



Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Secteur Ecologie

Laboratoire de Génétique  
Aquaculture et Pathologie  
La Tremblade

LA TREMBLADE  
BIBLIOTHÈQUE

**Application des techniques moléculaires de PCR-  
RFLP et de PCR-RFLP-SSCP dans l'étude de la  
différenciation génétique de deux Huîtres creuses:  
*Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata***



*Mars-mai 1998*

*Cécile DUFOURG*



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 01313

**Application des techniques moléculaires de PCR\* -RFLP\* et de  
PCR-RFLP-SSCP\* dans l'étude de la différenciation  
génétique de deux Huîtres creuses :  
*Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata***

***PCR\** : Polymorphism Chain Reaction**  
***RFLP\** : Restriction Fragment Length Polymorphism**  
***SSCP\** : Single Strand Conformation Polymorphism**

## *REMERCIEMENTS*

---

Je tiens à remercier André Gérard et Jean-Pierre Flassch de m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Merci à Pierre Boudry, mon responsable de stage pour l'encadrement scientifique dont j'ai bénéficié au cours de ces trois mois.

Un merci tout particulier à Sylvie, la future maman, pour ses précieux conseils tout au long de mon stage.

Je remercie également Arnaud qui m'a aidée aux nombreuses relectures de mon rapport et qui m'a gracieusement permis d'utiliser ses résultats.

Enfin, je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe du laboratoire pour leur grande disponibilité et l'ambiance décontractée qui a facilité mon travail.

## *AVANT-PROPOS*

---

Ce stage a été réalisé au sein du Laboratoire Génétique, Aquaculture et Pathologie de la station IFREMER de Ronce-les-Bains. Son objectif était double:

Tout d'abord, il m'a donnée un avant-goût du travail de recherche et la possibilité d'apporter ma contribution dans le cadre d'un programme de recherche lancé au laboratoire.

Il m'a permis également de juger mes capacités d'intégration à un groupe de travail et de m'initier aux diverses manipulations en laboratoire de biologie moléculaire.

Ce stage m'a appris les précautions multiples à prendre au cours des manipulations de biologie moléculaire. Celles-ci sont indispensables pour l'obtention de bons résultats mais aussi pour le bon fonctionnement du laboratoire.

# SOMMAIRE

---

	<i>Page</i>
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>II. MATERIEL ET METHODES</b>	4
II.1. Matériel génétique.....	4
II.2. Matériel biologique : Présentation des populations échantillonnées .....	4
II.3. Méthodes expérimentales mises en oeuvre .....	5
II.3.1. Techniques utilisées	5
II.3.1.1. Extraction de l'ADN.....	5
II.3.1.2. Technique de PCR (Polymerase Chain Reaction).....	6
II.3.1.3. Etude du polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP) de la séquence codant pour la COI.....	6
II.3.1.4. La technique de PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism).....	7
II.3.1.5. Les migrations.....	8
II.3.1.6. Détermination de la température d'hybridation d'une paire d'amorces.....	9
II.3.2. Méthodes de construction d'arbres phylogénétiques.....	9
II.3.2.1. Analyse des marqueurs microsatellites : les <i>F</i> -statistiques.....	9
II.3.2.2. Analyse PCR-RFLP des marqueurs mitochondriaux.....	11
II.3.2.3. Construction des arbres phylogénétiques.....	11
<b>III. RESULTATS</b> .....	12
III.1. Etude des marqueurs microsatellites.....	12
III.2. Etude du polymorphisme au niveau des séquences du gène codant pour la cytochrome oxydase .....	13
III.2.1. Les profils de restriction.....	13
III.2.2. Les haplotypes.....	14
III.3. Apports des gels de polyacrylamide.....	15
III.4. La technique de PCR-SSCP.....	17

<b>IV. INTERPRETATION</b> .....	18
IV.1. Origine évolutive des 2 taxons : analyses des arbres phylogénétiques.....	18
IV.2. Apports des gels de polyacrylamide 8% dans l'étude PCR-RFLP.....	19
IV.3. La technique de PCR-RFLP.....	19
<b>V. CONCLUSION</b> .....	21

## I. INTRODUCTION

---

Les mollusques forment un embranchement extrêmement diversifié divisé en 7 classes dont les 3 principales sont les gastéropodes, les lamellibranches (ou bivalves) et les céphalopodes. Les huîtres, mollusques de la classe des lamellibranches, présentent une importante biodiversité. Leur classification en espèces et groupes d'espèces est de ce fait complexe et sujette à de nombreuses controverses. Les huîtres creuses se divisent en deux genres : *Saccostrea* et *Crassostrea*. Ce dernier réunit une vingtaine d'espèces. Deux de ces taxons, *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* (annexe 1), font l'objet de très nombreux programmes de recherche du fait de leur importance économique majeure.

Les huîtres creuses *Crassostrea angulata* ont été importées des côtes portugaises dès 1868 et ont remplacé l'huître plate indigène *Ostrea edulis* sur le littoral français, (COCHARD et DARDIGNAC, 1977) (Annexe 2). Elles sont alors cultivées de façon intensive jusqu'en 1966. Présentant une forte sensibilité à un iridovirus provoquant la "maladie des branchies", elles furent frappées par de fortes mortalités dès 1967 (COMPS 1970, DELTREIL 1973). Face à ce déclin, les stocks furent reconstitués par l'importation d'une nouvelle espèce *Crassostrea gigas* (nommée l'huître creuse japonaise) de 1966 jusqu'en 1972 dans le bassin de Marennes Oléron à la suite d'un voyage personnel au Japon (BARRE 1981, GRIZEL et HERAL, 1991). L'homme a ainsi mis en contact deux taxons qui étaient à l'origine géographiquement isolés.

D'importantes études ont été menées sur la distinction entre les populations *Crassostrea angulata* et les populations *Crassostrea gigas* (annexe 3). Les individus appartenant à ces 2 taxons présentent les mêmes caractères morphologiques (coquille, charnière, structure des branchies). De plus, les données physiologiques et écologiques sont similaires pour les deux taxons. Les études génétiques sur les allozymes (BUROCKER *et al.*, 1979; MATHERS *et al.*, 1974; MATTINCCI et VILLANI, 1983) n'apportent pas d'éléments suffisants permettant de les distinguer et concluent à leur forte homologie génétique.

Devant tant de ressemblances, pouvons-nous réellement parler de 2 espèces différentes? D'autant plus que les croisements d'individus *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas* donnent naissance à des hybrides viables et fertiles (BUROCKER *et al.* 1979). Le concept d'espèce, défini par l'ensemble des individus susceptibles d'échanger des gènes est ici remis en cause. Il n'existe aucune barrière reproductive entre les 2 taxons. Aussi Menzel (1974) les considère comme 2 sous-espèces appartenant à l'espèce *C. gigas*, les nommant alors *Crassostrea gigas angulata* et *Crassostrea gigas gigas*.

Thunberg (1793) et Lamarck (1819) ont pourtant défini 2 espèces différentes. Ils observent que les populations naturelles de ces deux taxons présentent une distribution géographique totalement différente. Les individus *Crassostrea angulata* se concentrent au sud de l'Europe, en Espagne, au Portugal et au nord de l'Afrique. Les individus *Crassostrea gigas* ont un foyer naturel asiatique (Japon, Corée et

Taiwan). Ils ont été récemment introduits par l'homme en Europe de l'Ouest, en Amérique, en Nouvelle Zélande, en Tasmanie et en Afrique de l'Ouest (Annexe 4). Cet isolement géographique est l'argument déterminant dans l'idée de l'existence de deux espèces. Il est en effet considéré comme le premier stade de la spéciation dans la théorie néodarwinisme.

Il existe deux hypothèses expliquant la répartition géographique des deux huîtres.

La première semble dire que l'huître *C. angulata* est présente "depuis des temps immémoriaux" près de Lisbonne (DEAN (1893) d'après COCHARD et DARDIGNAC (1977)). Des amas coquillés datant du VI<sup>ème</sup> millénaire avant J-C ont pu être retrouvés en Bretagne. *C. angulata* aurait pu être introduite au Japon vers le XV<sup>ème</sup> ou le XVII<sup>ème</sup> siècle, pendant les grandes explorations des voyageurs portugais. Ce voyage (ou d'autres par la suite) serait à l'origine du transport (volontaire ou non) de naissain de *C. angulata* fixé aux carènes des navires. On sait, de plus, que l'ostréiculture a débuté au Japon dans la première moitié du XVII<sup>ème</sup> siècle.

La seconde hypothèse donnée par STENZEL (1971) serait que *C. angulata* et *C. gigas* ainsi que *C. cattukensis* rencontrées sur les côtes indiennes seraient issues du fossile *Crassostrea gryphoides* présent au miocène, de la péninsule Ibérique au Japon en passant par l'Asie Mineure. Les bouleversements géologiques auraient provoqué l'isolement de 3 populations, pour donner ces 3 espèces. *C. gigas* et *C. angulata* restent inchangées sur le plan morphologique et sont compatibles sur le plan génétique avec, dans le meilleur des cas 10 millions d'années de séparation.

Ces phénomènes s'inscrivent alors dans des problèmes de spéciation et d'adaptation locale aux milieux.

La présente étude analyse la structure génétique de populations naturelles de *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas* pour déterminer leur niveau de différenciation.

La recherche de marqueurs génétiques a pour objectif d'estimer la variabilité génétique de populations des 2 taxons.

S'agissant alors d'une comparaison entre 2 "sous-espèces" (polymorphisme intra-spécifique), cette étude portera sur l'analyse d'une région codante pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI) de l'ADN mitochondrial a priori peu variable. Cet ADN est transmis selon le principe de l'hérédité maternelle et ne se recombine pas. L'idéal serait de disposer de séquences conservées (qui ne varient pas trop entre individus), qui soient représentatives de la population mais présentant des différences entre espèces. Chez les animaux, l'ADN mitochondrial est très conservé en taille et en structure. Il est de petite taille mais sa séquence évolue à un taux élevé. C'est pourquoi l'étude de cet ADN cytoplasmique a, chez les animaux, permis de décrire de nombreux cas de polymorphismes.

Ces travaux déjà initiés au laboratoire font appel à la technique PCR-RFLP (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) avec migration de l'ADN en gel d'agarose 1% et en gel de polyacrylamide. Nous disposons ici d'un marqueur moléculaire dit diagnostic qui permet de différencier des individus *Crassostrea angulata* et des individus *Crassostrea gigas* (BOUDRY *et al*, sous presse). La COI interagissant de part sa fonction avec d'autres protéines, sa séquence codante se doit d'être relativement constante d'une espèce à l'autre mais elle présente cependant du polymorphisme. Notre étude vise à poursuivre l'analyse de ces marqueurs

mitochondriaux chez différentes populations échantillonnées en vue d'une comparaison avec les résultats déjà obtenus pour ces mêmes individus par l'étude des marqueurs microsatellites effectuée dans le cadre d'une thèse au laboratoire (HUVET. A). Elles permettent la construction d'arbres phylogénétiques représentant les distances génétiques existant entre les différentes populations d'huîtres échantillonnées.

L'apport de deux nouvelles techniques de migration en gel de polyacrylamide dans la détection de ces polymorphismes mais aussi dans la détection de nouveaux marqueurs génétiques sera mis en évidence.

Nous pourrions dans un premier temps comparer pour quelques individus des 2 taxons *C. angulata* et *C. gigas*, la qualité des profils de restriction pour l'étude PCR-RFLP de la séquence codant pour la COI obtenue par migration en gel d'agarose et en gel de polyacrylamide.

Dans un second temps, des études PCR-RFLP sur gel d'agarose portant sur une partie du gène codant pour le 16SrRNA n'ayant pas révélées de polymorphisme (BOUDRY *et al*, sous presse), il sera intéressant d'utiliser cet autre type de gel plus résolutif (gel de polyacrylamide) pour séparer les fragments amplifiés.

En outre, nous essaierons de visualiser par la technique PCR-RFLP en gel d'agarose et en gel de polyacrylamide des substitutions d'une paire de base (pb) au niveau de sites de restriction de l'enzyme *MseI* entre les 2 taxons d'huîtres d'une portion du gène 16S séquencée par O'FOIGHIL (1998).

De plus, une technique basée sur l'étude du polymorphisme des fragments de conformation de l'ADN simple brin (SSCP) est testée au laboratoire dans le but de rechercher du polymorphisme. La SSCP s'appliquerait à de nombreux programmes de recherche aussi bien en génétique qu'en pathologie. En effet, elle permet de détecter des polymorphismes non révélés par d'autres techniques (PCR-RFLP) comme des substitutions d'une seule base.

Elle devrait nous permettre de visualiser les 3 substitutions d'une seule paire de base détectées entre les 2 taxons sur la région du gène 16S séquencée par O'FOIGHI (sous-presse).

## **II. MATERIEL ET METHODES**

---

### **II.1. Matériel génétique**

Un marqueur microsatellite est une séquence d'ADN non génique constituée de courtes séquences nucléotidiques (de 1 à 6 pb) répétées en tandem et généralement dispersées dans le génome eucaryote. Ces séquences sont connues depuis 30 ans (BRITTEN ET KHONE, 1968). Ces locus montrent un important polymorphisme dû à la variation du nombre de répétitions du motif de base. Les séquences répétées sont en général encadrées par des séquences uniques elles-mêmes peu variables appelées séquences flanquantes (Annexe 5). La détermination d'amorces dans ces régions flanquantes permet d'amplifier spécifiquement une séquence microsatellite par PCR. Le gel de polyacrylamide permet une bonne séparation des fragments indispensable pour détecter des différences de 2 paires de bases.

Il est admis pour les microsatellites qu'une mutation intervient par glissement de la polymérase lors de la réplication de l'ADN.

L'examen des individus a été réalisé avec 3 marqueurs microsatellites CG 44, CG 108 et CG 49 mis au point par l'équipe grecque de E. ZOUROS (Intitute of Marine Biologie of Creete).

Les avantages des microsatellites, justifiant leur utilisation grandissante, sont nombreux ; parmi eux:

- le fort taux de polymorphisme (taux de mutation de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-3}$ )
- la codominance (distinction des homozygotes et des hétérozygotes, cf. annexe 5).
- la neutralité (ADN non codant).

La lecture du gel permet de visualiser les allèles (chaque fragment correspond à un allèle). Un nombre de répétition du motif correspond à un allèle, chaque allèle étant séparé d'un autre par une ou plusieurs mutations. Les allèles sont numérotés à partir de 1 pour l'allèle le plus haut avec un incriminant de 2 paires de bases soit 1 motif de répétition (motifs dinucléotidiques). On appelle "allèles nuls" des allèles non détectables en PCR. Les allèles les plus hauts, correspondant à ceux qui ont le moins migré, sont les plus grands. Les individus hétérozygotes pour un locus se distinguent par la présence de 2 fragments amplifiés (annexe 5).

D'autre part, 2 séquences géniques sont étudiées afin de détecter du polymorphisme entre les 2 taxons: la séquence mitochondriale codant pour la COI et le gène 16S.

### **II.2. Matériel biologique : présentation des populations échantillonnées**

L'échantillonnage comprend 5 populations avec une moyenne de 40

individus par population. Les fluctuations du nombre d'individus par population sont dues aux difficultés d'échantillonnage. Le tableau 1 présente les caractéristiques et la répartition géographique des populations.

**Tableau I :** Populations échantillonnées

Population	Taxon prédéterminé	Descriptif (lieu de prélèvement)	Effectif
ARC	Cg	Arcachon, France	50
SEU	Cg	Anse de la Seudre, La Tremblade, France	48
MIR	Ca	Portugal	27
KAO	Cg	Tungkang, Taiwan	40
BOU	Cg	Vieux-Boucau, Landes, France	49

Cg = *Crassostrea gigas*, Ca = *Crassostrea angulata*

Cet échantillonnage comprend 4 populations de type *Crassostrea gigas* et 1 population de type *Crassostrea angulata*. Leur taxon est déterminé suivant des critères taxonomiques et historiques mais non génétiques.

Une sixième population nommée OGA est utilisée dans cette étude. Elle provient des côtes japonaises et correspond à une population homogène d'individus de type *C. gigas* (taxon déterminé sur des critères génétiques, par l'analyse PCR-RFLP de la séquence codant pour la COI).

Les échantillons ont été reçus au laboratoire sous forme de fragments de branchies conservés dans de l'alcool ou bien les animaux vivants ont été fournis et mis en quarantaine au laboratoire puis biopsés.

### **II.3. Méthodes expérimentales mises en oeuvre :**

#### **II.3.1. Techniques utilisées**

##### II.3.1.1. Extraction de l'ADN:

Les extractions de l'ADN sont réalisées au chelex ou préférentiellement au phénol-chloroforme (Annexe 6). Cette dernière technique se divise de 3 étapes:

- La première consiste à lyser les cellules en incubant à 55°C les échantillons de branchies dans une solution d'extraction contenant de la protéinase K pendant 4 heures au minimum.
- La seconde étape comprend une phase de déprotéinisation au phénol. Ensuite, les traces de phénols sont éliminées par ajout de chloroforme.
- La dernière étape consiste à précipiter les acides nucléiques au froid pendant une heure puis à laver le culot avec une solution d'éthanol. Il faut ensuite dissoudre le

**Tableau II:** Les marqueurs microsatellites (amorce S:sens, AS: anti-sens)

Locus	Séquence répétée	Amorces	Tm	Taille du fragment initialement cloné
CG 44	(CA) <sub>13</sub>	S: GAA GAA TGT CAT AGA TTG ATG G AS: CAT GCC TGT TTA CCA GTA TTC	53°C	391 pb
CG 49	(CA) <sub>35</sub>	S: CAT CAG GGG TAA ATT AAA GTA AGC AS: CCA CAG ACG ATT TCA TAT ATC CTG	53°C	194 pb
CG 108	(CA) <sub>18</sub>	S: ATA TGT AAT GAT TAC GAA ACT AS: GTA TGA GAT TTG GTT CCA CC	55°C	228 pb

**Tableau III:** Séquences nucléotidiques des oligonucléotides utilisés pour l'amplification des deux gènes mitochondriaux (16S et gène codant pour la COI ).

Gène amplifié	Séquence nucléotidique des paires d'amorces
COI	LCO 1490: 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3' HCO 2198: 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'

**Tableau IV:** amorces utilisées pour l'amplification du gène 16S

Amorces	Taille des fragments amplifiés
Ar : 5' CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT 3' Br : 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC AGA TCA CGT 3'	510 pb
16S bisA: 5' CTA GCG TGA GGG TGC TAA GG 3' 16S bisB: 5' ATC CCC GGC GTA ACT TCT CC 3'	306 pb

précipité d'ADN dans du TE (cf. Annexe 7).

#### II.3.1.2. Technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) (MULLIS, 1986)

La technique de PCR permet d'amplifier de manière exponentielle une région bien précise du génome. Des oligonucléotides simple brin sont synthétisés et s'hybrident avec la région homologue de l'ADN. A partir de ce point, une ADN polymérase thermorésistante initie la réplication in vitro de l'ADN. Les critères de choix des oligonucléotides sont présentés en annexe 8. Leur séquence est choisie à partir de la séquence de la région d'intérêt ou par alignement de séquences de différentes espèces lorsqu'il s'agit de régions conservées, telles que des régions codantes.

L'amplification des 3 marqueurs microsatellites CG 44, CG 108 et CG 49 est réalisée à l'aide des oligonucléotides présentés dans le tableau II suivant un programme strict (annexe 9 B.). Pour chaque paire d'amorces, une seule est marquée radioactivement par du  $^{32}\text{P}$ .

L'amplification du gène mitochondrial codant pour la COI est réalisée à partir des oligonucléotides HCO et LCO (FOLMER *et al*, 1994), communs à 80 espèces d'invertébrés (Tableau III) suivant un programme d'amplification présenté en annexe 8 B. Ces amorces permettent, entre autre, l'amplification du fragment COI chez les genres *Crassostrea* et *Ostrea* ainsi que chez l'espèce *Mytilus edulis*. La composition de la solution d'amplification est présentée en annexe 9 A. Pour chaque expérience de PCR, nous prendrons soin d'amplifier un témoin positif, c'est à dire un échantillon d'ADN donnant un résultat net et constant. Si celui-ci n'est pas amplifié, on pourra en déduire un problème de manipulation.

Le gène 16S est amplifié par 2 paires d'amorces différentes (Tableau IV). La première a déjà été le sujet d'une étude de PCR-RFLP en gel d'agarose dans ce laboratoire. Aucun polymorphisme entre les 2 taxons d'huîtres creuses n'a pu être détecté (BOUDRY *et al*, sous presse). La seconde paire d'amorces a été déterminée à partir du séquençage du gène 16S chez des individus *C. angulata* et des individus *C. gigas* effectué par O'FOIGHIL (sous presse) en respectant les critères de 60% de GC, et l'absence de polyA ou de polyT à l'extrémité 3'.

#### II.3.1.3. Etude du Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP) de la séquence codant pour la COI

La technique PCR-RFLP est l'association entre les techniques d'amplification et d'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restriction. D'un point de vue technique, la méthode RFLP est utilisée pour refléter directement des variations dans la séquence primaire de l'ADN. Cette technique a permis d'observer de nombreuses variations à différentes échelles taxonomiques de la population à l'espèce. Elle est facilitée par la possibilité d'obtenir

**Tableau V:** les 2 substitutions au niveau des sites TTAA de restriction de MseI. (↓: coupure par MseI)

Individus <i>C.angulata</i>	$\downarrow$ TTAA..... TTGA 118 215
Individus <i>C.gigas</i>	TTGA..... $\downarrow$ ... TTAA 118 215

**Tableau VI:** Taille des fragments digérés par MseI calculé à partir de la séquence du fragment amplifié sachant que les amorces utilisées amplifient le fragment du nucléotide 43 au 348.

	<i>C. angulata</i>	<i>C. gigas</i>
	174	133
Taille des fragments (pb)	65	67
	56	65
	11	11

un nombre considérable de copies d'une séquence cible d'ADN grâce à la technique de PCR.

La composition de la solution de digestion est présentée en annexe 10 A.

Les molécules d'ADN extraites chez les individus des 5 populations sont amplifiées avec les amorces HCO et LCO puis digérées par 4 enzymes de restriction *TaqI*, *HhaI*, *Sau3A* et *MseI*, dont les sites spécifiques de coupure sont représentés en annexe 10 B.

L'étude PCR-RFLP du gène 16S est réalisée sur 9 à 10 individus de chaque taxons (population MIR pour les individus *C. angulata* et population OGA provenant des côtes japonaises pour les individus *C. gigas*).

Dans un premier temps, l'étude PCR-RFLP portera sur les fragments amplifiés par les amorces Ar et Br puis digérés par les enzymes de restriction *HaeIII*, *Sau3A*, *RsaI* et *HhaI*. La révélation des fragments digérés se fera en gel de polyacrylamide 8%.

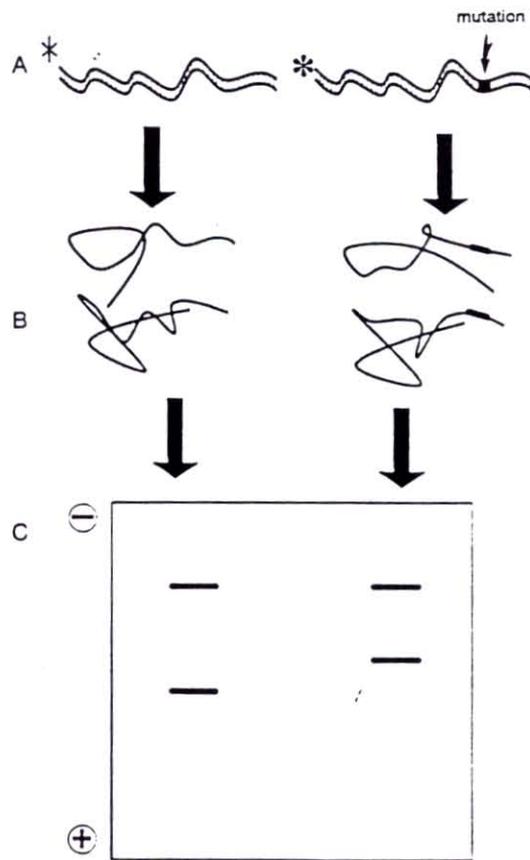
Dans un second temps, cette étude portera sur l'amplification du gène 16S par les nouvelles amorces 16SbisA et 16SbisB. D'après la comparaison des séquences obtenues pour les 2 taxons, nous avons détecté 2 substitutions d'une paire de base au niveau de 2 sites de restriction de l'enzyme *MseI* (Tableau V). La taille des fragments digérés attendus pour chaque taxon est présentée dans le tableau VI. L'intérêt de la migration en gel de polyacrylamide va être de visualiser ces polymorphismes existant entre les 2 taxons.

Dix  $\mu$ l de produits PCR sont digérés par 10 $\mu$ l de solution de digestion (annexe 10.A). Après 2h de digestion au bain-marie à la température optimale de l'enzyme (annexe 10 B), la totalité est déposée en gel d'agarose 1% ou en gel de polyacrylamide.

#### II.3.1.4. La technique de PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)

Cette technique consiste à déposer en gel de polyacrylamide des fragments d'ADN préalablement dénaturés. Les 2 molécules simple brin produites par la dénaturation de l'ADN bicaténaire adoptent chacune en se renaturant une structure secondaire (conformation) qui est dépendante de leurs séquences nucléotidiques. Ainsi, entre 2 fragments d'ADN dont les séquences ne diffèrent que par la substitution d'une seule paire de base, il peut apparaître des polymorphismes de structure secondaire après dénaturation. La SSCP est une méthode d'électrophorèse dont le but est de révéler ces éventuels polymorphismes, et donc de détecter d'éventuelles variations de séquence nucléotidique entre différents individus.

Après amplification par PCR, la molécule à analyser est dénaturée par chauffage. Les échantillons sont maintenus dans une solution limitant la renaturation. Chacun des 2 brins peut alors adopter une conformation particulière. Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant. 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 donc plus seulement de sa taille, mais aussi de sa structure secondaire et donc de sa séquence



**Figure 1 Principe de la SSCP.** L'échantillon à analyser est traité en parallèle avec un ADN standard. Tous deux sont amplifiés (A). Ils sont ensuite dénaturés et chargés sur gel (B). La présence d'une mutation entraîne dans cet exemple précis un décalage de position sur une seule des deux bandes produites par la dénaturation (C).

Depuis quelques années la technique de Conformation de l'ADN Simple Brin a fait son apparition. Elle est utilisée couramment pour la détection de petites mutations de l'ADN humain. Récemment, elle a été appliquée à l'identification des relations génétiques entre espèces et populations différentes chez les animaux.

La technique est ici appliquée sur des fragments amplifiés du gène 16S. La séquence du gène 16S amplifié par la paire d'amorces 16SbisA et 16SbisB est utilisée pour la mise au point de la technique. Sa séquence nucléotidique étant connue chez les individus *C. angulata* et *C. gigas*, 3 substitutions d'une paire de base ont été repérées. L'objectif est alors de visualiser ces 3 mutations d'une paire de base entre les 2 taxons à l'aide de la technique SSCP.

Le fragment est amplifié avec les amorces 16SbisA et 16SbisB pour une dizaine d'individus de chaque type (10 OGA + 10 MIR).

Deux  $\mu\text{l}$  d'ADN sont amplifiés par  $8\mu\text{l}$  de solution d'amplification. Dix  $\mu\text{l}$  de bleu dénaturant sont ajoutés à  $10\mu\text{l}$  de produit PCR. L'ADN est ensuite dénaturé 6 minutes à  $94^{\circ}\text{C}$ . Les échantillons sont ensuite conservés dans de la glace le temps du dépôt pour éviter la renaturation des molécules simple brin. La migration se fait à 180V, 500mA pendant 15h.

#### II.3.1.5. Les migrations

Les molécules d'ADN étant chargées négativement, elles sont attirées lors d'une électrophorèse par la borne positive du gel. Les différents fragments vont alors migrer à travers les mailles du gel. Ils sont ainsi séparés selon leur poids moléculaire puisque les fragments les plus petits migrent plus vite que les gros.

L'ADN est alors visualisé en utilisant du BET (Bromure d'Ethidium), molécule absorbant dans l'ultraviolet qui s'intercale entre les bases des molécules d'ADN. A l'intérieur de celles-ci, les molécules de BET sont toutes orientées dans la même direction et sont plus fluorescentes. Cela nous permet d'observer les fragments d'ADN dans le gel.

Pour évaluer la taille des molécules d'ADN, un marqueur de taille est utilisé (mid 1). Il génère des fragments allant de 100 à 1000 pb, toutes les 100 pb.

Le contrôle des amplifications par PCR est réalisé en gel d'agarose 1%. Pour cela, 5  $\mu\text{l}$  d'amplifiats ajoutés à 1 $\mu\text{l}$  de bleu de charge sont déposés dans les puits. La migration se fait dans une petite cuve pendant 30 minutes à 100 mV.

Pour l'étude PCR-RFLP, la totalité des produits de la digestion est déposée en gel d'agarose 1%. La migration est réalisée à 150V pendant 1h30, dans une grande cuve. Le BET est ajouté dans le gel d'agarose avant qu'il soit coulé, avec une concentration de  $50\mu\text{l l}^{-1}$ .

La composition d'un gel de polyacrylamide est décrite en annexe 11. Il est coulé à l'intérieur de 2 plaques de verre séparées par des "espaceurs" qui déterminent l'épaisseur du gel. La migration se fait de façon verticale. La durée de la migration

dépend de la taille des fragments à séparer et des conditions d'électrophorèse (tableau VII). Un cryostat permet de maintenir le tampon de migration et le gel à la température désirée.

**Tableau VII :** Conditions de migration en gel de polyacrylamide pour les techniques PCR-RFLP et PCR-SSCP.

	<b>PCR-RFLP</b>	<b>PCR-SSCP</b>
<b>Tampon de migration</b>	TBE 1X	TBE 0.6X
<b>Conditions d'électrophorèse</b>	300mv 500A	180mV 500A
<b>Durée de la migration</b>	1h30 à 3h	16h
<b>Température de migration</b>	18°C	10°C

#### II.3.1.6. Détermination de la température d'hybridation d'une paire d'amorces

Lors de la première utilisation de la nouvelle paire d'amorces amplifiant le gène 16S (amorces 16SbisA et 16SbisB), il faut déterminer la température optimale d'hybridation de ces amorces ( $T_m$ ). Pour cela, un test est mis en place sur 2 individus en utilisant un appareil à PCR particulier : le robocycler. Celui-ci dispose d'un bras rotatif portant les échantillons et de 4 blocs réglés sur des températures différentes:

- 6°C pour le bloc 1: conservation des échantillons à la fin de la PCR
- 94°C pour le bloc 2: température de dénaturation de l'ADN
- Gradient de 50°C à 60°C tous les 2°C pour le bloc 3: température d'hybridation des amorces.
- 72°C pour le bloc 4: température d'élongation.

Ce test nous permet de comparer les résultats d'amplification obtenus pour différentes  $T_m$ .

### II.3.2. Méthodes de construction des arbres phylogénétiques:

#### II.3.2.1. Analyse des marqueurs microsatellites: les $F$ -statistiques

- Le traitement des données microsatellites fait appel aux  $F$ -statistiques, ensemble d'outils mathématiques mis au point par Wright (1951).

La notion de structure ou de différenciation entre populations peut englober toute une série de caractéristiques mais c'est en fait l'isolement géographique qui nous intéresse. Les  $F$ -statistiques permettent de mesurer cette structuration.

L'étude de Wright pose le problème en terme d'approche de la fixation d'un allèle. Cette fixation peut être observée dans 2 cas:

- pour une population de taille finie, les fréquences des 2 allèles d'un locus vont varier par le simple jeu du hasard et aboutir à la fixation d'un des 2 allèles
- pour une population dans laquelle les croisements ne se font pas au hasard mais plutôt entre apparentés. Ce régime de reproduction entraîne l'augmentation du nombre d'homozygotes et la diminution des hétérozygotes.

Notre étude concerne un ensemble de populations partiellement isolées dans lesquelles il peut y avoir des écarts à la panmixie. S'il y a des migrants entre populations, ils ralentiront la fixation.

Wright définit 3 indices:

- **Fis** : il mesure la part du déficit total en hétérozygotes présent à l'intérieur d'une population.  
Il représente l'indice de fixation au niveau d'une sous-population.  
Il mesure l'écart à l'équilibre de Hardy Weinberg (HW) (HARDY, 1908; WEINGERG, 1908) au niveau de chaque échantillon.
- **Fit** : il représente l'indice de fixation au niveau d'une population totale.  
Il mesure, lorsqu'on regroupe tous les échantillons que l'on a, les écarts à l'équilibre de HW.
- **Fst** : il mesure la part du déficit en hétérozygote total due à la structure en sous-populations.  
Il mesure la part du Fit qui n'est pas due à 1 écart à HW (au sens intra-populationnel) mais celle qui correspond à l'effet Wahlund (toutes les populations sont à l'équilibre de HW, mais le mélange entraîne un écart à HW).

Il démontre alors les formules:

$$Fst = (Fit - Fis) / (1 - Fis) \quad \text{ou} \quad 1 - Fit = (1 - Fis) (1 - Fst)$$

Si les populations échangent un grand nombre de migrants entre elles à chaque génération, elles auront tendance à s'homogénéiser les unes les autres. Chaque population sera équivalente aux autres mais aussi à l'ensemble des populations. Fis et Fit seront égaux en valeur. Alors:

- **Fst=0**  $\Leftrightarrow$  les sous-populations se comportent comme une seule population.
- **Fst=1**  $\Leftrightarrow$  les populations ont fixé des allèles différents.

L'approche de Weir et Cockerham permet d'obtenir les valeurs des Fst. L'indice Fst (Theta de Weir et Cockerham, 1984) est calculé à l'aide du logiciel Genetix version 3.0 (Belkhir *et al*, 1996) à partir des allèles détectés pour chacun des 3 locus microsatellites, pour chaque individu des 5 populations..

Cette approche étudie la variance des fréquences géniques dans les populations et les

composantes intra et inter populationnelles de cette variance. Il propose de faire une analyse de la variance sur les fréquences des allèles dans une population:

a: composante de la variance au niveau de la population totale

b: composante de la variance due à l'existence de sous-populations

c: composante de la variance due aux corrélations existants entre gamètes au niveau des individus.

Alors:

$$F_{st} = a / (a+b+c) = a/V; \quad V = a+b+c;$$

Ces auteurs montrent que le  $F_{st}$  permet de mesurer une "distance génétique à court terme".

- Une fois que la valeur du  $F_{st}$  est obtenue, il reste à déterminer si elle est statistiquement différente de 0.

Une approche classique est basée sur une technique de rééchantillonnage aléatoire des locus à plusieurs reprises (méthode par **bootstrap**). Elle permet d'obtenir plusieurs estimations du paramètre et donc de construire un intervalle de confiance comprenant par exemple 95% des calculés.

- Puis, une matrice de distances (Cavalli-Sforza et Edwards, 1967) est calculée à partir du logiciel Genetix (Génome et Populations).

#### II.3.2.2. Analyse PCR-RFLP de marqueurs mitochondriaux:

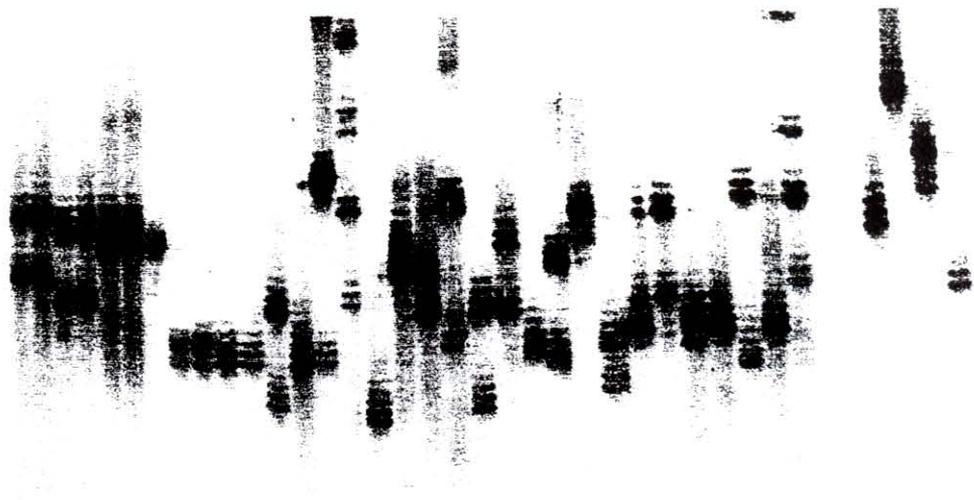
Les résultats de l'étude du polymorphisme des séquences codant pour la COI se présentent sous la forme de fréquences d'haplotypes (déterminés à partir des profils de restriction obtenus par l'étude PCR-RFLP) calculées pour chaque population .

A partir de ces fréquences, une matrice de divergence nucléotidique est obtenue par le logiciel REAP. Elle mesure la disparité existant entre les populations.

#### II.3.2.3. Construction des arbres phylogénétiques:

Les 2 arbres sont construits par la technique UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages) à l'aide des logiciels Phylip (Felsenstein, 1993) et Treeview (Page, 1996), à partir des matrices de distances génétiques.

Elle analyse les distances entre groupes d'OTUs (Unité Taxonomique Opérationnelle). La distance génétique la plus petite de la matrice est repérée. Les 2 populations concernées ou OTUs sont alors associés, réunis au niveau d'un premier noeud sur un axe à la distance appropriée (distance de la matrice / 2). L'arbre est ensuite construit de proche en proche.



**Figure 2 :** Exemple de gel obtenu lors de l'étude des marqueurs microsatellites (locus CG 108)

### III. RESULTATS

#### III.1. Etude des marqueurs microsatellites:

La figure 2 présente un gel obtenu par amplification du locus CG108. Les numéros des allèles obtenus pour chaque individu pour les 3 locus sont traités par le logiciel Genetix. Les indices  $F_{st}$  ainsi que les résultats des tests de significativité sont présentés dans le tableau IIX.

**Tableau IIX:** Polymorphisme inter-populations, calculs des  $F_{st}$  (Theta de Weir et Cockerham, 1984) multilocus par paires de populations et test de significativité

	SEU	KAO	MIR	BOU
ARC	0.00272 NS	0.02926 **	0.03775 **	0.01145 **
SEU		0.02375 **	0.03493 **	0.00630 NS
KAO			0.01877 **	0.02001 **
MIR				0.02899 **

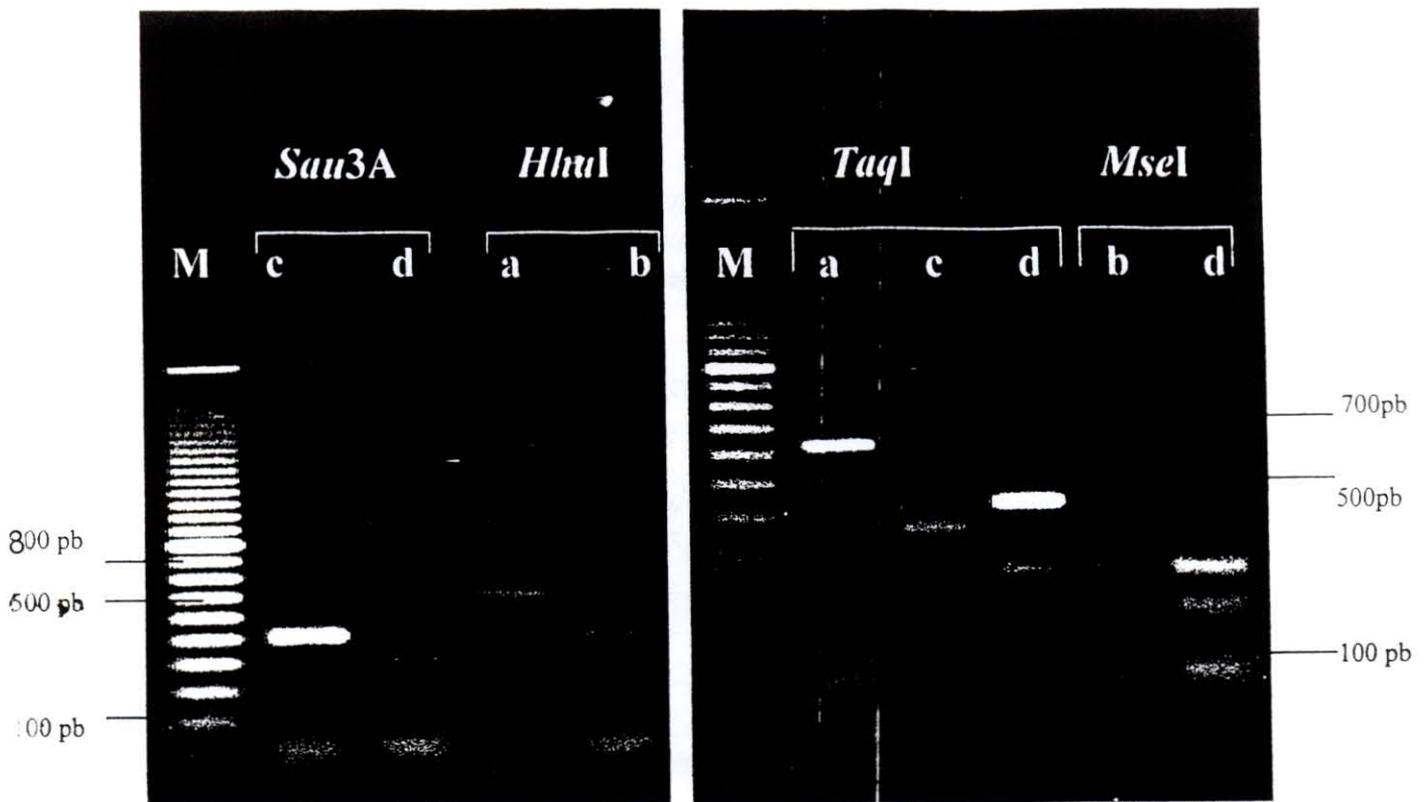
\*\* très significatif, \* significatif, NS non significatif

**Tableau IX:** Matrice de distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) pour les 5 populations ARC, SEU, KAO et MIR.

	ARC	SEU	KAO	MIR	BOU
ARC	0.000	0.014	0.046	0.049	0.027
SEU		0.000	0.047	0.050	0.024
KAO			0.000	0.029	0.040
MIR				0.000	0.043
BOU					0.000

Le calcul d'une matrice de distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) a permis la réalisation avec le logiciel TreeView d'un arbre illustrant les relations génétiques entre les 5 populations étudiées (figure 3).

La construction d'un arbre phylogénétique est réalisée suivant la méthode UPGMA. Son principe est simple. La distance génétique la plus petite se trouve entre les populations ARC et SEU. Les OTUs impliqués sont associés en un premier noeud, séparés d'une distance de  $d = 0.007$  (la somme des branches connectant les 2 populations est alors  $d = 0.014$ ). Puis, la plus petite distance après 0.027 est  $d = 0.027$ , entre les populations ARC et BOU. La population ARC est déjà rassemblée avec la population SEU. La population BOU ne peut donc pas être directement nouée avec ARC mais sur le noeud qui relie les populations ARC et SEU. La distance arithmétique entre BOU et le groupe ARC-SEU est déterminée par :  $d = (0.027 + 0.024) / 2 = 0.0255$ . Ils seront alors séparés sur l'arbre d'une distance  $d = 0.0255 / 2 = 0.01275$ . Puis vient la distance entre KAO et MIR ( $d = 0.029$ ). Ils



**Figure 4** : migration en gel d'agarose 1% de fragments COI amplifiés par les amorces HCO et LCO puis digérés par: *Sau3A* profil de restriction de type c (individu ARC) et de type d (individu KAO 15); *HhaI* profil de restriction de type a (individu ARC) et de type b (individu BOU 33); *TaqI* profil de restriction de type a (individu d'une population Taiwanese identifiée nommée KEE), de type c (individu MIR) , et de type d (individu ARC); *MseI* profil de restriction de type b (individu MIR) et de type d (individu ARC); M: marqueur de taille (mid 1).

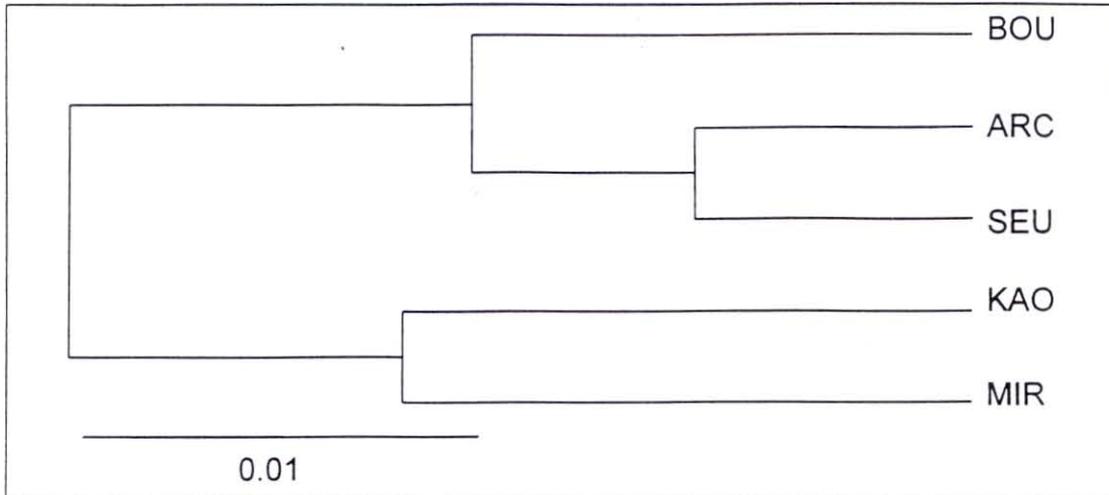
**Tableau X**: Différents profils de restriction obtenus par la digestion des fragments amplifiés COI avec les quatre enzymes de restriction: *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI*, *MseI*

Enzyme de restriction	<i>TaqI</i>			<i>Sau3A</i>		<i>HhaI</i>		<i>MseI</i>	
	a	c	d	c	d	a	b	b	d
Taille des fragments en pb	660	380 280	430 280	520 150	400 150	710	525 125	285 160 125	285 220 125

sont alors séparés sur l'arbre d'une distance  $d = 0.0145$ .

Il reste alors à réunir le groupe ARC-SEU-BOU avec le groupe KAO-MIR. Le niveau de regroupement est déterminé par la distance :

$d = (0.046+0.047+0.040+0.049+0.050+0.043) / 6 = 0.0458$ . Le noeud se trouvera alors à une distance de  $0.0458/2 = 0.0229$ . L'arbre final obtenu est présenté figure 3.



**Figure 3:** Arbre construit par UPGMA illustrant les distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) obtenues à partir des 3 locus microsatellites étudiés (représentation de type phylogramme ou dendrogramme, réalisée avec le logiciel TreeView)

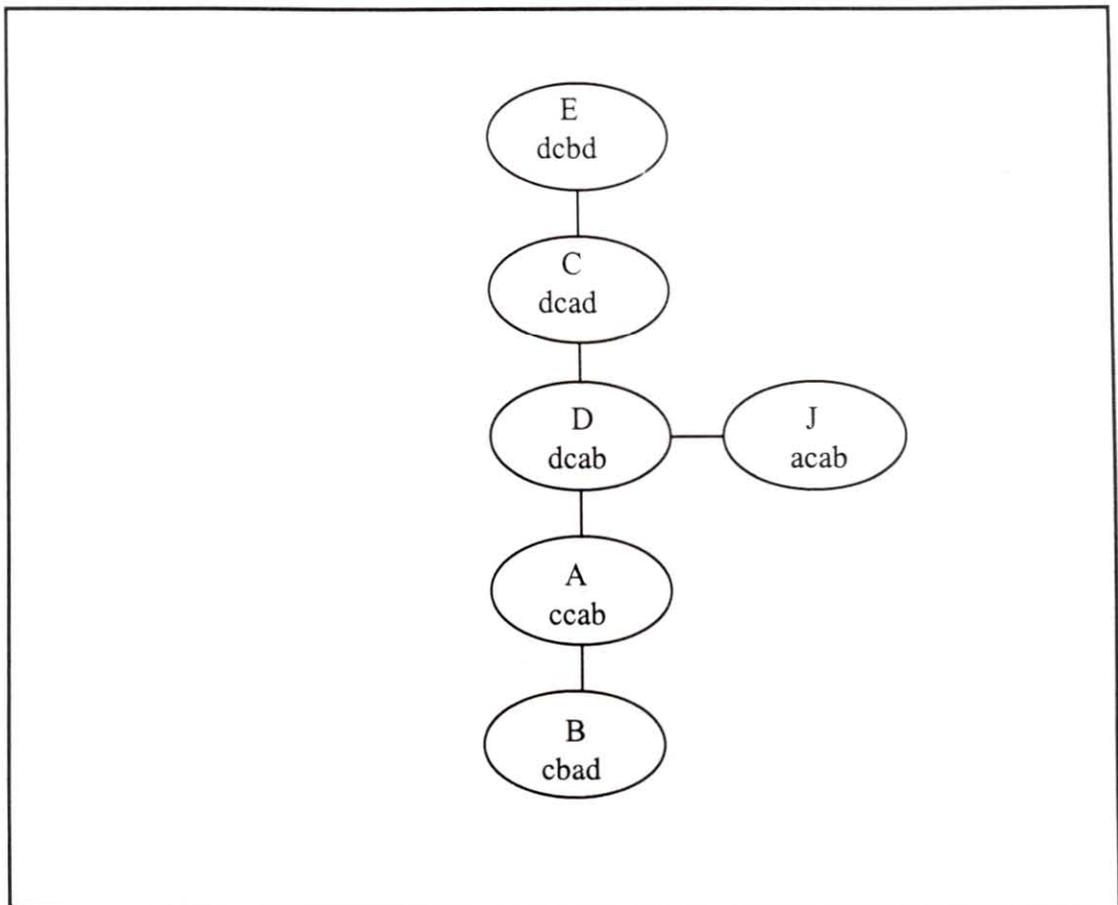
## III.2. Etude du polymorphisme au niveau des séquences du gène codant pour la cytochrome oxydase

### III.2.1. Les profils de restriction

Les 4 enzymes de restriction *TaqI*, *HhaI*, *Sau3A* et *MseI* coupent le fragment amplifié par les amorces HCO et LCO et montrent du polymorphisme (figure 4). Des différences de profils de restriction sont observées entre individus d'espèces *C. angulata* et *C. gigas* (polymorphisme inter-population), mais aussi entre individus d'une même population (polymorphisme intra-population). La figure 4 présente les 4 profils de restriction obtenus par les 4 digestions pour chaque individu analysé.

Les profils de restriction obtenus par digestion avec les 4 enzymes sont décrits dans le tableau X. Les différences entre types de profils peuvent être dues à:

- la présence ou l'absence de coupure due à une mutation au niveau du site de restriction (substitution de 1 ou plusieurs bases, ou délétion de 1 ou plusieurs bases). C'est le cas des types a et b de digestion par *HhaI*.
- une différence dans la taille des fragments de restriction. Cette variation correspond à une mutation de longueur (insertion ou délétion) en dehors du site. Ce type de mutation paraît improbable au niveau des régions étudiées.



**Figure 5:** Relations phylogénétiques entre les 6 haplotypes obtenus par l'étude RFLP d'huîtres *C.angulata* et *C.gigas*, d'après Boudry et al, sous presse). Les différents haplotypes sont définis par la combinaison des 4 profils de restriction obtenus respectivement par digestion avec les enzymes *TaqI*, *HhaI*, *Sau3A* et *MseI*.

### III.2.2. Les haplotypes:

On appelle haplotype une combinaison des profils de restriction obtenus par digestion avec les enzymes *TaqI*, *HhaI*, *Sau3A* et *MseI*, possible pour un ensemble d'individus (population ou sous-population). Il apparaît alors au sein des populations des sous-ensembles d'individus ayant les mêmes profils de restriction pour les 4 enzymes. Ils forment des haplotypes. Pour chaque individu, 4 profils de restriction sont obtenus (profils de restriction provenant de la digestion par *TaqI*, *HhaI*, *Sau3A* et *MseI* chez 1 individu). On peut alors retrouver son haplotype par la combinaison des profils de restriction obtenus par la digestion avec les 4 enzymes. Six haplotypes ont pu être décrits (BOUDRY, sous presse) (figure 5).

Ainsi, prenons l'exemple d'un individu présentant un profil de restriction de type "d" pour *TaqI*, "c" pour *HhaI*, "a" pour *Sau3A* et "d" pour *MseI*. La combinaison de ses 4 profils de restriction est, respectivement "dcad." D'après la figure 5, à cette combinaison correspond l'haplotype symbolisé par la lettre "C".

L'haplotype de chacun des individus analysés est déterminé (annexe 12).

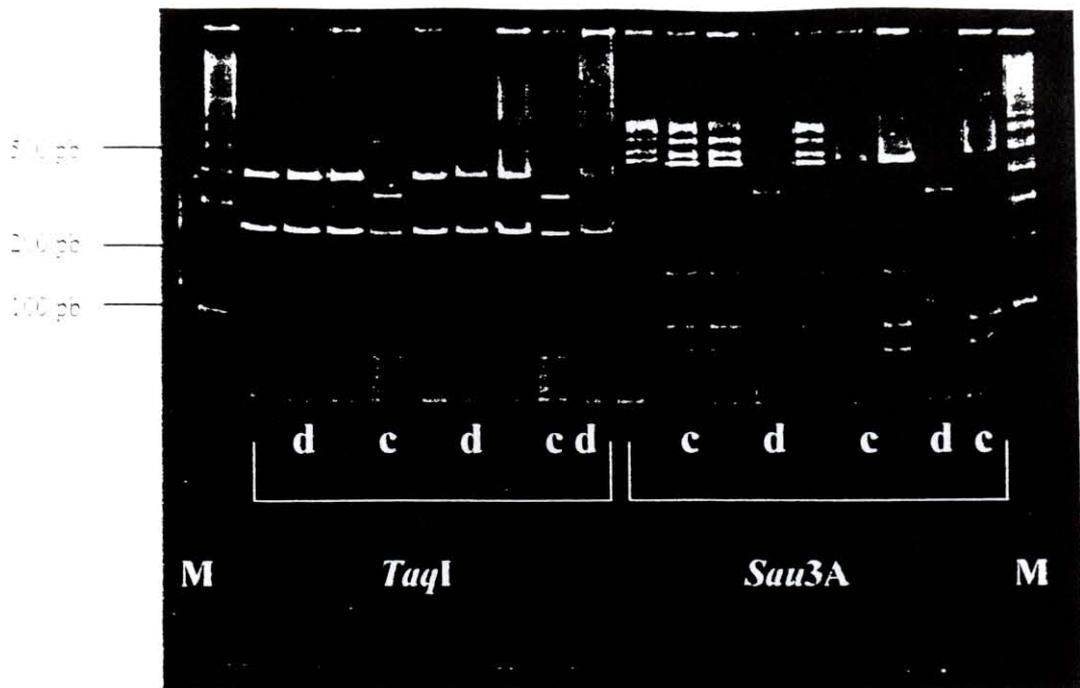
Les 2 haplotypes J et D décrits n'ont pas été rencontrés au cours de l'analyse des 197 individus.

Le tableau XI présente les fréquences de chaque haplotypes par population à partir desquelles a été calculé la matrice des distances.

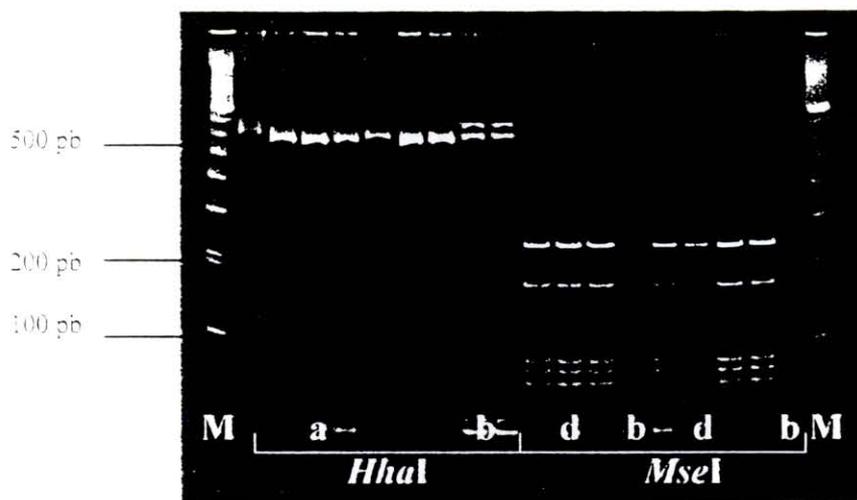
**Tableau XI** : Fréquences observées des différents haplotypes pour les 5 populations.

Population	Haplotype			
	A	B	C	E
ARC	—	—	0.9762	0.0238
SEUDRE	—	—	0.9792	0.0208
MIR	1.000	—	—	—
KAO	0.9000	0.1000	—	—
BOU	0.0800	—	0.9000	0.0200

L'analyse des fréquences des haplotypes a permis la réalisation d'une matrice de divergence nucléotidiques entre les différentes populations (tableau XII). Puis, l'arbre présenté figure 6 a été réalisé d'après la méthode UPGMA. Il représente les relations phylogénétiques entre les populations ARC, SEU, MIR, KAO et BOU déterminées par l'utilisation de ces marqueurs mitochondriaux.



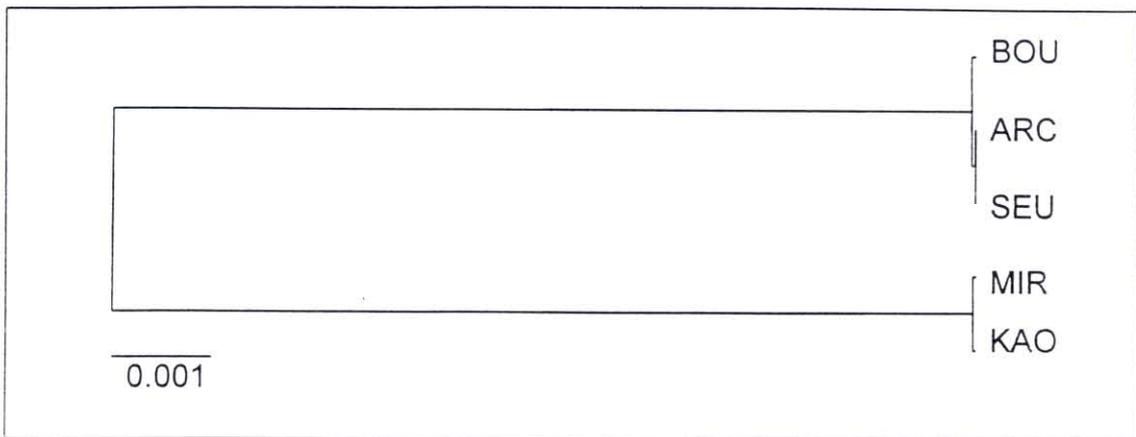
**Figure 7:** Différents types de profils de restriction obtenus par migration en gel de polyacrylamide 8% des fragments codant pour la COI amplifiés avec les amorces HCO et LCO digérés par les enzymes de restriction *TaqI* et *Sau3A* (2h30 de migration).



**Figure 8:** Différents types de profils de restriction obtenus par migration en gel de polyacrylamide 8% des fragments codant pour la COI amplifiés avec les amorces HCO et LCO digérés par les enzymes de restriction *HhaI* et *MseI* (migration 2h30).

**Tableau XII:** Matrice de divergence nucléotidique entre les 5 populations ARC, SEU, MIR, KAO et BOU.

	ARC	SEU	MIR	KAO	BOU
ARC	0.000000	0.000009	0.018511	0.018625	0.000082
SEU		0.000000	0.018513	0.018627	0.000083
MIR			0.000000	0.000057	0.015641
KAO				0.000000	0.015750
BOU					0.000000



**Figure 6:** Arbre construit par la technique UPGMA illustrant les divergences nucléotidiques calculées à partir des données PCR-RFLP mitochondriales du fragment COI (représentation de type phylogramme ou dendrogramme, réalisée avec le logiciel TreeView)

### III.3. Apports des gels de polyacrylamide:

- Profils de restriction de la digestion du fragment amplifié codant pour la COI:

Les différents types de profils de restriction décrits en gel d'agarose obtenus par digestion avec *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI* sont retrouvés en gel de polyacrylamide.

- \* Les deux types b et d de la digestion par *MseI* (figure 7) sont plus facilement reconnaissables en gel de polyacrylamine qu'en gel d'agarose. En effet, ils diffèrent par la position de la seconde bande qui est respectivement de 160 pb et 220 pb. La différence de distance de migration due à ces 60 pb d'écart est très nettement visible en gel de polyacrylamine contrairement au gel d'agarose. Trois bandes de petites tailles ( $\leq 125$  pb) et proches remplacent la bande de 125 pb révélée en gel d'agarose.
- \* Le profil de restriction de digestion par *HhaI* de type b obtenu en gel de polyacrylamide est surprenant (Figure 7). En effet, 2 fragments sont visibles, l'un

au niveau du fragment PCR entier et l'autre au-dessus de celui-ci. On peut supposer que le fragment ayant le moins migré est le fragment entier résultant d'une digestion partielle et que le fragment digéré de 525 paires de bases est au-dessous de celui-ci. Un problème de gel (mauvaise homogénéité, présence de microbulles) peut avoir entraîné cette différence de migration entre les puits. Le deuxième fragment digéré de 125 paires de base est sorti du gel.

- \* Les types c et d de la digestion par *TaqI* (figure 8) sont aussi distincts en gel de polyacrylamine qu'en gel d'agarose.
- \* Dans le cas de la digestion par *Sau3A* (Figure 8) de nombreuses bandes parasites s'ajoutent au profil de restriction décrit en gel d'agarose. Elles proviennent probablement d'une digestion partielle.

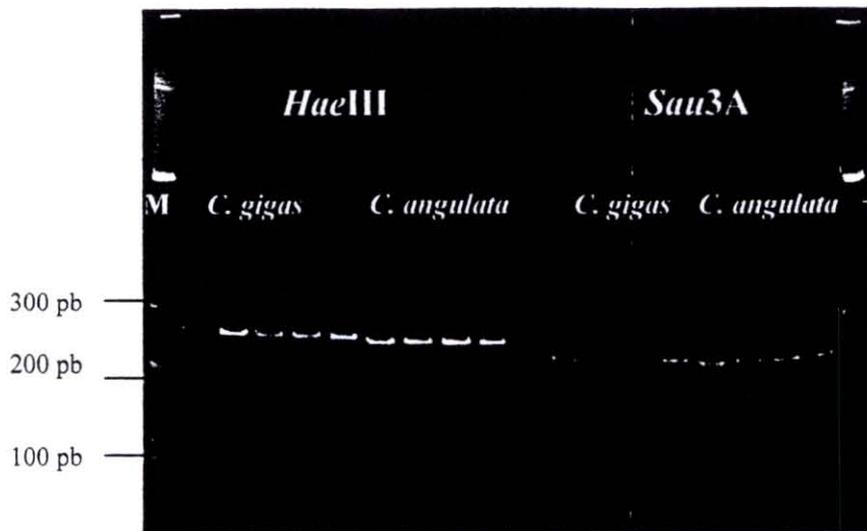
- Profils de restriction de la digestion du fragment 16S:

Le test d'amplification avec un gradient de température au bloc 2 du robocycler montre une intensité des bandes des fragments amplifiés identique pour les 5 Tm. Le programme d'amplification sera alors le même que celui utilisé pour l'amplification avec les amorces HCO et LCO (annexe 9 B).

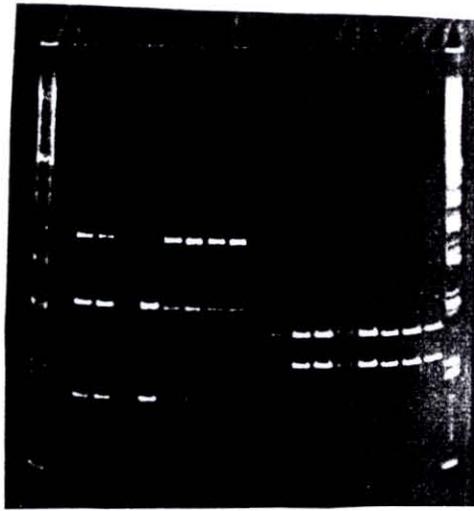
- \* La photographie du gel (figure 9) montre les profils de restriction des digestions par les enzymes *Sau3A* et *HaeIII* du fragment 16S amplifié par les amorces Ar et Br. Une légère différence de distance de migration des fragments de digestion entre les individus *C. angulata* et les individus *C. gigas* peut être détectée. Dans ces deux digestions, le fragment digéré migre plus loin chez des individus de type *C. angulata* que chez des individus *C. gigas*. Cette différence peut aussi ne pas être le reflet d'un polymorphisme entre les 2 taxons mais seulement d'un problème de migration dans le gel.

Aucun polymorphisme n'a été mis en évidence pour les 2 enzymes de restriction *RsaI* et *HhaI* (figure 10).

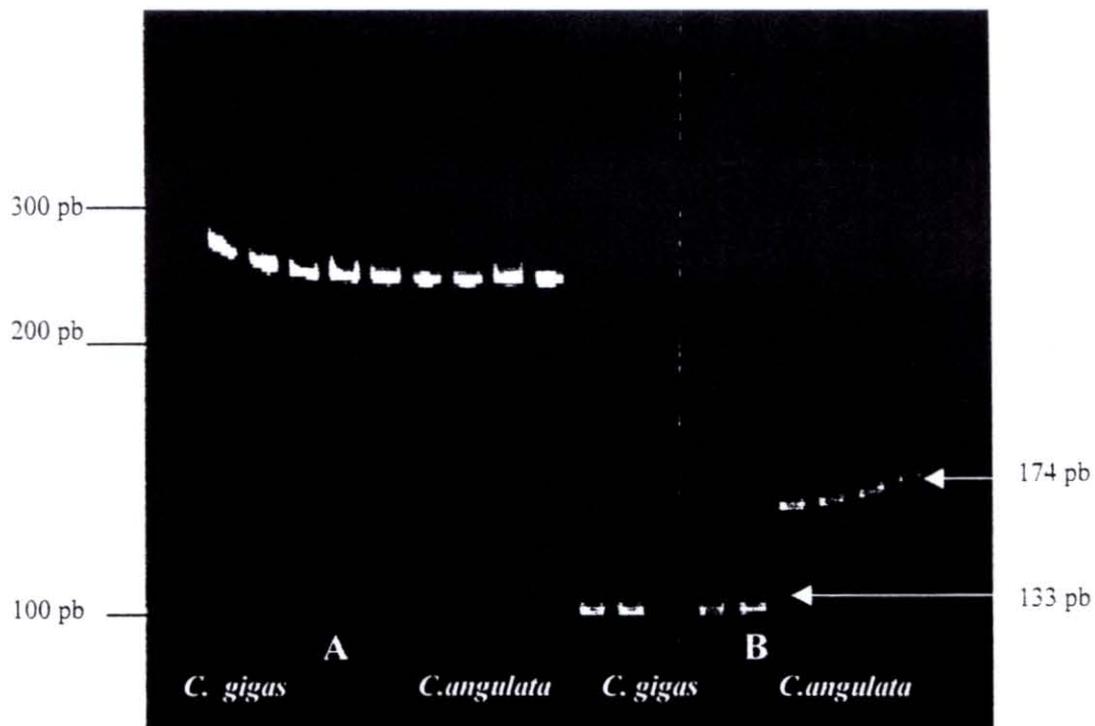
- \* La figure 11 représente les fragments d'amplification du gène 16S d'individus *C. angulata* et *C. gigas* par les amorces 16SbisA et 16SbisB ainsi que les profils de restriction de digestion de ces fragments par *MseI* après 3h30 de migration. Du polymorphisme entre les 2 taxons apparaît nettement au niveau des fragments digérés. La migration en gel de polyacrylamine pendant 1h (figure 12) permet de visualiser la totalité des fragments digérés dont la taille a été estimée d'après la séquence (tableau VI). En gel d'agarose (figure 13), la séparation des fragments est moins nette, car les fragments sont de petite taille (11 pb à 174 pb). De nombreuses bandes parasites de taille supérieure à celle du fragment amplifié apparaissent. N'ayant pas été révélées au cours de la vérification de la PCR en gel d'agarose 1%, la contamination est survenue lors de la digestion. Ces mêmes produits PCR digérés par d'autres enzymes de restriction ne montrant pas de bandes parasites, l'hypothèse d'une mauvaise purification de l'enzyme utilisée ou de contamination de son tampon peut être émise. La reconnaissance du taxon est alors possible en gel de polyacrylamide principalement par la présence des bandes de 174 pb et de 133 pb respectivement chez les individus *C. angulata* et les individus *C. gigas*.



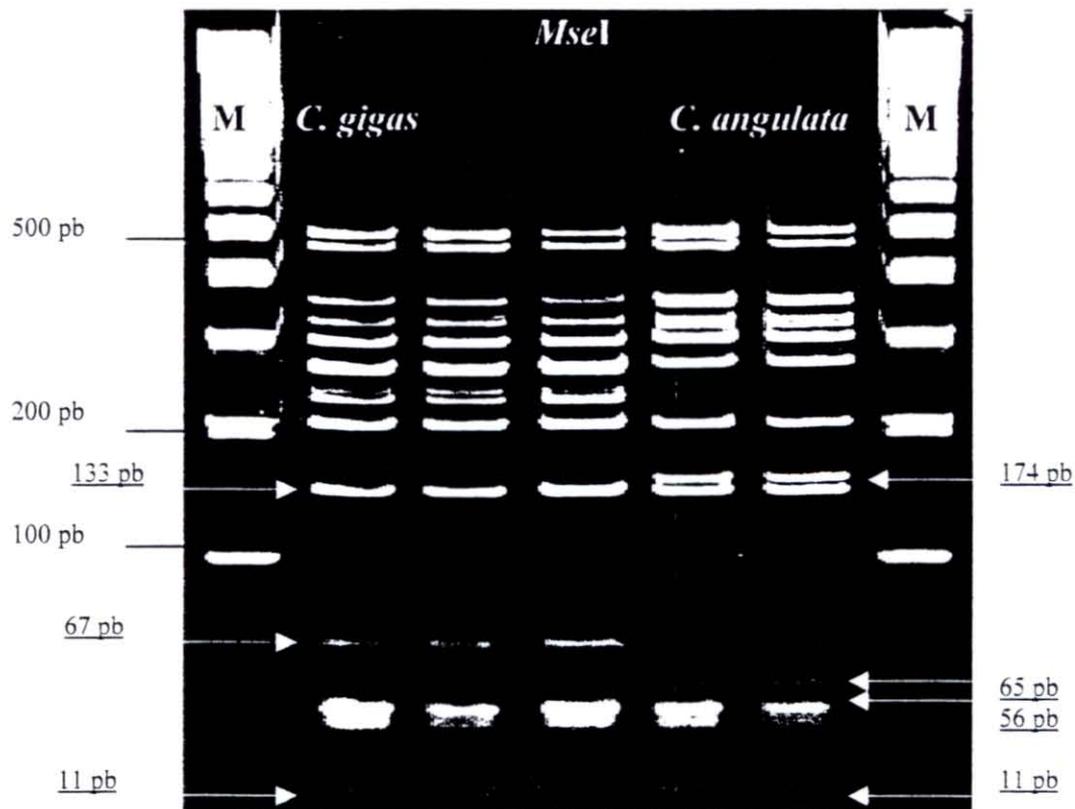
**Figure 9:** gel de migration en polyacrylamide 8% des fragments 16S amplifiés par les amorces Ar, Br et digérés par *HaeIII* (5 individus *C. gigas* de population OGA et 4 individus *C. angulata* de population MIR) et par *Sau3A* (4 individus de chaque taxons); M: marqueur de taille (mid 1).



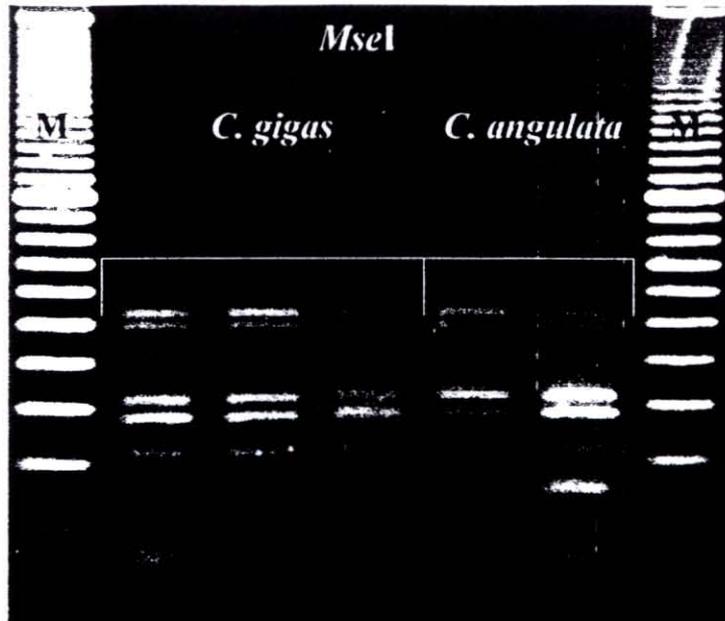
**Figure 10** : Migration en gel de polyacrylamide des fragments 16S amplifiés par les amorces Ar et Br puis digérés par les enzymes de restriction **A** : *RsaI* chez 4 individus *C. angulata* de la population MIR et 4 de type *C. gigas* de la population OGA ; **B** : *HhaI* chez 4 individus *C. angulata* de la population MIR et 5 de type *C. gigas* de la population OGA



**Figure 11:** A: 3h30 de migration en gel de polyacrylamide 8% des produits de l'amplification du gène 16S avec les amorces 16SbisA et 16SbisB chez 5 individus de type *C. gigas* (population OGA) et 4 individus *C. angulata* (population MIR); B: 3h30 de migration de ces mêmes fragments d'amplification digérés par l'enzyme de restriction *MseI*.



**Figure 12 :** migration d'1h en gel de polyacrylamide 8% des produits de l'amplification du gène 16S avec les amorces 16SbisA et 16SbisB digérés par *MseI* chez 5 individus de type *C. gigas* (population OGA) et 4 individus *C. angulata* (population MIR) ; les flèches signalent les fragments de la digestion attendus d'après le séquençage: M : marqueur de taille.

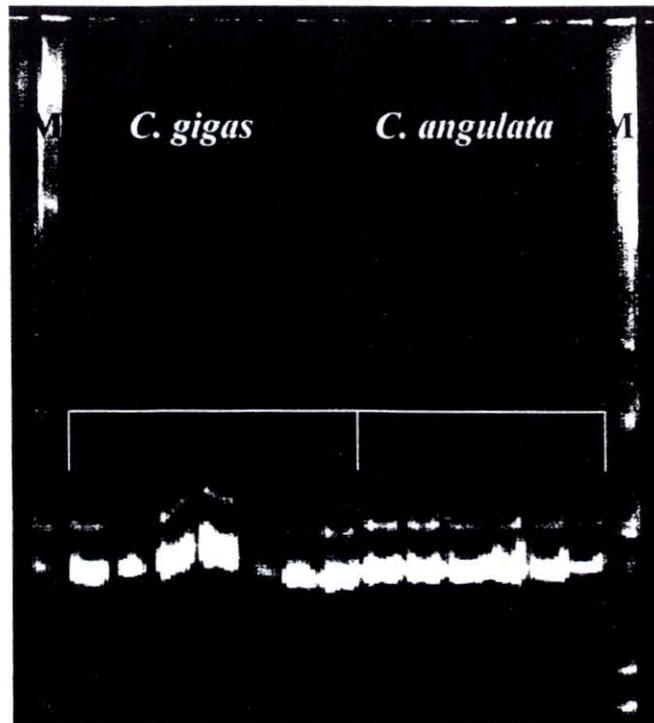


**Figure 13:** migration en gel d'agarose des fragments 16S amplifiés par les amorces 16SbisA et 16SbisB digérés par *MseI* chez 3 individus *C. gigas* (population OGA) et 2 individus *C. angulata* (population MIR); 1h30 de migration à 70V; M: marqueur de taille (mid 1).

### III.4. La technique SSCP

Deux autres gels SSCP ont été réalisés sur les fragments 16S amplifiés par Ar et Br digérés par *Sau* 3A, *Hae*III, *Hha*I et *Rsa*I. Mais un problème au niveau de la renaturation des monobrin a été rencontré. Les gels ressemblés alors à ceux obtenus par migration en gel de polyacrylamide des fragments double brin (figure 9 et 10

La figure 13 correspond à la migration en gel de polyacrylamide des fragments 16S amplifiés par les amorces 16SbisA et 16SbisB puis dénaturés. On observe alors une bande nette dont la taille n'a pu être évaluée, suivie d'une large bande, cachant peut-être le second monobrin. Ils ne sont pas au même niveau pour tous les individus. Deux individus OGA se distinguent particulièrement des autres (distance de migration inférieure).



**Figure 14:** Gel SSCP. Migration en gel de polyacrylamide non dénaturant de fragments 16S dénaturé, amplifiés par les amorces 16SbisA et 16SbisB chez 7 individus *C. gigas* (population ARC) et 6 individus *C. angulata* (population MIR).

## ***IV. INTERPRETATION***

---

### **IV.1. Origine évolutive des 2 taxons: analyses des arbres phylogénétiques.**

Les indices de différenciation génétique entre populations ( $F_{st}$ ) se révèlent faibles. Ils varient de 0,63% entre les populations BOU et SEU à 3,7% entre ARC et MIR. Cependant, la grande majorité des valeurs se révèlent significatives et traduisent donc l'existence d'une réelle différenciation génétique entre populations. Seulement, 2 valeurs sont non significatives, entre les populations ARC et SEU ainsi qu'entre BOU et SEU. Ce sont 3 populations de *Crassostrea gigas* françaises dont l'éloignement géographique ne dépasse 300 kilomètres. Elles sont principalement marquées par des échanges ostréicoles, et les migrants "naturels" entre ces populations ne sont pas exclus. Ces populations présentent un fort taux de fécondité. Leur cycle de développement contient une phase larvaire libre dans l'eau (annexe 13). Les huîtres rejettent en effet leurs gamètes dans la mer, la fécondation étant ensuite externe. Ce régime de reproduction permet alors à 2 huîtres séparées par plusieurs kilomètres de se croiser. Il est donc normal qu'aucune différenciation n'apparaisse entre ces populations. A l'inverse, un résultat surprenant est la significativité de la valeur  $F_{st}$  entre ARC et BOU nuancée tout de même par sa faible valeur (1,1%).

Il apparaît clairement que les indices de différenciation sont plus élevés entre populations *C. gigas* et *C. angulata* ou taïwanaise plutôt qu'entre populations *C. gigas* elles-mêmes ou entre populations *C. angulata* et taïwanaise. Cela traduit un regroupement génétique des populations *C. gigas* et des populations *C. angulata* et taïwanaise visibles sur les 2 arbres présentés en figures 2 et 3. Aussi bien, les données mitochondriales que les études sur les microsatellites traduisent ce regroupement. La population BOU a une position intermédiaire entre les 2 groupes observés sur les arbres. Cela confirme les quelques individus déterminés *C. angulata* (par PCR-RFLP sur le fragment COI) au sein de la population BOU principalement constituée d'individus *C. gigas*. On pourrait alors émettre l'hypothèse d'une population à l'origine *C. angulata* à l'intérieur de laquelle ont été introduits des individus *C. gigas*. Le regroupement entre les populations MIR (*C. angulata*) et la population *C. gigas* taïwanaise peut paraître surprenant. Cela nous permet d'émettre 2 hypothèses quant à l'origine des individus *C. angulata* portugais :

- les individus *C. angulata* auraient pour origine une aire taïwanaise.
- des individus *C. angulata* auraient été introduits sur les côtes taïwanaises.

La première hypothèse semble plus probable. En effet, l'absence de différence entre le taxon *C. angulata* et le taxon asiatique *C. gigas* tend à écarter une origine européenne des individus *C. angulata* portugais.

La longueur des branches des arbres est importante pour l'arbre obtenu par l'analyse des marqueurs mitochondriaux. Elle révèle le niveau de polymorphisme décelé. En effet, les populations ARC et SEU (par exemple) sont très proches avec les données mitochondriales et moins avec les données microsatellites. C'est en grande partie dû au faible polymorphisme entre populations *C. gigas* (étude PCR-RFLP sur l'ADN

mitochondrial) alors qu'avec le nombre d'allèles observés sur les microsatellites, plus de différences apparaissent.

Le résultat le plus probant est l'homologie entre les données mitochondriales et microsatellites alors qu'auparavant aucune différence significative (dans les études allozymiques) entre les 2 taxons n'avait été décelée.

#### **IV.2. Apport des gels de polyacrylamide 8%**

Le gel de polyacrylamide permet une résolution beaucoup plus fine. Il s'avère alors utile dans la séparation des fragments de tailles proches. Il a permis de visualiser le polymorphisme de la région séquencée du gène 16S.

Mais cette forte résolution peut faire apparaître des bandes dites parasites que l'on ne voyait pas en gel d'agarose. Ces bandes peuvent provenir d'une contamination des produits ou correspondre à des fragments amplifiés autres que celui étudié. Pour augmenter la spécificité de l'amplification c'est à dire pour augmenter la stringence de la réaction, il faut principalement:

- augmenter la température d'hybridation des amorces ( $T_m$ )
- baisser la quantité en  $MgCl^{2+}$

Le polymorphisme détecté par l'étude PCR-RFLP de la séquence 16S par l'amplification avec les amorces 16SbisA et 16SbisB (figure 11 et 12) peut être dû à des mutations au niveau des sites de restriction ou des mutation de longueur.

La présence d'un polymorphisme de conformation des molécules d'ADN double brin (DSCP, Double-strand conformation polymorphim) peut être supposée. Ce polymorphisme résulte de différences de mobilité entre les fragments en gel de polyacrylamide non dénaturant. La distance de migration dépend ici de la taille mais aussi de la séquence du double brin. Suivant sa séquence, une molécule double brin présente une certaine mobilité dans le gel.

Le séquençage de la région amplifiée permettrait d'expliquer ces différences de profils observées entre les 2 taxons *C. angulata* et *C. gigas*.

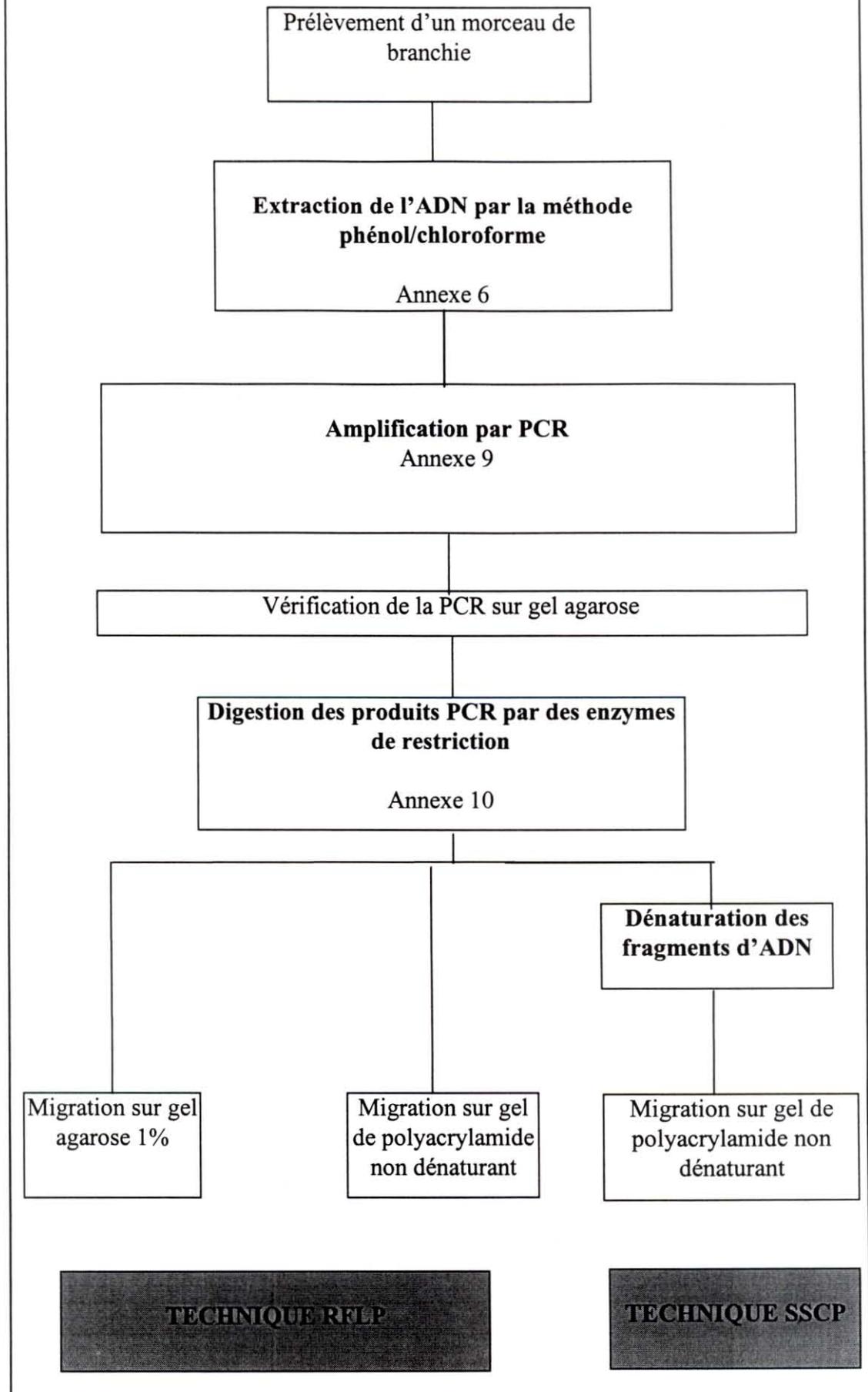
#### **IV.3. La technique PCR-RFLP-SSCP**

La présence d'une seule bande peut témoigner d'un problème de renaturation des molécules simple brin. Pourtant, contrairement aux autres gels SSCP obtenus, une différence nette de position du fragment a été observée chez 2 individus OGA. Serions-nous en présence d'un tel polymorphisme si les brins n'étaient pas dénaturés? L'hypothèse du polymorphisme de conformation de l'ADN double brin (DSCP) paraît peu probable. En effet, aucun polymorphisme n'a été détecté lors de la migration de ces fragments 16S sous forme double brin amplifiés chez les mêmes individus en gel de polyacrylamide non dénaturant (cf. figure 11).

En adoptant l'hypothèse que les brins soient dénaturés, l'absence du second brin pourrait être due à un problème de marquage au BET. Cette technique, utilisée par plusieurs auteurs (WOLFGANG *et al*, 1993; G L HART *et al*, 1993; A. BOGE *et al*, 1994) s'avère cependant moins résolutive qu'une coloration au nitrate d'argent.

Une autre possibilité expliquant la position de ces 2 fragments OGA serait un problème de migration. Une mauvaise qualité de gel peut entraîner un problème de migration au niveau de ces 2 puits (mauvaise homogénéisation du gel, présence de microbulles). Le tampon de migration ayant déjà servi pour 2 gels SSCP est peut-être à l'origine d'un problème de migration.

**Encadré IV: Les techniques moléculaires utilisées**



## V. Conclusion

---

Ce travail a permis de faire une comparaison intéressante. Les résultats obtenus par l'étude du polymorphisme de séquences mitochondriales d'ADN plus ou moins constantes et de séquences d'ADN hypervariables sont similaires et aboutissent aux mêmes conclusions. Cela permet de valider avec plus de certitudes les hypothèses instaurées au cours des études antérieures.

Ce travail présente un éventail des applications de la technique de PCR. Par l'étude PCR-RFLP et PCR-RFLP-SSCP (annexe 13) des séquences codant pour la COI et pour le 16SrRNA, du polymorphisme entre les individus *C. angulata* et *C. gigas* a pu être mis en évidence. Le traitement statistique de ces résultats nous donne des indices permettant d'émettre des hypothèses quant au passé évolutif de ces 2 taxons.

Les résultats obtenus en SSCP montrent que cette étude devra être poursuivie et optimisée. L'amélioration peut se faire dans plusieurs directions.

L'adoption et la stabilisation d'une structure secondaire particulière sont dépendantes de paramètres extérieurs tels que la température. Ici, une seule température a pu être testée (10°C). La température idéale de migration c'est à dire celle qui permet de détecter le maximum de polymorphisme, reste à être déterminée.

De plus, il s'avère que la détection du polymorphisme de conformation des molécules simple brin est optimale pour des petits fragments de taille inférieure à 200-300 pb. Afin d'améliorer nos résultats, l'expérience peut se faire sur le fragment amplifié digéré par *MseI* (bandes de 11 à 174).

Ces techniques de biologie moléculaire s'ouvrent vers d'autres applications. La détection d'individus hybrides lors de croisements expérimentaux peut être réalisée par l'étude PCR-RFLP sur les séquences mitochondriales ou sur le gène 16S. Les relations de parenté peuvent être retrouvées grâce aux marqueurs microsatellites.

Différents programmes de recherche étudient les quantités d'hybrides pour détecter un éventuel avantage ou vigueur hybride. De plus, après croisement entre individus *C. gigas* et individus *C. angulata*, les contributions à la génération suivante de chaque parent peuvent être évaluées.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- BOGE. A., GERSTENEIER. R. and EINSPANIER. R., (1994) Molecular polymorphism as a tool for differentiating ground beetles (carabus species): application of ubiquitin PCR/SSCP analysis.  
Insect Molecular Biology 3(4), 267-271.
- BOUDRY P., HEURTEBISE, COLLET.B., CORNETTE F. et GERARD A., (1998). Differentiation between populations of Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (LAMARK) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis.
- BRITTEN, R.J and D. KOHNE, 1968. Repeated sequences in DNA.  
Sciences, 161:529-540.
- BUROCKER N.E., HERSBERGER W.K., CHEW K.K. (1979). Population Genetics of the Family Ostredae.II. Interspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*.  
Mar Biol. 54: 157-169.
- BUROCKER N.E., HERSBERGER W.K., CHEW K.K. (1979). Population Genetics of the Family Ostredae.II. Interspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea*.  
Mar Biol. 54: 171-184.
- CAVALLI-SFORZA, L.L, and A.W.F. EDWARDS, 1967. Phylogenic analysis: models and estimation procedures.  
Amer.J.Hum Genetics,56 : 45-57.
- COCHARD J., DARDIGNAC M.J. (1977). L'Ile d'AIX, IV Faune: La conchyliculture  
Annales de la société des Sciences Naturelles de la Charente-Maritime Supplément.
- COMPS M., (1969) Observations relatives à l'affection branchiales des huîtres portugaises (*Crassoistrea* Lmk).  
Rev. Trav. Inst. Pêch. marit. 33:151-160.
- COMPS M., (1970) La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation.  
Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit., 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 1972/K, 22pp.

- DELTREIL J-P., (1973). Evolution et conséquences de la mortalité de *C.angulata* dans le bassin d'Arcachon et de l'estuaire de la Gironde de 1971 à 1973.  
ICES CM/K: 14,6pp.
- FOLMER. O., BLACK. M., HOEH. W., LUTZ. R. and VRIJENHOEK. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.
- GRIZEL H., HERAL M. (1991). Introduction of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*)  
J. Cons . int. Explor.  
Mer, 7: 399-403.
- HART G.L, J BASTIAANSEN, M R DENTINE, B W KIRKPATRICK.  
Detection of four-allele single strand conformation polymorphism (SSCP) in the bovine prolactin gene 5' flank.  
Animal Genetics 1993, 24, 149.
- MATHERS, N.F., N.P. WILKINS and P.R. WALNE, 1974. Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*.  
Biochemical Systematics and Ecology, 2 : 93-96.
- MATTIUCCI, S, and F. VILLANI, 1983. Studio elettroforetico dei sistemi genenzima in ostriche classificate come *Crassostrea* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Ostreidae).  
Parassitologia, 25: 21-27.
- MENZEL R. W. (1974). Portuguese and Japanese oysters are the same species.  
J.Fisheries Res. Board Canada, 31: 453-456.
- O FOIGHIL, P.M GAFFNEY, A.E.WILBUR, T.J.HILBISH. Mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene sequences support an asian origin for the portuguese oyster, *Crassostrea angulata*.  
Soumis à Marine Biologie.
- SNEATH, P.H.A. and R.R. SOKAL. 1973. Numerical Taxonomie.W.H. Freeman and co., San Francisco.
- STENZEL H. B. (1971). Oysters in "Treatise on invertebrate Paleontology". N 953-N 1224 pp. Part N, Vol. 3 (of 3), Mollusca 6, (K.C. Moore, ed.) Geological Society of American Inc. and the University of Kansas. Boulder, Colorado.
- WEIR, B.S. and C.C. COCKERHAM, 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure.  
Evolution, 38(6), 1358-1370.

WOLFANG G, BALLHAUSEN & CORNELIA KRAUS (1993). Non-isotopic detection of single-stranded conformation polymorphisms using ethidium bromide/UV light.  
Applied and Theoretical Electrophoresis, 3: 129-131.

ZOUROS, E. AND D.W. FOLTZ, 1984. Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oyster populations.  
Developmental Genetics, 4: 393-405.

## ANNEXES

	<i>page</i>
<b>Annexe 1</b> : Classification des 2 huîtres creuses.....	1
<b>Annexe 2</b> : Comparaison des 2 taxons d'huîtres.....	2
<b>Annexe 3</b> : Historique des espèces d'huîtres cultivées.....	3
<b>Annexe 4</b> : Répartition géographique mondiale des 2 huîtres creuses.....	4
<b>Annexe 5</b> : Les microsatellites.....	5
<b>Annexe 6</b> : Méthode d'extraction de l'ADN au phénol-chloroforme.....	6
<b>Annexe 7</b> : Choix des amorces nucléotidiques.....	7
<b>Annexe 8</b> : Compositions des solutions utilisées.....	8
<b>Annexe 9</b> : La technique de PCR.....	9
<b>Annexe 10</b> : La technique PCR-RFLP.....	10
<b>Annexe 11</b> : Composition des gels de polyacrylamide.....	11
<b>Annexe 12</b> : Profils de restriction et Haplotypes des individus échantillonnés.....	12
<b>Annexe 13</b> : Cycle de développement de <i>C. gigas</i> .....	17

ANNEXE 1

**SYSTEMATIQUE DES HUITRES CREUSES**  
*C. Gigas et C. angulata*

	<b>Invertébrés</b>	
<i>Embranchement</i>	<b>Mollusque</b>	
<i>Classe</i>	<b>Bivalve</b>	<b>Lamellibranche</b>
<i>Ordre</i>	<b>Filibranche</b>	
<i>Sous-ordre</i>	<b>Anisomyaria</b>	
<i>Super famille</i>	<b>Oestreioidea</b>	
<i>Famille</i>	<b>Crassostreidea</b>	
<i>Genre</i>	<b>Crassostrea</b>	
<i>Espèce</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Crassostrea angulata</i>

**ANNEXE 2: Etat des connaissances sur la comparaison entre les deux taxons :**

	<b>Crassostrea gigas</b>	<b>Crassostrea angulata</b>
<b>Distribution géographique</b>	Foyer asiatique naturel : Japon, Corée, Taiwan Introduite en Europe de l'Ouest, Amérique, Nouvelles Zeland, Tasmanie, Afrique de l'Ouest	Sud de l'Europe, Espagne, Portugal, Nord de l'Afrique
<b>Morphologie</b>	Taille maximale de 30 cm	
<b>Habitat écologique</b>	Infralittoral jusqu'à 15m de profondeur Fixées sur des fonds meubles ou durs Mode de vie sédentaire fixé.	
<b>Nourriture</b>	Se nourrissent du phytoplancton	
<b>Exigences écologiques</b>	Exigences écologiques moins grandes : bonne résistance aux fortes turbidités et vivent à des températures moins élevées	Exigences écologiques plus grandes : nécessitent des températures plus chaudes de quelques degrés
<b>Physiologie et biochimie</b>	Croissance deux fois supérieure à celle d'angulata	Croissance plus faible associée à une activité de filtration réduite.
<b>Pathologie</b>	Sensibilité négative aux iridovirus	Sensibilité positive aux iridovirus
<b>Reproduction</b>	Reproduction externe Hermaphrodite alternatif, ponte maximale en juillet Fécondation moyenne de plusieurs dizaines de millions d'ovocytes Phase larvaire ovipare, de 15 à 18 jours	

Annexe 3:

**Présentation des espèces d'huîtres cultivées sur le bassin  
de Marennes Oléron depuis la naissance de l'ostréiculture**  
*Facteurs impliqués dans les fortes mortalités*

**1750: Huître plate *Ostrea edulis* (Linné) :**

Espèce indigène

Du Danemark au Portugal et au Maroc sur toute la côte occidentale.

Bancs naturels. Production de 20-30000 t en 1960

*Augmentation de la consommation, mauvaise gestion des stocks par pillages*

*Prédateurs (étoiles de mer, bigorneaux) et phénomènes naturels (envasement, températures excessives).*

*1.2 Maladie inconnue au lendemain de la guerre 14-18*

**1868: Huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* (Lamark)**

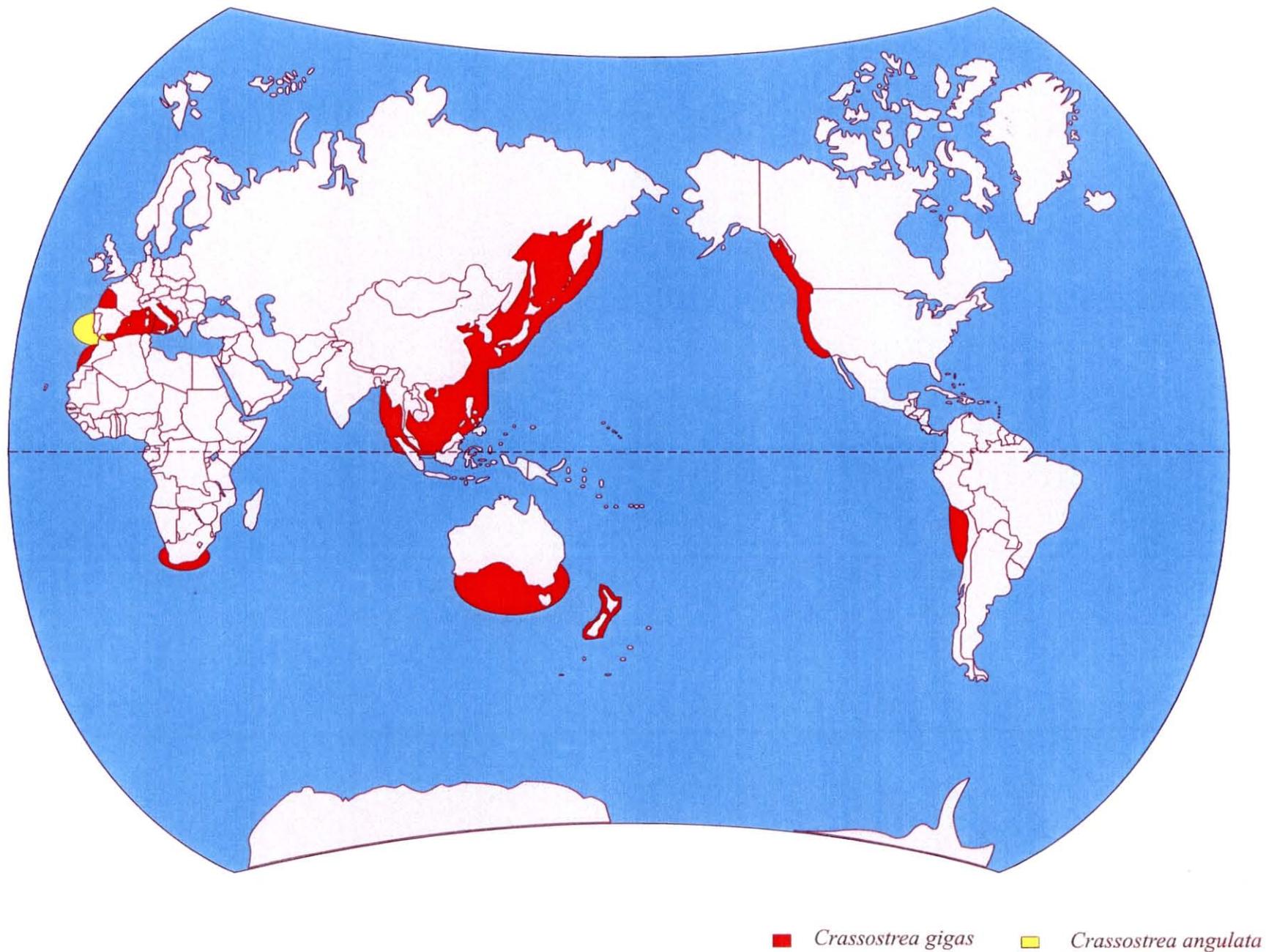
Introduite accidentellement par un navire assurant le transport de *Crassostrea angulata* qui fut bloqué par une tempête dans l'embouchure de la Gironde.

*Cette espèce souffrit de pêche intensive, de pillages et de grandes mortalités maladie des branchies de 1967 à 1969 (COMPS, 1969, 1970) due à un iridovirus (COMPS 1970, DELTREIL 1973)*

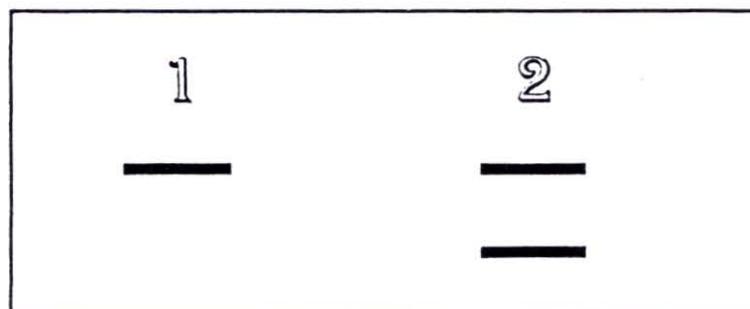
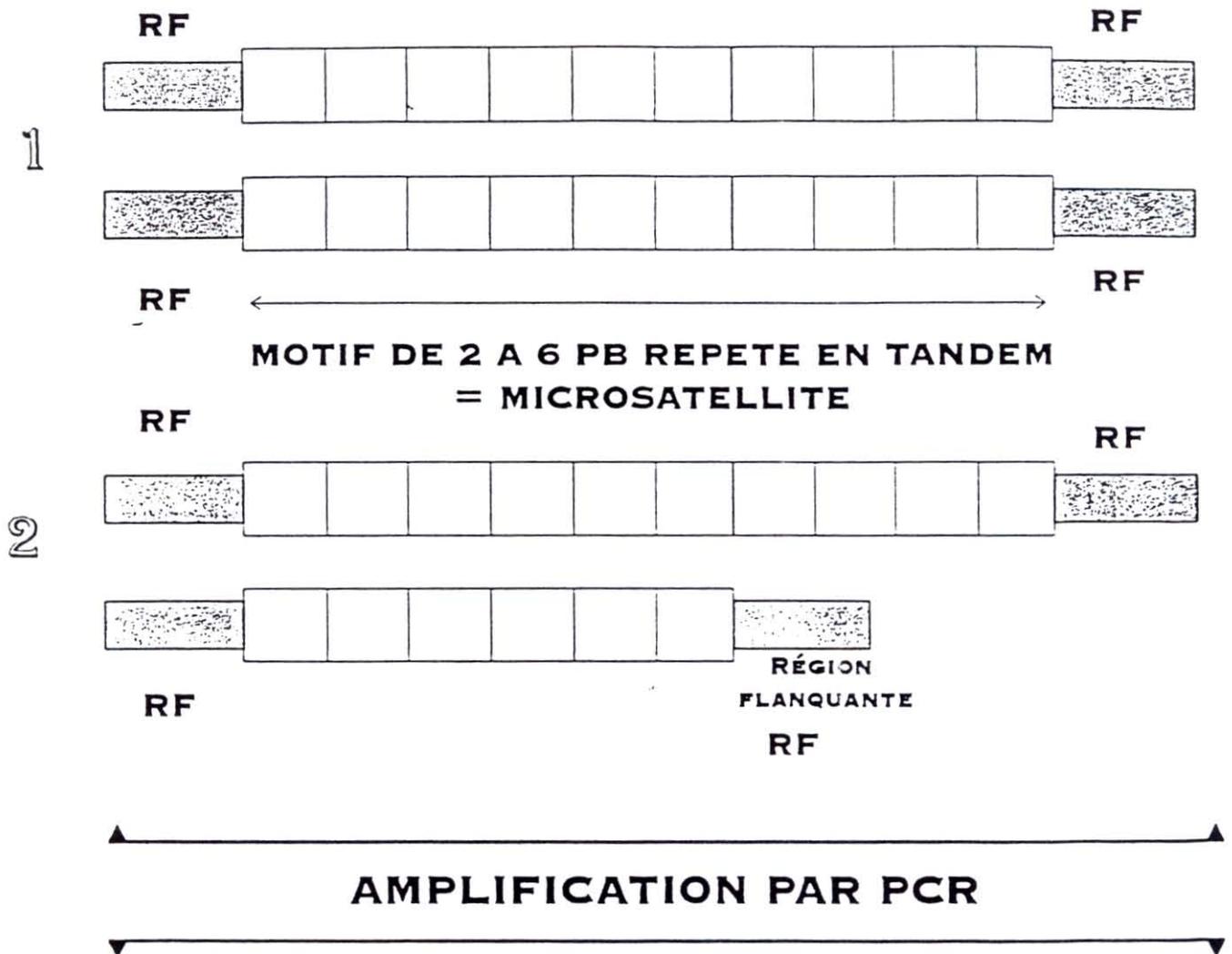
**1966: Huître creuse Japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg)**

Introduite massivement du Japon sous forme de naissain (Myiagi) et de Colombie Britannique sous forme d'adultes à partir de 1971.

Répartition géographique mondiale des 2 huîtres creuses



### Les microsatellites



## ANNEXE 6

### EXTRACTION D'ADN AU PHENOL/CHLOROFORME

#### Première étape:

Prélever un fragment de branchies de l'individu.  
Ajouter 400µl de tampon d'extraction  
Laisser à 55°C pendant 5 heures au minimum. (peut être laissé une nuit)

#### Deuxième étape

Ajouter 500µl de phénol (**déprotéinisant puissant**)  
Agiter doucement  
Centrifuger 10 min. à 10000 tr/min à 4°C  
Récupérer la phase supérieure  
Ajouter 1ml de chloroforme (élimination des traces de phénol)  
Agiter  
Centrifuger 10 min à 10000 tr/min à 4°C.  
Prélever le surnageant.

#### Troisième étape:

Ajouter 400 ml d'éthanol 100% conservé à -20°C  
Laisser précipiter 1 heure à -20°C  
Centrifuger 10 min à 10000 tr/min à 4°C  
Enlever l'éthanol, laisser sécher  
Lavage à l'éthanol 70° à -20°C (lavage des acides nucléiques)  
Centrifuger 10 min à 10000 tr/min à 4°C  
Enlever l'éthanol, laisser sécher.  
Reprendre dans environ 150 µl de TE.

#### Remarques:

- Lors des prélèvements de tissu de branchies, les instruments doivent être rincés à l'alcool.
- La manipulation du phénol et de chloroforme doit se faire sous une hotte et avec des gants.
- Le phénol doit être équilibré à pH 8 avant le premier usage.

## *Annexe 7: Choix des amorces nucléotidiques :*

Elles doivent satisfaire à trois critères principaux :

- elles doivent former un duplex stable dans les conditions expérimentales lorsqu'elles sont hybridées en des sites spécifiques et correctement espacés de l'ADN cible.
- Il ne doit pas y avoir d'hybridation possible d'une amorce sur elle-même (boucle intracaténaire) ou des amorces entre elles (primer-dimer).
- Une amorce doit être seule à s'hybrider en un site précis et cette même amorce ne doit s'hybrider qu'au niveau du site ciblé.

Les deux premiers critères s'appuient sur les propriétés physiques intrinsèques des amorces. La température de fusion  $T_m$  (pour melting temperature) du duplex formé lors de l'appariement de l'amorce sur la séquence cible est le paramètre thermodynamique clé de la réaction.

L'autre paramètre important de la PCR est la température utilisée pour permettre l'hybridation des amorces ( $T_a$  pour annealing temperature). Si  $T_a$  est trop faible pour un couple d'amorce, des appariements non spécifiques se produisent, et si  $T_a$  est trop forte l'amplification risque d'être réduite ou nulle.

## Annexe 8: COMPOSITION ET ROLE DES SOLUTIONS UTILISEES

### Ammonium persulfate APS

APS 10%: 100mg d'APS  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  en poudre sont dissous dans 1ml d'eau bidistillée.

Catalyseur de la polymérisation du gel acrylamide.

### Bromure d'éthidium (BET)

Visualisation de l'ADN dans les gels

### Bleu de charge

Alourdir les échantillons pour le dépôt au fond des puits.

Arrêt des digestion

### Bleu dénaturant

25ml de formadine

0.025g de xylène cyanol

0.025g de bleu de bromothynol

1ml d'éthylène Diamine

### Solution d'extraction

1ml de NaCl 100mM

0.5ml de Tris 10mM, pH 8

2.5 ml de EDTA 25mM, pH 8

2.5ml de SDS 10%

Ajouter à 50ml avec qsp H<sub>2</sub>O  
protéinase K 0.2mg/ml.

### TAE 1X (Tris acétate)

TAE50X      242g de Tris base  
                 57.1ml d'acide acétate  
                 100ml de EDTA 0.5M

(pH=0.8)

Le TAE est utilisé comme tampon de migration en gel d'agarose.

### TBE

TBE 10X:     162g Tris base  
                 27.5g d'Acide Borique  
                 50ml de EDTA 0.5M  
                 1l qsp H<sub>2</sub>O

Tampon de migration en gel d'acrylamide.

### TEMED

Catalyseur de la polymérisation du gel acrylamide.

### TE 1X, pH 7.5

TE 100X:     121.1g Tris  
                 37.2g EDTA  
                 ajuster à pH 7.5  
                 qsp H<sub>2</sub>O mQ

**Annexe 9 : AMPLIFICATION PAR PCR**

• **A:** Protocole expérimental pour l'amplification pour un échantillon

Solutions	Volume en $\mu\text{l}$	Concentration finale
Tampon 10X	5	1X
DNA polymérase proHA 5 U $\mu\text{l}^{-1}$	0.1	0.01 U $\mu\text{l}^{-1}$
MgCl <sub>2</sub> 25mM	3	1.5 mM
dNTP à 20 $\mu\text{M}$	5	2 $\mu\text{M}$
amorce 1 à 20 $\mu\text{M}$	1	0.4 $\mu\text{M}$
amorce 2 à 20 $\mu\text{M}$	1	0.4 $\mu\text{M}$
H <sub>2</sub> O bidistillée	32.9	
Produit DNA 5%	2	
TOTAL	50	

• **B:** Programmes d'amplification spécifique pour l'utilisation des marqueurs mitochondriaux et microsattellites.

	Marqueurs mitochondriaux	Marqueurs Microsattellites
Première dénaturation:	3 min. à 94°C	5 min. à 94°C
Dénaturation:	1 min. à 94°C	1 min. à 94°C
Hybridation des amorces:	1 min. à 50°C	1 min. à la T <sub>m</sub>
Elongation:	1 min. à 72°C	1 min. 45 à 72°C
Elongation finale:	7 min. à 72°C	5 min. à 72°C

30 cycles

## Annexe 10: TECHNIQUE PCR-RFLP:

### ● A: Solution de digestion des produits PCR

	Taq	Sau	Hha	Mse	RsaI	HaeIII
Tampon	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
Enzyme 5 Uµl <sup>-1</sup>	0.5µl	0.5µl	0.3µl	0.4µl	0.4µl	0.4µl
H <sub>2</sub> O bidistillée	9.5µ	9.5µ	9.7µ	9.6µ	9.6µl	9.6µl
Produit PCR	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl	8µl
Température de digestion	65°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C

### ● B: Sites spécifiques de coupure des enzymes de restriction utilisées pour la technique PCR-RFLP

Enzyme	Site de restriction	Température optimale
Taq I	5' T CGA 3' 3' AGC T 5'	65 °C
<i>Sau3A I</i>	5' GATC 3' 3' CATC 5'	37 °C
<i>Hha I</i>	5' C CGC 3' 3' GGC G 5'	37 °C
<i>Mse I</i>	5' T TAA 3' 3' AAT T 5'	37 °C
<i>Rsa I</i>	5' GT AC 3' 3' CA TG 5'	37 °C
<i>Hae III</i>	5' GG CC 3' 3' CC GG 5'	37 °C

	<b>1 gel RFLP</b>	<b>1 gel SSCP</b>
<b>Concentration</b>	8%	8%
<b>Epaisseur</b>	1.5 mm	0.75 mm
<b>H<sub>2</sub>O bidistillée</b>	26.25 ml	14.40 ml
<b>TBE 10X (Tris Borate EDTA)</b>	3.75 ml	1.27 ml
<b>Acrylamide 40% (acry/bis:39;1)</b>	7.5 ml	5.23 ml
<b>TEMED</b>	30 µl	13.75 µl
<b>APS à 10%</b>	180 µl	137.50 µl
<b>Tampon de migration</b>	TBE 1X	TBE 0.6X

**Remarques:**

L'acrylamide est un neurotoxique dangereux.

Le TBE ( Tetra Méthyl Ethylène Diamine) doit être conservé à l'abri de la lumière à 4°C

**Annexe 12: Profils de restriction et haplotypes des individus échantillonnés**

Individu	Population	Profils de restriction de digestion par:				Haplotype
		<i>TaqI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>HhaI</i>	<i>MseI</i>	
ARC 1	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 2	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 3	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 4	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 5	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 6	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 7	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 8	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 9	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 10	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 11	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 12	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 13	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 14	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 15	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 16	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 17	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 18	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 19	Arcachon	d	c	a	d	C
ARC 20	Arcachon	d	c	a	d	C
J 85	Arcachon	d	c	a	d	C
J 5	Arcachon	d	c	a	d	C
J 52	Arcachon	d	c	a	d	C
J 18	Arcachon	d	c	a	d	C
J 22	Arcachon	d	c	a	d	C
J 45	Arcachon	d	c	a	d	C
J 13	Arcachon	d	c	a	d	C
J 31	Arcachon		c	a		
J 89	Arcachon		c			
J 11	Arcachon	d	c	a	d	C
J 64	Arcachon					
J 97	Arcachon	d	c	a	d	C
J 92	Arcachon	d	c	a	d	C
J 81	Arcachon	d	c	a	d	C
J 79	Arcachon		c	a	d	
J 77	Arcachon	d	c	a	d	C
J 49	Arcachon		c		d	
J 50	Arcachon	d	c	a	d	C
J 2	Arcachon	d	c	a	d	C
J 16	Arcachon	d	c	a	d	C
J 20	Arcachon	d	c	a	d	C

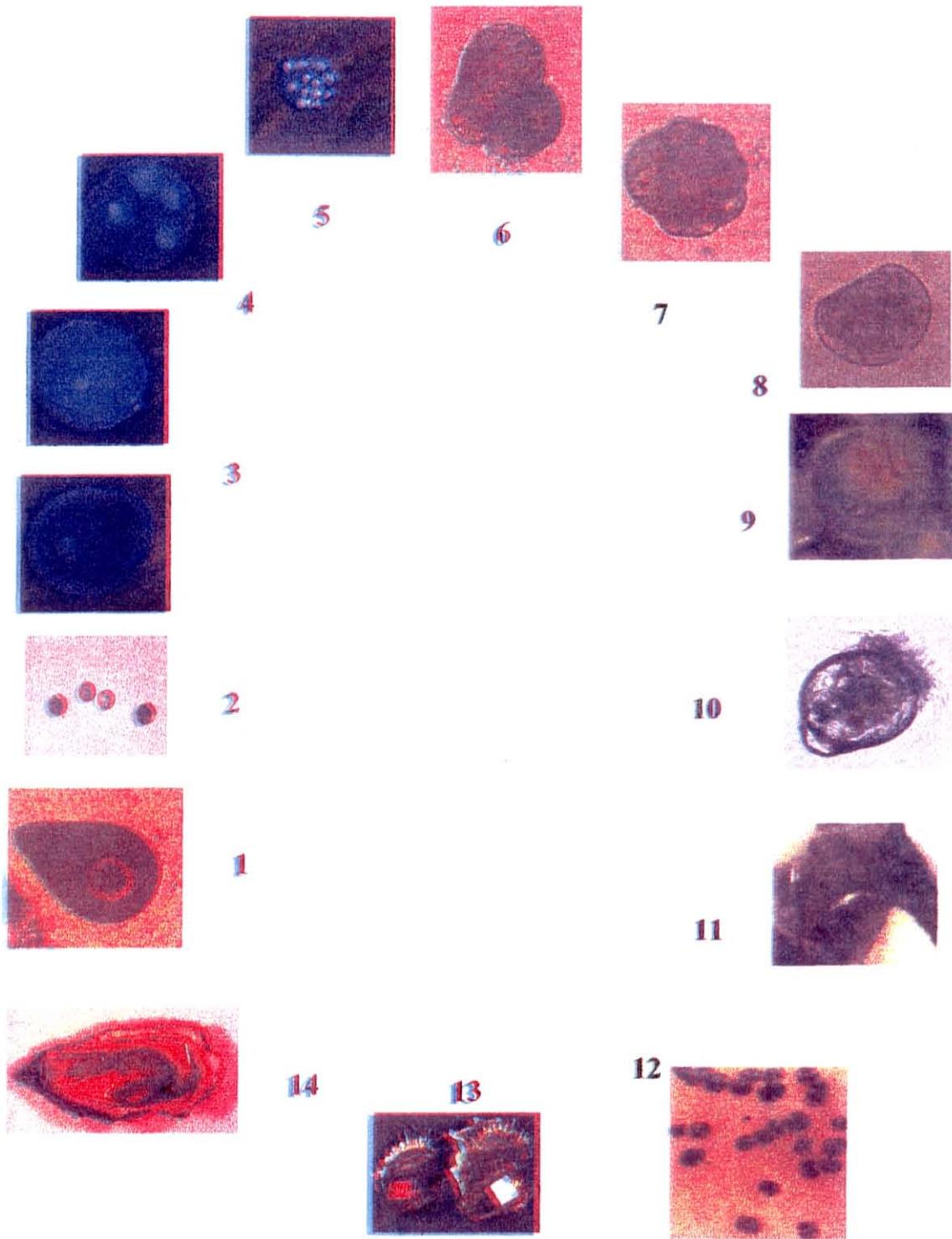
Chez certains individus, des difficultés de lecture des profils de restriction dues à un signal trop faible ont été rencontrées. Les haplotypes n'ont alors pas pu être déterminés.

Individu	Population	Profil de restriction de digestion par:				Haplotype
		<i>TaqI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>HhaI</i>	<i>MseI</i>	
J 44	Arcachon	d	c	a	d	C
J 58	Arcachon	d	c	a	d	C
J 28	Arcachon		c		d	
J 74	Arcachon		c		d	
J 76	Arcachon	d	c	a	d	C
J 24	Arcachon	d	c	a	d	C
J 78	Arcachon		c	a	d	
J 70	Arcachon	d	c	b	d	E
J 67	Arcachon	d	c	a	d	C
Cg La T 1	Seudre	d	c	a	d	C
Cg La T 2	Seudre	d	c	a	d	C
Cg La T 3	Seudre	d	c	a	d	C
Cg La T 4	Seudre	d	c	a	d	C
Cg La T 5	Seudre	d	c	a	d	C
Cg Test 3	Seudre	d	c	a	d	C
Cg Test 8	Seudre	d	c	a	d	C
Cg Test 10	Seudre	d	c	a	d	C
Cg Test 12	Seudre	d	c	a	d	C
M 1	Seudre	d	c	a	d	C
M 2	Seudre	d	c	a	d	C
M 3	Seudre	d	c	b	d	E
M 4	Seudre	d	c	a	d	C
M 5	Seudre	d	c	a	d	C
M 6	Seudre	d	c	a	d	C
M 7	Seudre	d	c	a	d	C
M 8	Seudre	d	c	a	d	C
M 9	Seudre	d	c	a	d	C
M 10	Seudre	d	c	a	d	C
M 6 bis	Seudre	d	c	a	d	C
M 5 bis	Seudre	d	c	a	d	C
M 29	Seudre	d	c	a	d	C
M 61	Seudre	d	c	a	d	C
M 95	Seudre	d	c	a	d	C
M 30	Seudre	d	c	a	d	C
M 17	Seudre	d	c	a	d	C
M 45	Seudre			a		
M 72	Seudre	d	c	a	d	C
M 73	Seudre	d	c	a	d	C
M 74	Seudre	d	c	a	d	C
M 3 bis	Seudre	d	c	a	d	C
M 66	Seudre	d	c	a	d	C
M 97	Seudre	d	c	a	d	C
M 59	Seudre	d	c	a	d	C

Chez certains individus, des difficultés de lecture des profils de restriction dues à un signal trop faible ont été rencontrées. Les haplotypes n'ont alors pas pu être déterminés.

Individu	Population	Profil de restriction de digestion par:				Haplotype
		<i>TaqI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>HhaI</i>	<i>MseI</i>	
M 38	Seudre	d	c	a	d	C
M 42	Seudre	d	c	a	d	C
M 95	Seudre	d	c	a	d	C
M 8 bis	Seudre	d	c	a	d	C
M 16	Seudre	d	c	a	d	C
M 27	Seudre		c			
M 31	Seudre	d	c	a	d	C
M 56	Seudre	d	c	a	d	C
M 57	Seudre	d	c	a	d	C
M 62	Seudre	d	c	a	d	C
M 77	Seudre	d	c	a	d	C
M 84	Seudre	d	c	a	d	C
M 9 bis	Seudre	d	c	a	d	C
M 92	Seudre	d	c	a	d	C
M 55	Seudre	d	c	a	d	C
KAO 15	Taiwan	c	d	a	d	B
KAO 16	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 17	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 18	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 19	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 20	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 21	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 22	Taiwan	c	d	a	d	B
KAO 23	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 24	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 25	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 26	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 27	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 28	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 29	Taiwan	c	d	a	d	B
KAO 30	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 31	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 32	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 33	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 34	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 35	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 36	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 37	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 38	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 39	Taiwan	c	c	a	d	A
KAO 40	Taiwan	c	c	a	d	A
MIR 1	Portugal	c	c	a	d	A
MIR 2	Portugal	c	c	a	d	A
MIR 3	Portugal	c	c	a	d	A
MIR 4	Portugal	c	c	a	b	A

Chez certains individus, des difficultés de lecture des profils de restriction dues à un signal trop faible ont été rencontrées. Les haplotypes n'ont alors pas pu être déterminés.



**Cycle de développement de *Crassostrea gigas*.**

1. Ovocyte en cours de maturation 2, 3 et 4 Ovocyte mature 5. Embryon stade 4 cellules 6. Embryon stade 16 cellules 7. Embryon stade Morula 8. Larve stade D (D8) 9 et 10 Larve J1 11. Larve stade pédiveligère 12. Postlarves fixées sur plaque PVC 13. Juvénils (6 mois) 14. Géniteur mature