCR des différentes populations par des enzymes de restriction a permis de déterminer deux profils différents pour les populations qui nous intéressent et un pour l'individu de référence (*C. gigas*). (figure 3.3.2)

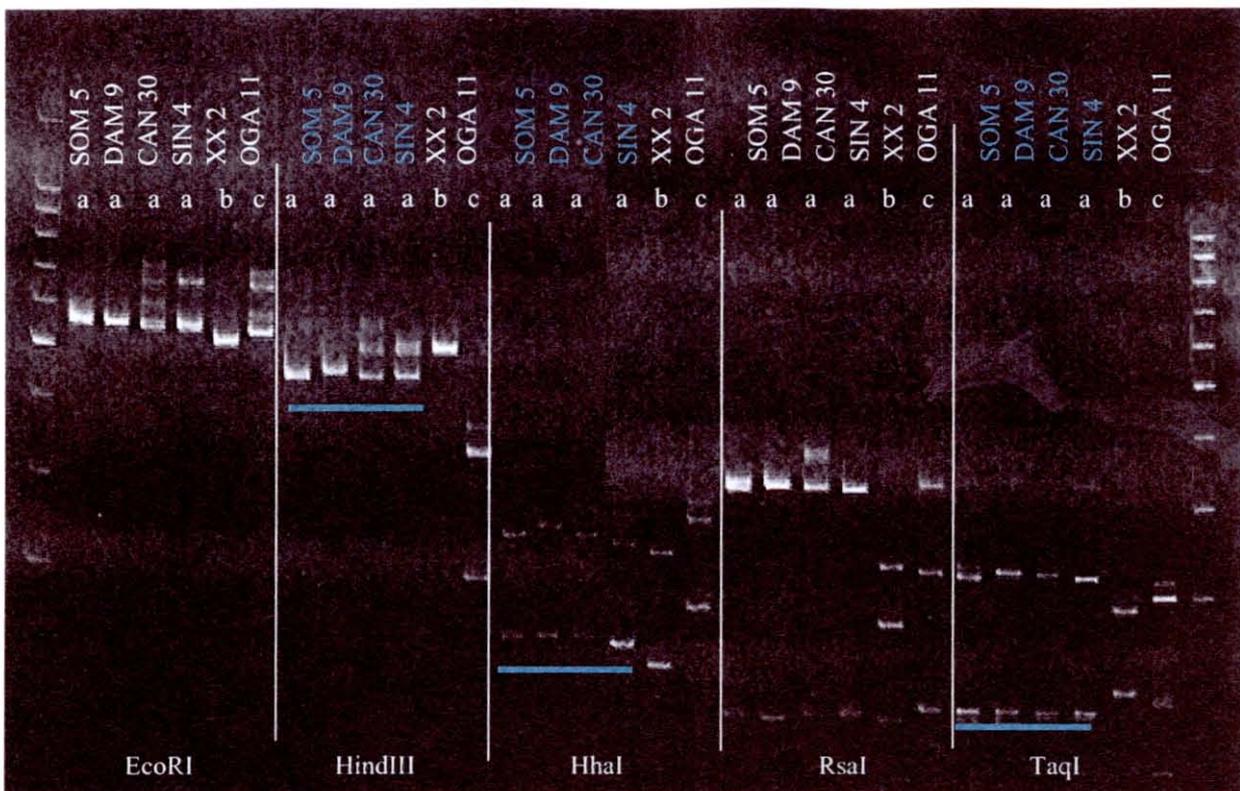


Figure 3.3.2: profils de restriction obtenus à partir des digestions des fragments de PCR avec différentes enzymes. Les fragments en bleu semblent présenter des variations entre les populations.

Les différences claires de profils sont entre *C. rhizophorae*, *C. gasar* et *C. gigas* présent ici comme témoin de digestion.

Cependant il semblerait qu'il existe également des différences entre les populations de *C. gasar*. De plus de nombreuses bandes "parasites" sont visibles sur les fragments de restriction, ces bandes sont dues à l'incomplète spécificité des amplifications par PCR et rendent difficile l'interprétation de ces résultats.

3-3-3. PCR-SSCP :

Les différents travaux de mise au point n'ont pas encore permis d'obtenir de résultats répétables, il n'est donc pas possible de les interpréter.

4. CONCLUSION :

Les différentes informations concernant la morphologie des populations étudiées, et notamment l'apparence de la coquille des populations africaines conservées au conservatoire de souche de l'IFREMER de La Tremblade, laisse supposer que les huîtres présentent une grande plasticité par rapport aux conditions de l'environnement.

Les difficultés rencontrées pour identifier les différentes espèces par leurs « caractéristiques visuelles » telles que la morphologie interne et surtout celle de la coquille (Littlewood, 1994) font de la génétique un outil intéressant et fiable pour la taxonomie de ces espèces. (Hedgecock et al., 1999).

Ainsi la PCR-RFLP sur l'ADN mitochondrial 16S permet de distinguer facilement et sans ambiguïté les deux espèces d'huîtres creuses qui nous intéressent. (Boutet, 1999).

Les neuf populations étudiées précédemment et les cinq nouvelles permettent de déterminer deux types qui correspondent à deux espèces que nous supposons être *Crassostrea gasar* et *Crassostrea rhizophorae*. La présence d'une nouvelle population présentant le même profil que *C. gasar* sur les côtes américaines confirme bien la présence de cette espèce dans ces régions. *Crassostrea gasar* semble donc capable de s'adapter d'une part au milieu particulier des mangroves (Rodriguez et al., 1979a) et d'autre part aux conditions différentes rencontrées de part et d'autre de l'Atlantique et sur une grande étendue de côte.

L'étude de ces espèces par des marqueurs nucléaires polymorphes est un bon moyen de distinguer du polymorphisme entre les différentes populations et d'en déterminer les relations phylogéographiques (Li et al., 1985).

L'hybridation par des amorces dessinées pour amplifier de l'ADN de *C. gigas* a permis d'amplifier des fragments d'ADN des deux espèces. Il a été possible de distinguer deux grands types correspondant aux deux espèces étudiées. Mais malheureusement ces amplifications se sont révélées peu spécifiques et n'ont pas permis d'évaluer le polymorphisme intra-spécifique entre les populations des côtes est et ouest de l'Atlantique. L'amplification de fragments spécifiques et l'étude de ces fragments demande un gros travail de mise au point avant d'obtenir des résultats répétables et interprétables. Une fois ces mises au point effectuées il est probable que du polymorphisme sera détecté plus précisément et qui soit quantifiable.

Le séquençage des fragments ITS amplifiés s'est révélé impossible compte tenu de la présence de bandes parasites. Celui-ci aurait permis d'étudier directement l'information ultime, la séquence, en particulier entre les différentes populations de *C. gasar*. Ceci aurait également permis de dessiner des amorces permettant une amplification spécifique chez nos deux espèces. L'application des différentes techniques (PCR-RFLP, PCR-SSCP) seraient alors plus simple et plus rapide.

En Amérique du Sud l'espèce normalement rencontrée est *C. rhizophorae* (Singarajah, 1980). Pour cet auteur et pour Rios (1994) *C. rhizophorae* et *C. brasiliiana* sont une seule et même espèce. Cependant une étude récente effectuée par électrophorèse d'allozyme montre que ces deux espèces seraient en réalité deux espèces distinctes (Ignacio et al., 2000). Si ces deux espèces sont différentes, il est possible que ce que nous avons identifié comme des populations de *C. gasar* en Amérique du sud soit bien des populations différentes de *C. rhizophorae* mais appartenant à l'espèce décrite sous le nom de *C. brasiliiana*. Il serait donc intéressant de pouvoir comparer les profils de restriction obtenus à partir de l'ADN 16S des différentes populations brésiliennes, y compris de populations identifiées comme étant *C. brasiliiana*, pour pouvoir comparer notre type « *C. gasar* » et celui « *C. brasiliiana* ».

D'autre part les deux types *C. rhizophorae* et *C. gasar* (populations identifiées comme telles) vivent en sympatrie en Guyane et au Brésil et aucune étude sur leur éventuelle possibilité d'hybridation n'a été réalisée. Il est donc difficile de savoir si ces deux espèces rencontrées en Amérique sont vraiment différentes. Des croisements expérimentaux permettraient de répondre à cette question, mais il est difficile d'avoir des animaux vivants et en bonnes conditions pour pouvoir faire des croisements.

Il faut noter que des arbres phylogéographiques rapprochent *C. rhizophorae* de *C. virginica* (Boutet I, 1999), que des hybrides de ces espèces peuvent être obtenus et qu'il existe une zone d'hybridation naturelle présentant un gradient de transition entre les deux espèces sur la côte sud du Golf du Mexique. (Rodriguez-Romero et al., 1998). De même d'autres hybridations ont permis de regrouper *C. gigas* et *C. angulata* (Menzel, 1974 ; Boudry et al., 1999). Des arbres phylogéographiques réalisés (Boutet, 1999) ont permis de positionner *C. gasar* en position intermédiaire entre les groupes *C. virginica-C. rhizophorae* et *C. gigas-C. angulata*.

Toutefois il serait important de situer dans ces groupements *C. brasiliiana* si elle constitue bien une espèce distincte de *C. rhizophorae* ou de *C. gasar*.

Une autre question importante se pose est l'explication de la présence en Amérique du Sud d'une espèce proche sinon identique de *C. gasar* le plus souvent rencontrée sur les côtes Africaines. Deux hypothèses ont été émises quant à sa présence (Boutet 1999) : présence naturelle ou introduction par les courants ou plus probablement une introduction artificielle par l'homme. La circulation océanique laisserait plutôt penser à une introduction artificielle par l'homme.

Dans l'avenir il serait donc intéressant de continuer le travail de mise au point pour l'obtention de produits de PCR propres de l'ITS ou d'autres fragments nucléaires afin de séquencer les fragments et de pouvoir détecter un éventuel polymorphisme intra type entre Amérique et Afrique afin d'argumenter dans le sens de l'une ou l'autre des hypothèses expliquant la présence de *C. gasar* de part et d'autre de l'Atlantique.

La mise au point de la recherche de polymorphisme par RFLP et SSCP pourrait également permettre de différencier les populations et notamment les populations africaines et les populations américaines. Cette différenciation pourrait permettre d'estimer la divergence entre les différentes populations et donc d'estimer

depuis combien de temps les populations de part et d'autre de l'Atlantique se sont séparées et depuis quand elles divergent.

Il serait également nécessaire de pouvoir effectuer les mêmes recherches de polymorphisme sur des populations identifiées comme des *C. brasiliensis* par les électrophorèses d'allozymes afin de déterminer si les *C. gasar* trouvées en Amérique ne seraient pas la même espèce que les *C. brasiliensis* (Ignacio et al., 2000).

La recherche de d'autres marqueurs nucléaires serait également intéressante tel que des marqueurs microsatellites. Et également l'utilisation de d'autres techniques comme par exemple la DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism).

5. BIBLIOGRAPHIE :

- ∞AJANA A.M.,(1976). Oyster culture in closed ponds and open waters. *Nigerian Institute for oceanography and marine Research, Lagos, Annual Rapport* : 15.
- ∞ALLEN S.K. et GAFFNEY P.M. (1993). Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (Thunberg) et *Crassostrea rivularis* (Gould). *Aquaculture* 113 : 291-300.
- ∞AVISE J. C. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- ∞AVISE J.C., ARNOLD J., MARTIN BALL R., BERMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J. E., REEB C.A., SAUNDERS N.C. (1987). Interspecific phylogeography : the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev ; Ecol. Syst.* 18 : 489-522.
- ∞BANKS M.A., HEDGECOCK D., WATERS C. (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2 : 129-136.
- ∞BONHOMME F., BOURSOT P., DALLAS J., TABERLET P. (1995). Les marqueurs moléculaires du flux génique et de la structuration spaciale. *In la Révolution Technique en Ecologie*, LEGAY J.M. et BARBAULT P. Edition Masson, Paris.
- ∞BOUDRY P., HEURTEBISE S. HUVET A., CHOLLET B., LEDU C., PHELIPOT P., GERARD A. (1999) Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : hybridation et conservatoire de souche. *Synthèse finale*.
- ∞BOUDRY P., HEURTEBISE S., CHOLLET B., CORNETTE F. et GERARD A. (1998). Genetic differentiation between populations of the Portugese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) , revealed by mtDNA RFLP analysis. *J. exp. Mar. Biol.*, 226 : 279-291.
- ∞BOURSOT P., BONHOMME F. (1986). Génétique et évolution du génome mitochondrial des Métazoaires. *Genet. Sel. Evol.* 18 : 73-98.
- ∞BOUTET I. (1999). Taxonomie et phylogéographie des huîtres creuses dans l'Atlantique Sud. *Rapport de stage de fin de maîtrise effectué au LPG de la Tremblade*.
- ∞BURKER N.E., HERSHERGER W.K., CHEW K.K. (1979). Population genetics of the Family Ostreidae. I. Intraspecific studies of genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar. Biol.* 54 : 171-184.
- ∞DESMARAIS E., VIGNERON S., BURESI C., ROIZES G. (1995). Detection du polymorphisme dans l'ADN : application en biologie et médecine diagnostique, épidémiologique et pronostique. Editions INSERM, Paris.

- ↻ESCOUBAS J.M., BRIANT L., MONTAGNANI C., DEVAUX C. et ROCH P. (1999). Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Letters*, 453 : 293-298.
- ↻GILLES S. (1991). Settlement and growth of the West African mangrove oyster, *Crassostrea gasar*, in the Casamance, Sénégal. *Rev. Hydrobio. Trop. Vol 24, No 3* : 197-207.
- ↻GRIFFITHS, MILLER, SUZUKI, LEWONTIN, GELBART (1997). Introduction à l'analyse génétique. 6^{ème} édition, DeBoeck Université.
- ↻HEDGECOCK D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? *In genetics and evolution of aquatic organisms*. BEAUMONT A.R. Ed. Chapman & hall, London, 122-134.
- ↻HEDGECOCK D., LI G., BANKS M.A., KAIM Z. (1999). Occurrence of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Ariake sea, Japan. *Marine Biology* 133 : 65-68.
- ↻HILLIS D.M., DIXON M.T. (1991). Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of biology* 66 : 411-4453.
- ↻IGNACIO B.L., ABSGER T.M., LAZOSKI C., SOLE-CAVA A.M. (2000). Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia : Ostreidae) on the coast of Brasil. *Mar. Biol.* 136 : 987-991.
- ↻LADRON DE GUEVARA B., WINKLER F., RODRIGUEZ-ROMERO F., PALMA-ROJAS C. (1996). Comparative karyotype of four american oyster species. *The veliger* 39(3) : 260-266.
- ↻LARZUL D. (1993). La PCR : un procédé de répliation *in vitro*. *Technique & documentation - Lavoisier*.
- ↻LI W.H., LUO C.C., WU C.I. (1985). Evolution of DNA sequences : Molecular evolutionary genetics. *MacIntyre R.J. editor* : 1-92 Plenum. New-York.
- ↻LITTLEWOOD D.T.J. (1994) Molecular Phylogenetics of Cupped Oysters Based on Partial 28S rRNA Gene Sequences. *Molecular phylogenetics and evolution Vol 3, No 3, Septembre*, pp.221-229.
- ↻MENZEL R.W. (1974). Portuguese and Japanese oysters are the same species. *J. Fisch. Res. Board Can.* 31 : 453-456.
- ↻MOAL J., DANIEL J.Y., SELLOS D., VAN WORMHOUDT A., SAMAIN J. F. (2000). Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. *J. Comp. Physiol. B*, 170 :21-26.
- ↻MORITZ C., DOWLING T.E., BROWN M. (1987). Evolution of nimal mitochondrial DNA : relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18 : 269-292.

- ∞MULLIS K., FALOONA F. (1987). In methods in enzymology, Vol 155 (ed. R. WU), p.335. *Academic Press*, New York and London.
- ∞O'FOIGHIL D., GAFFNEY P.M., HILBISH T.J. (1995). Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene séquences allow discrimination among American [Crassostrea virginica (Gmelin) and C. gigas (Thunberg) ; C. ariakensis (Wakiya)] oyster species. *J. exp. Mar. Biol. and ecol.* 192 (1995) :211-220.
- ∞O'FOIGIL D., GAFFNEY P.M., WILBUR A.E., HILBISH T.J. (1998). Mitochondrial cytochrome oxydase I genesequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar. Biol* (1998).Vol 131, No 3 : 497-503.
- ∞ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K., SEKIYA T. (1989). Detection of polymorphisms of humain DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2766-2770.
- ∞RIOS (1994). Sea shells of Brazil. Fundação Universidade do Rio Grande. Brasil.
- ∞RODRIGUEZ-ROMERO F., GARCA MONTES DE OCA M. (1998). Chromosomes of the experimental hybrid of *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) and *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) (Pseudolamellibranche : ostreidae). *Ciencias Marinas* (1998), 24(1) : 55-63.
- ∞RODRIGUEZ-ROMERO F., LAGUARDA-FIGUERAS A., URIBE-ALCOCER M. (1979a). Comparative analysis of the karyotypes of two oyster species of the genus *Crassostrea* from Mexico : C. virginica and C. corteziensis.*An. Centro. Cienc. Del. Mar y Limnol. Univ. Nal ; Auton. Mexico*, 6(1) : 19-24 (1979).
- ∞RODRIGUEZ-ROMERO F., URIBE-ALCOCER M., LAGUARDA-FIGUERAS A., DIUPOTEX-CHONG M;E ; (1979b). The karyotype of *Crassostrea rhizophorae* (Guilging, 1828). *VENUS (Jap. Jour. Malac.) Vol 38, No 2* (1979) :135-140.
- ∞SAÏKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A.,ARNHEIM N. (1985). Enzymatic amplification of beta globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732) : 1350-1354.
- ∞SEED R. (1968). Factors influencing shell shope in *Mytilus edulis*. L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 48 : 561-584.
- ∞SEUTIN G., BRAWN J., RICKLEFS R.E., BERMINGHAM E. (1993). Genetic divergence among populations of a tropical passerine, the streaked saltator (*Saltator albicollis*). *Auk*. 110 : 117-126.
- ∞WARD R.D., WOODWARK M., SKIBINSKI D.O.F. (1994). A comparaison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fishies. *J. Fish. Biol.* 44 : 213-232.
- ∞WILBUR A.E., GAFFNEY P.M. (1997). A nuclear marker for the molecular identifiction of Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*) broodstock. *J. Shellfish Res.* 16 :358.

ANNEXE 1 :

-Solution anesthésiante :

3/5 d'eau douce.
2/5 d'eau de mer.
5% de MgCl₂.

Soit pour un litre : 600 ml d'eau douce, 400 ml d'eau de mer et 50 g de MgCl₂.

Mettre l'huître dans le mélange, jusqu'à ouverture de l'animal, puis prélever l'échantillon.

-Gel d'agarose 1% :

Pour 100ml de gel : -1g d'agarose.
-100 ml de TAE 1X (1).
-5 µl de bromure d'éthidium (BET).

-(1) TAE (tris acétate) : tampon de migration.

Pour le TAE à 50X : -242 g de tris base.
-57.1 ml d'acide acétique glacé.
-100 ml d'EDTA (0.5 M, pH=8).

Soit une solution finale diluée à 1X avec : 0.04 M de tris acétate et 0.001 M d'EDTA.

ANNEXE 2 :

-Gel d'acrylamide:

	RFLP	SSCP 8%	SSCP 6%
Epaisseur	1.5 mm	0.75 mm	0.75 mm
TBE 10X(1)	3.75 ml	1.27 ml	2.5 ml
Acrylamide 40%	7.5 ml	5.23 ml	7.86 ml
H ₂ O bidistillée	26.25 ml	14.40 ml	31.34 ml
TEMED (2)	30 µl	13.75 µl	27.5 µl
APS 10% (3)	180 µl	137.5 µl	275 µl
Tampon de migration	1X	0.6X	0.6X
Température de migration	18°C	4°C	4°C

-(1) TBE 10X (tris borate EDTA) :

162 g de tris base.
27.5 g d'acide borique.
50 ml d'EDTA (0.5 M, pH=8).
Qsp H₂O à 1 litre.

-(2) TEMED (N, N, N', N' Tétra méthyléthylène diamine) : catalyseur de polymérisation du gel.

-(3) APS 10% (Ammonium persulfate(NH₄)₂S₂O₈) :

100 mg d'APS.
1 ml H₂O.

-"Ladder" 100 pb :

20 µl de bleu de charge.
24 µl de ladder (proméga)100 pb (200 ng/µl).
qsp H₂O 120µl.

ANNEXE 3 :

-Protocole d'extraction:

-lyse des cellules: mettre dans un tube Eppendorf :

- 1 fragment de branchies.
- 400 µl de tampon d'extraction (1).
- 10 µl de protéinase K (10 µM).

mettre une nuit au bain marie à 55°C.

-déprotéinisation :

- ajouter 500 µl de phénol (pH=8).
Homogénéiser.
- centrifuger 10 minutes à 10000 tours par minutes à 4°C. (conditions optimales).
- prélever le surnageant.
- ajouter 500 µl de chloroforme amylique.
Homogénéiser.
- centrifuger 10 minutes à 10000 tours par minute à 4°C.
- prélever le surnageant.

-précipitation des ADN :

- ajouter 500 µl d'éthanol 100% à -20°C.
homogénéiser.
- placer à -20°C au moins pendant 2 h.
- centrifuger 10 minutes à 12000 tours minutes à 4°C.
- retirer l'éthanol (le maximum).
- ajouter 500 µl d'éthanol 70° à -20°C.
- centrifuger 5 minutes à 8000 tours par minutes à 4°C.
- retirer l'éthanol et bien sécher les culots.

-conservation des ADN :

- reprendre les culots dans 75 µl de TE 10 :1.
Conserver au réfrigérateur ou à -20°C pour une utilisation à long terme.

-(1) tampon d'extraction :

- 9.3 g d'EDTA.
- 1.5 g de tris.
- 2.5 g de SDS.
- qsp H₂O 250 ml.

-(2) TE 10:1 (tris EDTA):

- dilution à partir d'une solution mère 100X.
tris HCl 1 M pH=8.
EDTA 0.1M.

Dilution au 100^{ème} :concentration finale :

- Tris HCl 10 mM.
- EDTA 1 mM.

-Remarques :

- lors des prélèvements de tissus, les instruments sont rincés à l'alcool.
- la manipulation du phénol et du chloroforme se fait sous une hôte et avec des gants.

ANNEXE 4 :

-PCR :

-Marqueur mitochondrial : 16S (Banks et al., 1993)

16S: 16SAR : 5' GTCTGAACTCAGATCAGATCACGT 3'.(24 pb)

16SBR: 5' CTGTTTATCAAAAATA 3'.(17 pb).

Ces amorces permettent d'amplifier 570 pb. L'hybridation se fait à 50°C.

-Marqueur nucléaire : ITS (Gaffney non publié)

ITS: ITSA : 5' GGTTTCTGTAGGTGAACCTGC 3'.(21 pb)

ITSB: 5'CTGGGTTCTTCATCGACCC 3'(19 pb)

Ces amorces permettent d'amplifier environ 580 pb. L'hybridation se fait à 55°C.

-Détails des cycle de PCR utilisés :

2 minutes à 95°C.

1 minute à 95°C.

1 minute à 50°C/55°C.

1 minute à 72°C.

7 minutes à 72°C.

} 30 fois.

dénaturation initiale.

dénaturation.

hybridation.

élongation.

élongation finale.

-Protocole de la PCR :

Tampon 10X 5 µl.

dNTP [2 mM] 5 µl.

MgCl₂ [25 mM] 3 µl.

Amorce 1 [20 µM] 1 µl.

Amorce 2 [20 µM] 1 µl.

Taq [5 U /µl] 0.35 µl.

H₂O(qsp 50 µl) 32.65 µl.

ADN 10% 2 µl.

Dans un tube Eppendorf, mélanger tous les constituants du mix sauf la taq polymérase. Déposer les ADN dans les tubes à PCR, ajouter la taq au mix, puis distribuer 48 µl de mix. La PCR doit se dérouler dans la glace afin d'en préserver les constituants.

ANNEXE 5 :

-RFLP :

Enzymes	Origine	Site de coupure	Température
Taq I	Purifiée à partir d' <i>Escherichia coli</i> portant le plasmide pFBLT88 et produisant cette enzyme en excès.	5'T↓CGA	65°C.
HindIII	Purifiée à partir d' <i>Escherichia coli</i> portant le gène HindIII d' <i>Haemophilus influenzae</i> Rd .	5'A↓AGCTT	37°C.
EcoRI	Purifiée à partir d' <i>Escherichia coli</i> RY13.	5'G↓AATTC	37°C.
HhaI	Purifiée à partir d' <i>Escherichia coli</i> portant le gène HhaI d' <i>Haemophilus haemolyticus</i> .	5' GCG↓C	37°C.
RsaI	Purifiée à partir de <i>Rhodopseudomonas sphaeroide</i> .	5' T↓TAA	37°C.

-Protocole de la digestion:

Produit de PCR	5 µl.
Tampon	2 µl.
Enzymes	0.5µl.
H ₂ O (qsp 20 µl)	12.5 µl.

Chaque enzyme possède un tampon spécifique nécessitant un mix particulier. Comme pour la PCR le mix est préparé puis le produit de PCR déposé puis 15 µl de mix contenant l'enzyme.

Les tubes sont placés aux températures adéquates pendant 1h30.

Après ce délai la réaction enzymatique est stoppée par du bleu de charge (1).

- (1) bleu de charge : (colorant 6X).
 - 0.25% de bleu de bromophénol.
 - 0.25% de xylène cyanol.
 - 50 mM d'EDTA.
 - 30% de glycérole.

ANNEXE 6 :

-SSCP :

Avant la migration dans un gel d'acrylamide 8% (cf annexe 2) à 200V ;150 mA ; 4°C pendant 14h, faire dénaturer 10 µl de produit de PCR ou de produit de digestion avec 10 µl de bleu dénaturant (1) à 95°C pendant 7 minutes.

- (1) Bleu dénaturant :
 - 400 µl de bleu de charge 6X.
 - 1900 µl de formamide.
 - 20 µl de NaOH 1M.
 - 80 µl d'EDTA 0.5M.