

Rapport de stage de Master R2 « Biologie Intégrative et Moléculaire » de  
Gaëlle CHUPEAU

Sous la tutelle de Sylvie LAPEGUE

**Identification de polymorphismes de gènes chez l'huître plate  
*Ostrea edulis L.* et variabilité au sein de populations européennes**



Dates de stage :

25.10.2004 au 10.12.2004  
18.01.2005 au 11.02.2005  
7.03.2005 au 1.07.2005

Date de soutenance orale :

30.06.2005



## Sommaire

*Page de garde*

*Remerciements*

*Résumé, mots-clé (en couverture dos)*

*Sommaire, Table des Annexes et Table des Illustrations*

Introduction	p 1
I-Matériels et méthodes	p 5
1-Matériel biologique et extraction d'ADN	p 5
2-Techniques moléculaires employées	p 7
3-Méthode de traitement des données	p 9
II-Résultats	p 11
1-Analyse des données pour le fragment du gène MT séquencé	p 11
2-Analyse des données pour les microsatellites	p 15
3-Comparaison des données marqueurs neutres/marqueurs non neutres	p 16
III-Discussion	p 17
Conclusion et perspectives	p 21
Bibliographie	p 22
Glossaire	p 28

*Les mots suivis d'une \* sont définis dans le glossaire*

## Table des Annexes

Annexe 1 : Fiche d'identité	p 32
Annexe 2 : La petite histoire de l'huître plate Européenne	p 37
Annexe 3 : Classification de la famille Ostreidea	p 40

## Table des Illustrations

Photo couverture : *Ostrea edulis* en vue ouverte

Fig 1 : Représentation schématique de la diversité enzymatique de différents groupes d'animaux ou de plantes

Fig 2 : *Ostrea edulis*, vue ouverte

Fig 3 : carte des populations « anciennes »

Fig 4 : carte des populations « nouvelles »

Fig 5: arbre phylogénétique obtenu à partir du satellite OsedA (Lopez-Flores et al, 2004)

Table 1 : caractéristiques des 3 microsattellites utilisés

Table 2 : caractéristiques des deux fragments de gènes utilisés

Fig 6 : diagramme de la structure du gène Métallothionéines (MT)

Table 3 : détail du polymorphisme détecté pour le fragment MT séquencés pour les 11 populations

Table 4 : Les indices de diversité selon les différentes régions du fragment MT

Table 5 : résultats des indices de diversité et test de neutralité pour les 11 populations pour le fragment MT séquencé

Table 6 : valeur de  $F_{st}$  par paire entre les 11 populations pour les 6 locus polymorphes de MT

Fig 7 : arbre phylogénétique basé sur la distance génétique de Nei de 11 populations pour le gène MT

Table 7 : diversité génétique intrapopulation aux 3 locus microsatellites pour les 8 populations

Table 8 : valeur des Fst par paire entre les 8 populations

Fig 8 : arbre phylogénétique basé sur la distance génétique de Nei de 8 populations pour les microsatellites

Fig 9 : arbre phylogénétique basé sur la distance génétique de Nei pour 25 populations Européennes pour 3 marqueurs microsatellites

Fig 10 : corrélation entre la diversité nucléotidique (Pi) pour MT et la diversité des microsatellites (He)

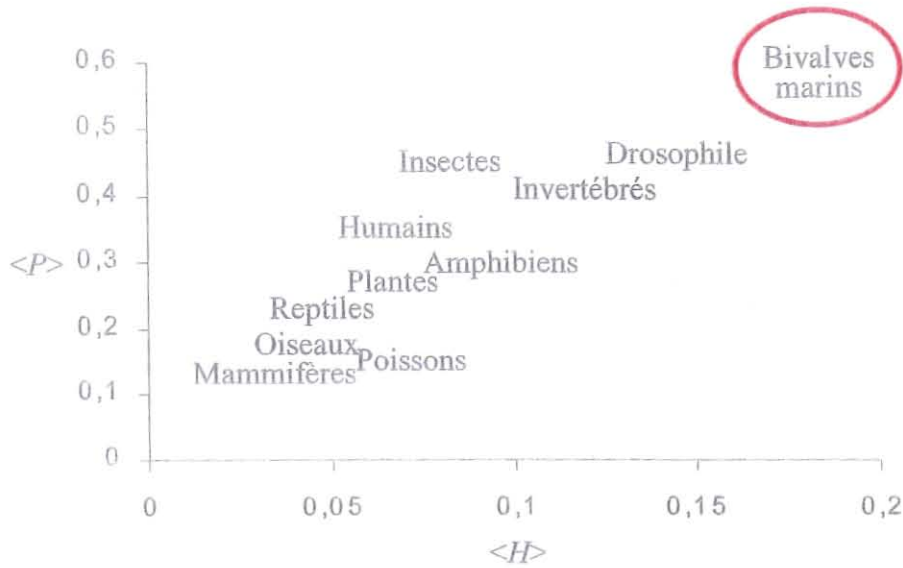
Table 9 : Diversité génétique intrapopulation aux 6 locus MT pour 11 populations

Fig 11 : *Ostrea edulis*, vue de dessus et vue ouverte

Fig 12 : détail anatomie par vue ouverte

Fig 13 : *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*

Figure 1 : Représentation schématique de la diversité enzymatique de différents groupes d'animaux ou de plantes.  $\langle H \rangle$  : Hétérozygotie.  $\langle P \rangle$  : Proportion de locus polymorphe. ( Solé-Cava & Thorpe, 1991).



## Introduction

Le génome des bivalves marins est encore méconnu mais son étude est un enjeu important car les caractéristiques originales de ces espèces permettront d'élargir ou de réviser les paradigmes établis en milieu terrestre. Entre autre, les bivalves marins nous procurent une opportunité unique d'explorer les valeurs extrêmes d'un paramètre fondamental en génétique évolutive : la taille efficace des populations ( $N_e$ ). La diversité enzymatique observée chez les bivalves marins est la plus élevée des Eucaryotes (par exemple plus variable que *Drosophila*, fig. 1) (López et al. 2001; Solé-Cava & Thorpe 1991). De fortes diversités ont également été reportées avec des marqueurs mitochondriaux (Boudry et al. 1998; Zouros et al. 1992), des marqueurs microsatellites (Huvet et al. 2000; Launey et al. 2002) ou introniques (Bierne et al. 2003; Daguin et al. 2001). Une taille efficace élevée est aussi le corollaire d'un fardeau génétique (quantités de mutations délétères ségrégeantes, Bataillon & Kirkpatrick 2000) qui compte parmi les plus forts jamais estimés chez des animaux (Bierne et al. 1998; Launey & Hedgecock 2001). Cependant, quasiment aucune donnée de polymorphisme de séquence de l'ADN codant n'est à l'heure actuelle disponible chez les bivalves. Pourtant de telles données de séquences sont les seules qui pourront simultanément nous permettre d'inférer précisément la contribution relative des forces évolutives agissant sur les gènes de ces espèces et en retour de comprendre les raisons de leur hyperdiversité. Dans ce contexte, notre étude s'avère exploratoire chez une espèce d'intérêt biologique et génétique, l'huître plate européenne, *Ostrea edulis*, pour laquelle, cependant, peu de séquences codantes ont été décrites.



Fig 2 : *Ostrea edulis*, en vue ouverte

L'huître plate, *Ostrea edulis*, espèce hermaphrodite protandre (cf fig 2 et Annexe 1), est endémique de nos côtes : son aire de répartition s'étend de la Mer Baltique à la Mer Noire. L'huître plate était encore prépondérante jusqu'au siècle dernier (cf Annexe 2). Dans les années 70, l'apparition d'un parasite protozoaire, *Marteilia refringens*, réduit la production de l'huître plate. Il est localisé au niveau de l'appareil digestif entraînant ainsi un amaigrissement de l'huître pouvant conduire à sa mort généralement au cours de l'été suivant l'infection. En 1979, un second parasite protozoaire - du Phylum Haplosporidia - suspecté provenir de Californie (Naciri-Graven et al, 1998), *Bonamia ostreae*, cause de plus importants dégâts dans la production commerciale française, puis européenne. Cette pathologie appelée bonamiose n'entraîne aucun signe visible de maladie chez les sujets atteints. Ce parasite se développe au cours d'un premier stade dans les ovaires (Launey 1998 d'après Van Banning 1990) puis dans le cytoplasme des cellules sanguines. Précisons que ces parasites ne présentent aucun danger pour la santé du consommateur. En l'espace de dix ans, cette espèce a donc connu deux épizooties faisant chuter sa production de 15 000-20 000 tonnes par an à 1 000-2 000 tonnes aujourd'hui.

L'étendue du milieu d'élevage et l'absence de lymphocytes impliqués dans la défense de l'organisme font que la protection des espèces d'invertébrés marins contre les maladies infectieuses ne peut s'envisager que par l'amélioration génétique de la résistance ou de la tolérance à ces maladies. Ainsi depuis 1985, l'IFREMER sélectionne des huîtres résistantes (Naciri-Graven et al, 1999). En parallèle, des études sont menées pour mieux comprendre les modalités d'échanges de gènes entre les populations d'huîtres plates.



La génétique des populations d'*Ostrea edulis* est fortement affectée par les actions humaines autant celles présentes que celles passées, et il n'est pas toujours facile de savoir dans quelle mesure les traits d'histoire de vie ont influencé la structuration des populations de cette espèce (cf Annexe 2). La surexploitation et les épidémies ont détruit d'importantes populations naturelles sur toutes les côtes Atlantiques. De nombreuses transplantations d'animaux ont eu lieu à travers l'Europe afin de repeupler les stocks appauvris et le mélange de populations d'origines géographiques diverses peut avoir réduit la variabilité génétique originale. Contrairement aux gisements atlantiques, les populations méditerranéennes n'ont pas ou peu souffert d'épizooties, et il ne semble pas y avoir eu en Méditerranée de surexploitation des stocks et de mélanges subséquents de populations d'origine différentes (Launey, 1998).

Saavedra et al (1995) ont analysé 19 populations couvrant l'ensemble de son aire de répartition naturelle. Ils ont étudié les variations des fréquences alléliques de 13 locus enzymatiques polymorphes en fonction de la distance géographique. La diversité génétique pour ces 13 locus polymorphes est plus faible dans les populations du Nord de l'Atlantique et du Sud de la Méditerranée. Les distances génétiques entre populations permettent de distinguer 3 groupes géographiques :

- Atlantique Nord
- Atlantique Sud et Méditerranéenne Ouest
- Méditerranéenne Est

Launey (1998) a travaillé sur 6 locus microsatellites\*. Ces locus montrent une grande variabilité génétique (de 5 à 48 allèles). Ces travaux concordent avec ceux de Saavedra, à savoir que la répartition actuelle des populations d'huîtres plates résulte de la recolonisation post-glaciaire des côtes Atlantiques par des populations d'origine

méditerranéenne. La structuration des populations atlantiques a été également influencée par l'action humaine et par les attaques parasitaires, mais l'espèce ne semble pas actuellement menacée d'extinction.

Diaz Almela et al (2004) ont étudié un marqueur mitochondrial (l'ARNr 12S). Les valeurs importantes de différenciation par rapport à celles obtenues avec les marqueurs microsatellites peuvent en partie s'expliquer par une plus grande variabilité dans le succès reproducteur femelle par rapport au succès reproducteur mâle. Ceci serait en partie dû au fait que cette espèce d'huître a la particularité d'être incubatrice. Il faut noter également que cette étude a montré que deux haplotypes rares (notés I et C) sont présents dans deux populations éloignées : la population Atlantique Norvégienne (Oslo) et une population de la Mer Noire (Sebastopol).

Les travaux réalisés jusqu'alors ont été effectués à l'aide de marqueurs neutres ou supposés l'être (microsatellites - Launey, 1998, Launey et al, 2002 -, mitochondrial - Diaz Almela et al, 2004 -, et, enzymatiques - Saavedra et al, 1995). Notre étude a pour but de rechercher des marqueurs non neutres dans le but d'étudier la structuration du polymorphisme de ce type de marqueur et de le comparer avec les marqueurs neutres. La recherche du polymorphisme de ces marqueurs s'effectuera par séquençage en vue de détection des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisme). Ces marqueurs trouvés serviront également pour réaliser la cartographie génétique\* en cours de cette espèce.



Fig 3 : carte des populations « anciennes »

ANa: Oslofjorden, Norway (48); ANb: landlocked population of Grevelingen, Netherlands (27); ANc: Lough Foyle, Ireland (50); ANd: Cork, Ireland (50); ANe: Port en Bessin, France (34); ASa: Quiberon, France (49); ASb: La Rochelle, France (44); ASc: Vigo, Spain (35); ASd: Ria Formosa, Portugal (14); MWa: Murcia, Spain (45); MWb: Thau Lagoon, France (50); MWc: Port Saint Louis, France (50); MEa: Venice, Italy (23); MEb: Dubrovnik, Croatia (50); BS: Sevastopol, Black Sea, Ukraine (35).



Fig 4 : carte des populations « nouvelles »

Da : Danemark (NykØBing Anlæg et Nissum Bredning) Ta : Tamise, England, RS : River Stour, Suffolk East England SW : Swansea Bay, South Wales, MH : Milford Haven, South Wales Br : Quiberon, Po : Portugal Faro, Tq : Turquie

## I-Matériels et Méthodes

### 1-Matériel biologique et extraction d'ADN

Cinq individus d'*Ostrea edulis* ont été extraits et utilisés comme témoins pour mettre au point les conditions d'amplification des marqueurs. Une fois ces conditions mises au point avec ces témoins, les marqueurs ont été amplifiés sur quelques individus de populations naturelles (cf fig 3). L'ADN extrait de ces populations naturelles d'*Ostrea edulis* était dégradé (la plupart de ces extractions dataient de 1998). Nous avons refait des extractions avec des tissus (branchies) restant (conservation dans l'alcool soit à température ambiante soit à  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Malheureusement ces tissus ont été mal conservés, et les nouvelles extractions ne se sont pas avérées meilleures. Nous avons donc récolté et extrait de nouvelles populations naturelles (cf fig 4).

Toutes ces extractions d'ADN ont été effectuées par la méthode du phénol-chloroforme. Cette méthode est divisée en trois étapes. La première étape correspond à la lyse cellulaire (tampon d'extraction - constitué de NaCl 5 M, Tris 1 M et PH8, EDTA 0.5 M et PH8, SDS 10% - attaquant les membranes des cellules) et à la digestion des protéines cellulaires (grâce à l'action de la protéinaseK pendant quelques heures à  $55^{\circ}\text{C}$ ). La deuxième étape correspond à l'extraction en elle-même. Cette extraction est basée sur la solubilité différentielle des molécules : le phénol permet de séparer les protéines (se retrouvant dans la phase phénolique) des acides nucléiques (se retrouvant dans la phase aqueuse). Le chloroforme permet d'éliminer le phénol. La troisième étape est la libération et le lavage de l'ADN ainsi piégé. Ceci s'effectue par l'ajout d'abord d'éthanol pur puis d'éthanol à 70%. Après cette purification de l'ADN, le culot obtenu

est séché grâce à un Speed Vac, puis il est redilué dans de l'eau pure. L'extraction ainsi obtenue est vérifiée sur gel d'agarose à 1%.

Malgré l'arrivée de matériel biologique « frais », l'amplification ne fonctionnait toujours pas. Nous avons donc changé de méthode d'extraction. Cette méthode dite « Wizard DNA Clean-up System » utilise une membrane. La première étape est toujours la même, sauf que nous utilisons un autre tampon de lyse (2% CTAB : TrisHCl 1M, EDTA 0.5M, NaCl et CTAB). La deuxième étape, l'extraction proprement dite, fait appel seulement au chloroforme. La phase aqueuse est mélangée avec de la résine (5.4 M guanidine thiocyanate), et, le tout est passé sur la membrane à l'aide d'une seringue. Après un nettoyage avec de l'isopropanol à 80%, nous récupérons l'ADN qui est resté sur la membrane avec du TE chaud (à environ 70°C). Cette méthode engendre beaucoup de perte, elle nécessite donc plus de tissu. Mais l'ADN extrait est plus propre ce qui expliquerait le meilleur rendement d'amplification.

Toutefois, une tentative d'extraction avec cette méthode a été réalisée sur une ancienne population. Cette ultime tentative n'a pas fonctionné, laissant supposer que nous avons eu un problème d'extraction mais également de conservation des tissus.

Etant donné que le but était de comparer marqueurs neutres et marqueurs non neutres, le fait de refaire un échantillonnage de populations a entraîné l'obligation d'analyser les microsatellites sur ces nouvelles populations de manière à avoir les données de marqueurs neutres.

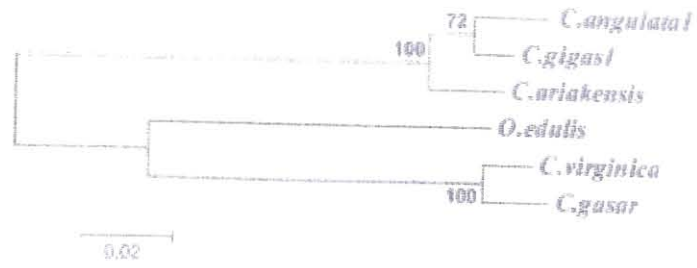


Fig 5 : arbre phylogénétique obtenu à partir du satellite OsedA (Lopez-Flores et al, 2004)

## 2-Techniques moléculaires employées

*Ostrea edulis* est une espèce peu étudiée génétiquement par rapport à *Crassostrea gigas*, principalement à cause du poids économique de cette dernière. Toutefois, l'huître creuse, est une espèce récemment introduite (pour pallier les chutes successives de production des huîtres plate puis « portugaise ») et qui a connu de nombreux transferts de populations. Elle ne présente donc pas les caractéristiques requises pour étudier l'évolution de populations naturelles telles que celles de l'huître plate, endémique de nos côtes.

A ce jour, seulement 6 gènes nucléaires sont connus : Histone3 (Giribet 2003), Métallothionéines A et B (Tanguy et al, 2003 et Boutet 2003), hsc70 et hsp70 (Boutet et al, 2003) ainsi qu'un gène codant pour trois protéines spermatiques (Agelopoulou et al, 2004). A ces gènes, nous avons rajouté un satellite OsedA (Lopez-Flores et al, 2004). Les séquences de ces gènes sont connues. Des amorces ont donc été dessinées soit manuellement, soit à l'aide de logiciels tels que Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) et Oligo3. Malgré le fait que plusieurs couples d'amorces aient été testés (et ce, dans différentes conditions de PCR\*), certains marqueurs - tel que le satellite OsedA, le gène codant pour les trois protéines spermatiques et hsp70 - n'ont pas pu être amplifiés.

Dans un deuxième temps, des gènes connus (Escoubas et al, 2003) chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* ont également été testés. Par cette méthode, un seul gène a pu être amplifié : la Cavortine. Ceci est dû au fait que les séquences de ces deux espèces sont assez éloignées (cf fig 5) : les séquences des amorces ne s'hybrident donc pas avec

Table 1 : caractéristiques des trois microsatellites utilisés

locus	motif répété	taille amplifié	Ta	séquences amorces	
Oedu H15	(ATCT) <i>n</i> *	165-225	50°C	H15-R H15-F	TAA TGA TTT CGT TCG TTG AC TTT TGA CTC TGT GAT ATC GAC
Oedu J12	(GT)14	216-272	50°C	J12-R J12-F	TCG TCA CCT CCC TCT CAG AG GCT GTA TTT CCA TCA ATT CGA G
Oedu U2	(AC)12 (AG)7	146-206	50°C	U2-R U2-F	GAA AGA AAT GGA GGA GGC AAT AAC ACC AAT GAA CAC AGA TCA CC

\* séquence entièrement répétée est (ATCT)4 ATGT (ATCT)2 ATGTATC (TA)3 CTATGT (ATCT)5 A (TACC)4 AATTTTCT (ATCT)3



la même efficacité, voir pas du tout, d'une espèce à l'autre. Il aurait fallu réduire la taille (en nucléotides) de ces amorces mais nous aurions pu perdre la spécificité.

Une fois l'amplification réalisée sur les populations naturelles d'*Ostrea edulis*, les produits de PCR sont d'abord purifiés à l'aide d'acétate d'ammonium puis ils sont séquencés (séquenceur automatique AB 3100). D'abord, il y a une étape dite de « réaction de séquence » (méthode du Big Dye Terminator) . Puis la deuxième étape est une purification des produits de cette réaction de séquence avec de l'éthanol (pur et 70%). Après cette purification, le culot obtenu est séché grâce à un Speed Vac, puis il est resuspendu dans de la formamide.

Malgré le fait que l'amplification fonctionnait, certaines paires d'amorces n'ont pu être utilisées. La cavortine fut ainsi rejeté car deux séquences différentes étaient lues ensemble rendant illisible le profil. La paire d'amorces amplifiait donc deux fragments. Elle n'était pas spécifique. L'histone 3 fut également écartée à cause d'une bande parasite apparaissant lors de l'amplification. Enfin, une des deux paires d'amorces dessinées par oligo3 sur le gène hsc70 a été rejetée à cause d'une amplification trop faible (malgré le test de différentes conditions de PCR) .

En conclusion, seuls deux fragments de gènes ont pu être séquencés : une des deux métallothionéines, et un fragment du gène d'hsc70.

Afin d'avoir des données de marqueurs neutres sur ces 8 nouvelles populations, nous avons étudié 3 locus microsatellites (Launey et al, 2002). Une des deux amorces pour chaque locus est fluorescente (cf table 1). Les produits de PCR sont resuspendus dans de la formamide.

Launey avait génotypé ces individus par radioactivité. Aujourd'hui, nous utilisons la fluorescence. Pour pouvoir déterminer avec exactitude les allèles, des individus témoins ont été utilisés pour calibrer les allèles entre les deux méthodes. Nous avons utilisé le peu d'individus qui avait fonctionné pour les séquences : quelques individus Croates et Norvégiens (les quelques individus bretons ayant fonctionnés sur les séquences n'ont par contre pas été génotypé pour les microsatellites).

### 3-Méthode de traitement des données

Les séquences obtenues peuvent être transformées de manière à obtenir des séquences toutes dans le même sens grâce au programme « Inversion-complémentation d'une séquence nucléique » d'INFOBIOGEN ([http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/invcomp\\_in.pl](http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/invcomp_in.pl)). De cette manière nous pouvons compléter voir corriger les séquences brutes. Puis elles sont toutes alignées grâce au programme Clustalw d'INFOBIOGEN ([http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw\\_in.pl](http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw_in.pl)). Ce premier alignement permet d'observer les différences éventuelles entre les individus. Ces différences sont vérifiées par l'électrophérogramme donné par le séquenceur : elles sont soit corrigées, soit confirmées. Si elles sont confirmées alors nous sommes en présence d'un SNP.

Malgré la dérive génétique, les populations présentent un polymorphisme étonnamment élevé. Cette caractéristique était considérée comme la résultante des processus de la sélection naturelle : les mutations délétères sont éliminées alors que les

mutations avantageuses se propagent. Mais en 1968, Kimura propose la théorie neutraliste. La plupart des mutations non délétères s'avèrent n'avoir aucune incidence sur l'organisme. Ces mutations sont donc considérées comme neutres puisque fondamentalement aléatoires et non avantageuses. Sans aucun avantage sélectif, la fréquence de ces allèles mutés augmente ou diminue de manière aléatoire au cours de la dérive génétique. Dès lors la probabilité de fixation d'un allèle neutre est égale à sa fréquence initiale. L'effet des mutations neutres contrebalance ainsi la fixation aléatoire d'allèles par dérive génétique (Lodé, 1998). Nous pouvons donc mesurer un estimateur du taux de mutation\* dans une population (appelé  $\theta$  qui est égal à 4 fois la taille effective de la population multiplié par le taux de mutation). Ce paramètre peut-être corrigé, ainsi  $\theta_w$  correspond au nombre de sites polymorphes corrigé par la taille de la population. Ce paramètre corrigé permet de comparer plus facilement deux populations qui n'auraient pas le même nombre d'individus par exemple. De même, nous pouvons quantifier la diversité nucléotidique\* dans notre population (appelée  $\pi$ ). La déviation par rapport à ce modèle neutre peut se mesurer à l'aide de différents tests statistiques : nous avons choisi le test de Tajima. Ce test compare  $\theta_w$  avec  $\pi$ . L'hypothèse nulle est le modèle neutre ( $\pi = \theta$ ). Si le test est différent de 0 alors nous avons une déviation du modèle neutre. Ce test est significatif au delà d'un intervalle de (-2, 2). Si le test est positif alors nous avons un excès d'allèles de fréquences intermédiaires, et s'il est négatif nous avons un excès d'allèles rares. Les analyses de polymorphisme et les tests de neutralité sur les séquences ont été réalisés avec le programme DNASP 4.10.3 (Rozas et Rozas, 2005).

Pour l'analyse des microsatellites ainsi que pour les séquences, nous avons utilisé les logiciels GENETIX (Belkhir, 2004) et PHYLIP (Felsenstein, 1989). Le premier permet d'étudier la diversité et la différenciation entre les populations. La valeur Fis donne l'écart de l'équilibre de la population sous l'hypothèse d'Hardy-Weinberg\*. La valeur Fst correspond à la différenciation. Le second logiciel permet à partir des fréquences données par le premier, de réaliser un arbre phylogénétique avec bootstrap. Ce logiciel est divisé en plusieurs programmes, chaque programme étant spécifique. Ainsi, le programme Gendist convertit les fréquences en distances génétiques, le programme Neighbor construit un arbre phylogénétique à partir des distances. Cet arbre est visualisé grâce au logiciel TREEVIEW (Page, 2001). De manière à déterminer la «robustesse» de l'arbre obtenu, nous réalisons un bootstrap grâce aux programmes Seqboot et Consense (plus la valeur est proche de 100, et plus la branche de l'arbre phylogénétique est robuste).

## **II-Résultats**

### **1-Analyse des données pour le fragment du gène MT séquencé**

Le fragment de l'histone 3, qui a été écarté dû à une bande parasite, présentait de légères fluctuations de poids (sur les 5 individus témoins). Sachant que l'histone 3 est relativement bien conservée, il paraît bizarre qu'elle présente des insertions/délétions chez cette espèce. Précisons que le morceau initial du gène Histone 3 faisait moins de 300 pb. Nous avons donc cherché à augmenter quelque peu la séquence. Après une recherche d'homologie de séquence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>)

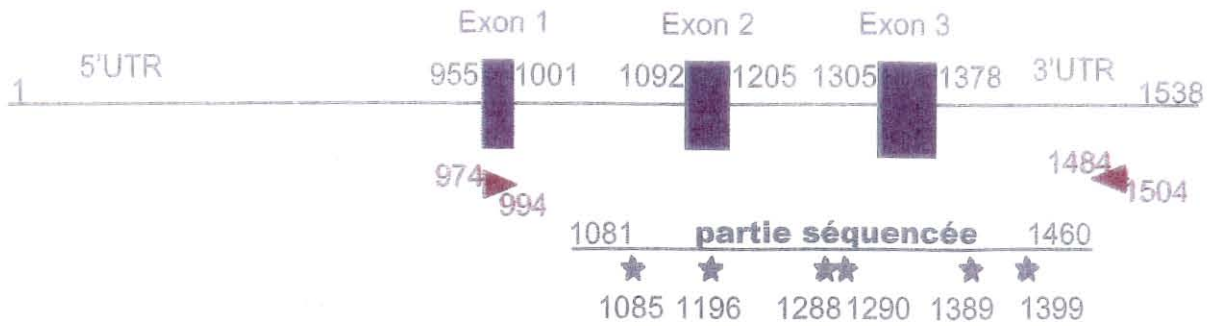


Fig 6 : diagramme de la structure du gène Métallothionéines (MT)

Les amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage du fragment sont représentées en rouge  
Les étoiles représentent les 6 locus présentant du polymorphisme

Table 2 : caractéristiques des deux fragments de gènes utilisés

gènes	taille amplifiat	Ta	séquences amorces	
MT	529 pb	55°C	OeMTAF	TGT CTG ATC CAT GTA ACT GC
			OeMTAR	ATA AAC AGA AAC ACG GAA TG
Hsc70	~450 pb (1503 attendu)	50°C	Hs4F	GTT GGC AAC CAA TCG GTA AG
			Hs4R	GCT CAA ACT CCT CCT TGT CG

Table 3 : Détail du polymorphisme détecté pour le fragment MT séquencés pour les 11 populations

	Intron 2	Exon 2	Intron 3	Intron 3	3'UTR	3'UTR
consensus	C	A	T	T	G	T
Tamise	.IG	.IG	.IG	.IC	.IA	.
Turquie	.IG	.IG	.	.	.IT	.
Swansea Bay	.	.IG	.	.	.IA	.
Milford Haven	.IG	.IG	.IG	.	.IA	.
River Stour	.	.	.	.	.	.
Portugal-Faro	.IG	.IG	.	.IC	.	.IA
Quiberon 2005	.IG	.IG	.	.	.IA	.
Danemark	.	.	.IG	.	.	.
Oslo	.IG	.IG	.	.	.IA	.
Croatie	.IG	.IG	.IG	.	.IT	.
Quiberon	.	.IG	.IG	.	.IT	.

Le consensus correspond au nucléotide le plus présent à ce locus pour toutes les populations étudiées, le point indique l'homologie avec la séquence consensus, .IG correspond à la présence des deux nucléotides à ce locus pour la population considérée

grâce au programme « blast », il se trouve qu'il était semblable à une séquence plus grande chez plusieurs espèces de *Mytilus*. Les amorces ont donc été dessinées sur cette séquence. Il faudrait donc éventuellement dans un premier temps vérifier que le fragment amplifié correspond au gène attendu, puis, rechercher les délétions et insertions qui semblent exister.

La paire d'amorces dessinée sur le gène *hsc70* nous donnait un amplifiat de taille non attendue (cf Table 2). De plus, le fragment séquencé ne s'aligne pas avec ce gène. Après une recherche d'homologie de séquence ), ce fragment amplifié nous donne 100% d'identité (pour seulement 21 pb) avec *hsc70* et *hsp70* d'*Ostrea edulis*, et 84% (178 pb sur 211) avec un microsatellite de la même espèce (HA 10 – AF297863). En fait le fragment s'aligne après la séquence du microsatellite, et, dans ce cas, nous avons 88% d'identité, ce qui reste relativement peu étant donné que nous sommes en présence de deux séquences de la même espèce. Suite au séquençage des deux fragments, du polymorphisme de substitution ponctuelle (SNP) a été mis en évidence au terme d'un processus d'alignement et de vérification visuelle des séquences obtenues uniquement dans un seul de ces fragments. Ainsi, toutes les analyses ont été effectuées sur le fragment MT.

Le fragment amplifié du gène MT regroupait les trois exons de ce gène situés à la fin de la séquence (cf fig 6). Après séquençage de l'amplifiat, il nous manque l'exon 1, le plus petit des exons. Le fragment séquencé fait environ 380 pb (selon les individus) et il comporte 6 locus présentant du polymorphisme intra et inter populations (cf table 3). Les 6 locus sont des SNPs, aucune délétion ou/et insertion n'a été trouvée. Sur ces 6 locus, un est présent dans une partie codante, l'exon 2. Il est à noter que le changement

Table 4 : Les indices de diversité selon les différentes régions du fragment MT

région	longueur	Indices de Diversité		
		S	Pi	Theta W
Intron	10	1	0,04156	0,02192
Exon 2	113	1	0,00433	0,00213
Intron	98	2	0,00499	0,00487
Exon 3	73	0		
3'UTR	81	1	0,05137	0,02192
Total	380	5	0,00651	0,00391

S est le nombre de sites polymorphes, Pi est la diversité nucléotidique

Theta W est la proportion de sites polymorphes pour un échantillon corrigé par la taille de l'échantillonnage

Table 5 : Résultats des indices de Diversité et de test de Neutralité sur les 11 populations pour le fragment MT séquencé

Populations	Indices de Diversité					Test Statistique de neutralité
	S	Nb haplotypes	Pi	Theta W	Rm	Tajima's D
Oslo	3	3	0,00254	0,00303	0	-0,49373
Danemark	1	2	0,00051	0,0008	0	-0,64112
Tamise	5	13	0,00346	0,0035	2	-0,02797
River Stour	0	1	0	0		
SW sans SW1	3	5	0,00137	0,00217	1	-0,95384
Swansea Bay	3	5	0,00145	0,00213	1	-0,80234
Milford Haven	4	6	0,00245	0,00258	1	-0,13047
Br sans Br4	3	5	0,00211	0,00214	1	-0,03096
Quiberon 2005	2	4	0,00197	0,00137	1	0,91245
Gm sans Gm11	2	4	0,00189	0,00176	1	0,21992
Gm sans 11et24	2	3	0,0018	0,00204	0	-0,44794
Quiberon	1	2	0,0007	0,00084	0	-0,34144
Portugal-Faro	4	5	0,00358	0,00306	1	0,50688
Croatie	4	8	0,00664	0,00402	2	2,14522*
Turquie	2	3	0,00209	0,00166	0	0,70029

S est le nombre de sites polymorphes, Pi est la diversité nucléotidique, Rm est le nombre minimum d'événement de recombinaison, et,

Theta W est la proportion de sites polymorphes pour un échantillon corrigé par la taille de l'échantillonnage, \* P < 0,05

de nucléotide change l'acide aminé : le codon ACA code pour le thréonine, et le codon GCA code pour l'alanine.

Nous avons séquencé le gène MT pour plusieurs individus de plusieurs populations. Nous avons donc déterminé les deux allèles à chaque locus de ce fragment pour chaque individu. Pour les individus homozygotes ou hétérozygotes à un seul locus, les deux haplotypes sont faciles à déterminer. Malheureusement, certains individus sont hétérozygotes à deux locus, et, un individus l'est à trois. Dans ce cas, nous ne pouvons pas savoir avec certitude les haplotypes de chaque individu. Pour cela, il aurait fallu cloner et séquencer ces individus pour pouvoir déterminer avec exactitude les haplotypes. Nous avons donc décidé de réaliser les analyses avec tous les haplotypes possibles. Nos résultats seront donc légèrement biaisés.

La diversité nucléique globale (cf table 4), basée sur l'analyse de tous les haplotypes rencontrés (nous avons dénombré 19 haplotypes différents sur toutes les populations étudiées), est estimée à  $65.1 \cdot 10^{-4}$ . Cette diversité est plus grande pour les parties non codantes (Intron 2 et 3'UTR) et plus faible (Exon 2) voir inexistante (Exon 3) pour les parties codantes.

La diversité nucléique des populations (table 5) est relativement faible par rapport à celle estimée précédemment. Elle est même plus faible que celle estimée pour l'exon. Il n'y a que la population de Croatie qui a une valeur quasi équivalente.

Pour cette même population, le test de neutralité (cf table 5) est nettement positif, et, de plus significatif. Nous pouvons remarquer que dans l'ensemble, les populations Méditerranéennes présentent un test positif (incluant le Portugal), tandis que les



Table 6 : Valeur de Fst par paires entre les 11 populations pour les 6 locus polymorphe de MT

	Turquie	Swansea Bay	Milford Haven	River Stour	Quiberon 2005	Portugal-Faro	Danemark	Oslo	Croatie	Quiberon
Tamise	0,28339	-0,02521	-0,01778	-0,02668	-0,03489	0,02916	0,03866	-0,06373	0,42068***	0,01244
Turquie		0,36831**	0,29844	0,37137	0,18279	0,03528	0,51915*	0,17963	-0,02429	0,20076
Swansea Bay			-0,01065	-0,0695	-0,02314	0,07733	0,03111	-0,08667	0,46815**	-0,00313
Milford Haven				-0,0132	-0,00757	0,0545	0,01505	-0,04238	0,38244***	0,00668
River Stour					-0,00226	0,04707	-0,01938	-0,09804	0,43234	0,02971
Quiberon 2005						-0,02278	0,09918	-0,0956	0,3284	-0,01299
Portugal-Faro							0,1884	-0,03939	0,18145	0,03513
Danemark								0,05713	0,57363***	0,14443
Oslo									0,29888*	-0,07362
Croatie										0,23935

\*  $P < 0,05$

\*\*  $P < 0,01$

\*\*\*  $P < 0,001$

Table 7 : Diversité génétique intrapopulation aux 3 locus microsatellites pour les 10 populations

Populations	taille	Na	Ho	He	Fis
Tamise	58	19	0,842 (0,123)	0,893 (0,030)	0,06581 ***
Turquie	30	19,33	0,788 (0,281)	0,910 (0,035)	0,15149 ***
Swansea Bay	31	17,33	0,892 (0,081)	0,889 (0,016)	0,0123
Milford Haven	30	17,67	0,822 (0,171)	0,903 (0,032)	0,10658 ***
River Stour	9	10,33	0,852 (0,257)	0,839 (0,096)	0,04416
Portugal-Faro	16	14,33	0,875 (0,108)	0,895 (0,016)	0,05476
Quiberon 2005	26	18,33	0,934 (0,083)	0,915 (0,028)	0,00103
Danemark	23	14,67	0,855 (0,181)	0,882 (0,040)	0,05255
Oslo	7	6,6	0,524 (0,082)	0,718 (0,159)	0,34***
Croatie	5	6,6	0,783 (0,202)	0,789 (0,09)	0,12693

Na est le nombre moyen d'allèles par locus

Ho est l'hétérozygotie observée (écart type)

He est l'hétérozygotie calculée (écart type)

\* valeur significativement différente de 0 ie pop à l'équilibre de HW

populations Atlantiques présentent un test négatif. Ces résultats ne sont cependant pas significatifs.

Le test de neutralité a été analysé dans plusieurs conditions pour trois populations (Swansea Bay, Quiberon et Quiberon 2005). Ces populations présentaient 1 ou 2 individus avec une incertitude sur leur génotype à un des locus. De manière à ne pas biaiser les résultats, l'analyse a donc été effectuée avec et sans ces individus. Pour la population Galloise, nous n'observons pas de différence avec ou sans cet individu. Par contre, pour les deux autres populations, nous avons un changement des valeurs du test, ceci dit, celui ci reste non significatif.

Les valeurs de  $F_{st}$  (cf table 6) sont plus grandes que pour les microsatellites, par contre elles ne sont pas ou peu significatives. Nous notons une différenciation entre Atlantique et Méditerranée mais cette divergence n'est pas très nette. La seule population présentant des valeurs significatives est la Croatie : elle diverge avec pratiquement toutes les populations de l'Atlantique : Tamise (0,42), les deux populations Galloises (0,46 et 0,36), le Danemark (0,57) et la Norvège (0,29).

L'arbre phylogénétique (cf fig 7) nous donne un profil qui est ramifié pour deux de ces « branches de bases ». La première des ramifications nous place un ensemble Atlantique (Quiberon, Swansea Bay, et, avec 79% de solidité pour River Stour et Danemark). La deuxième nous donne un mélange Atlantique et Méditerranéen. Nous retrouvons ainsi les populations Norvégienne, Anglaise et Bretonne (Quiberon 2005 avec 73%) avec les populations Méditerranéennes (Turquie et Croatie à 94% et Portugal à 82%).

Table 8 : Valeur de Fst par paires entre les 10 populations

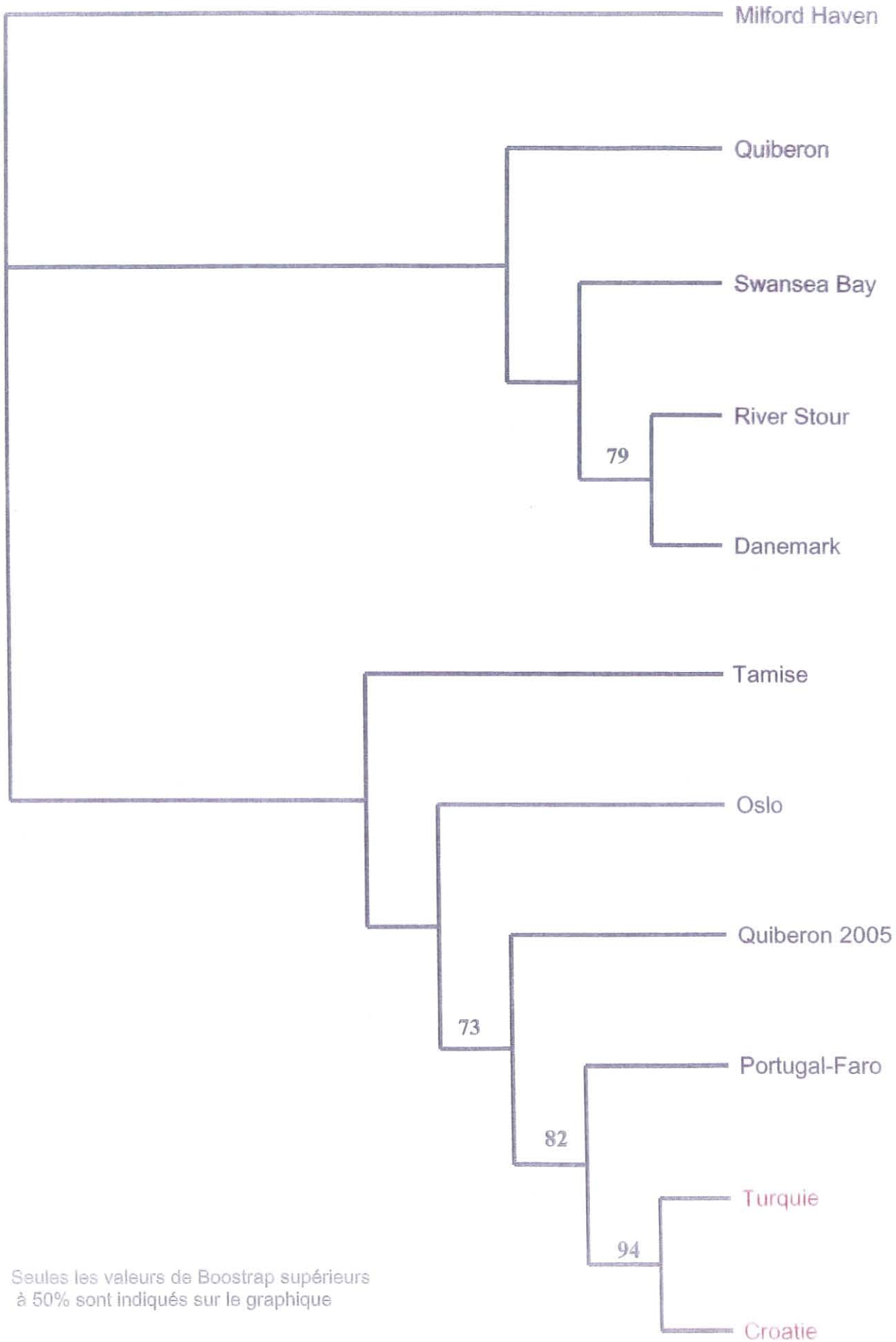
	Turquie	Swansea Bay	Milford Haven	River Stour	Portugal-Faro	Quiberon2005	Danemark	Oslo	Croatie
Tamise	0,03144***	0,00434	0,00106	-0,00544	0,01306*	0,00812**	0,03153***	0,02344	0,07356***
Turquie		0,03500***	0,01841***	0,03316***	0,02234	0,03027***	0,03476***	0,0577**	0,03635
Swansea Bay			0,00401	-0,00246	0,01898***	0,00915	0,02491***	0,03415**	0,07465***
Milford Haven				-0,00486	0,00668	0,00683	0,01692***	0,03365**	0,05854***
River Stour					0,02302	0,00233	0,01341	-0,00003	0,07392***
Portugal-Faro						0,01783	0,02302**	0,06309**	0,03517
Quiberon2005							0,01397**	0,05937***	0,0513***
Danemark								0,06937***	0,06835**
Oslo									0,14049*

\*  $P < 0,05$

\*\*  $P < 0,01$

\*\*\*  $P < 0,001$

Fig 7 : arbre phylogénétique basé sur la distance génétique de Nei de 11 populations pour le gène MT



Seules les valeurs de Bootstrap supérieures à 50% sont indiqués sur le graphique

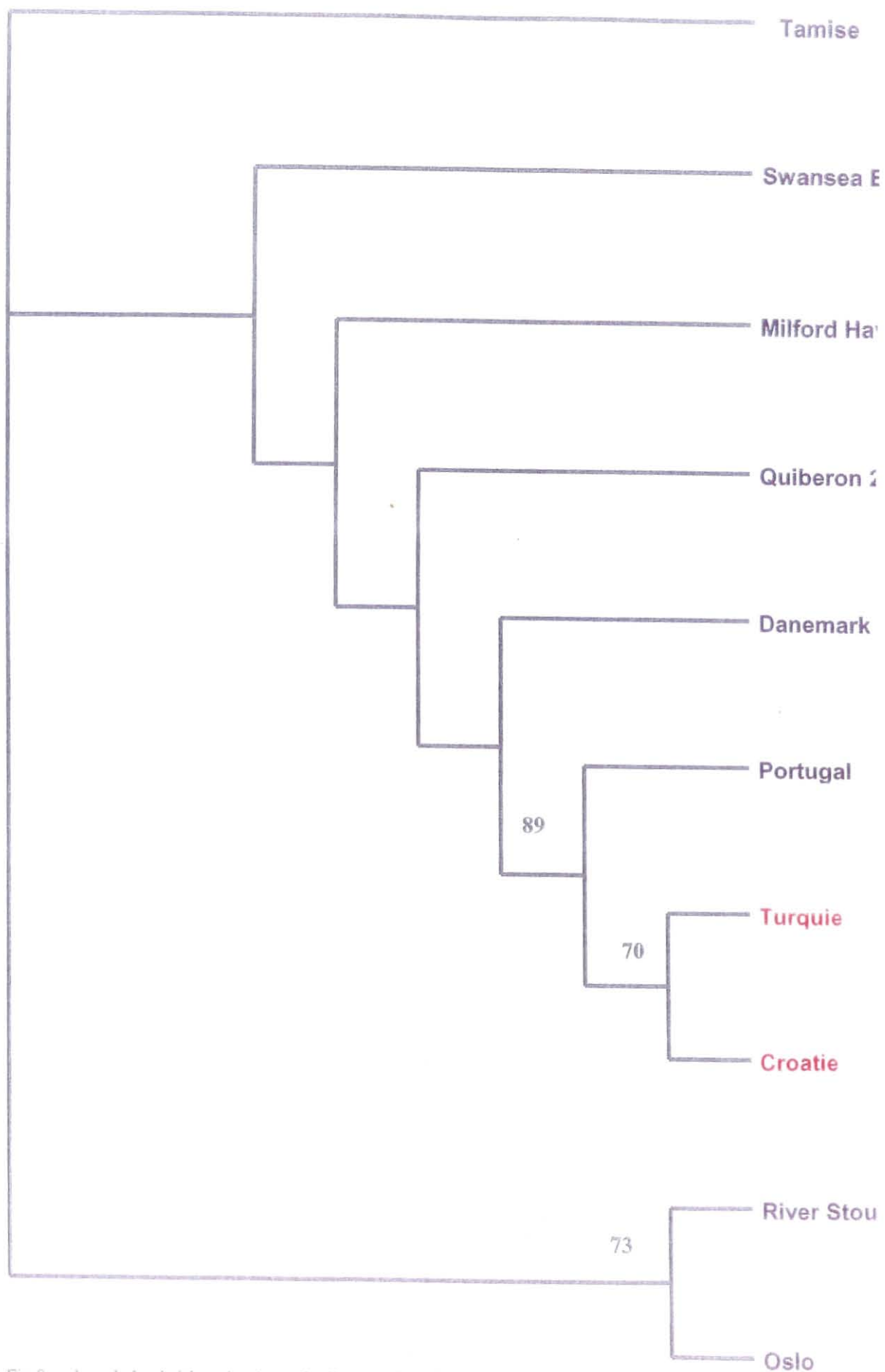


Fig 8 : arbre phylogénétique basée sur la distance de Nei pour 10 populations pour les 3 locus microsatellites

## 2-Analyse des données pour les microsattellites

Tous les individus des nouvelles populations ont été génotypés à ces trois locus.

Nous avons deux populations Danoises proches géographiquement, d'après les  $F_{st}$  (0.003), nous avons donc pu rassembler ces deux populations en une seule (de même pour la Tamise  $F_{st}$  de 0.002). (données non montrées)

D'après la table 7, nous observons un niveau de polymorphisme assez élevé (Na moyen est de 16.37). Seulement 4 populations (Oslo, Tamise, Turquie et Milford Haven) montrent un déficit en hétérozygotes indiquée par les valeurs significative du  $F_{is}$ . Il faut noter que le déficit en hétérozygotes est très important pour le locus OeduH15 qui présente au moins un allèle nul. Pour le reste des populations, les valeurs de  $F_{is}$  ne sont pas significativement différentes de zéro.

Nous remarquons que seulement 4 populations (Turquie, Croatie, Oslo et Danemark) donnent des valeurs de  $F_{st}$  significatives (cf table 8) avec les autres populations. Dans l'ensemble ces valeurs sont relativement faibles. Les populations Turque et Croatie divergent avec toutes les populations Atlantiques. Ceci dit, nous remarquons qu'aucune des deux populations ne donne une valeur significative avec la population Portugaise. Les populations Danoise et Norvégienne divergent avec toutes les populations (sauf avec River Stour – absence de valeur significative).

L'arbre phylogénétique (cf fig 8) nous donne trois groupes de populations :

- un groupe méditerranéen comportant la Croatie, la Turquie (bootstrap de 70%) et le Portugal (89%)
- un groupe atlantique regroupant les deux populations du Pays de Galles (Swansea Bay et Milford Haven), la Bretagne et le Danemark

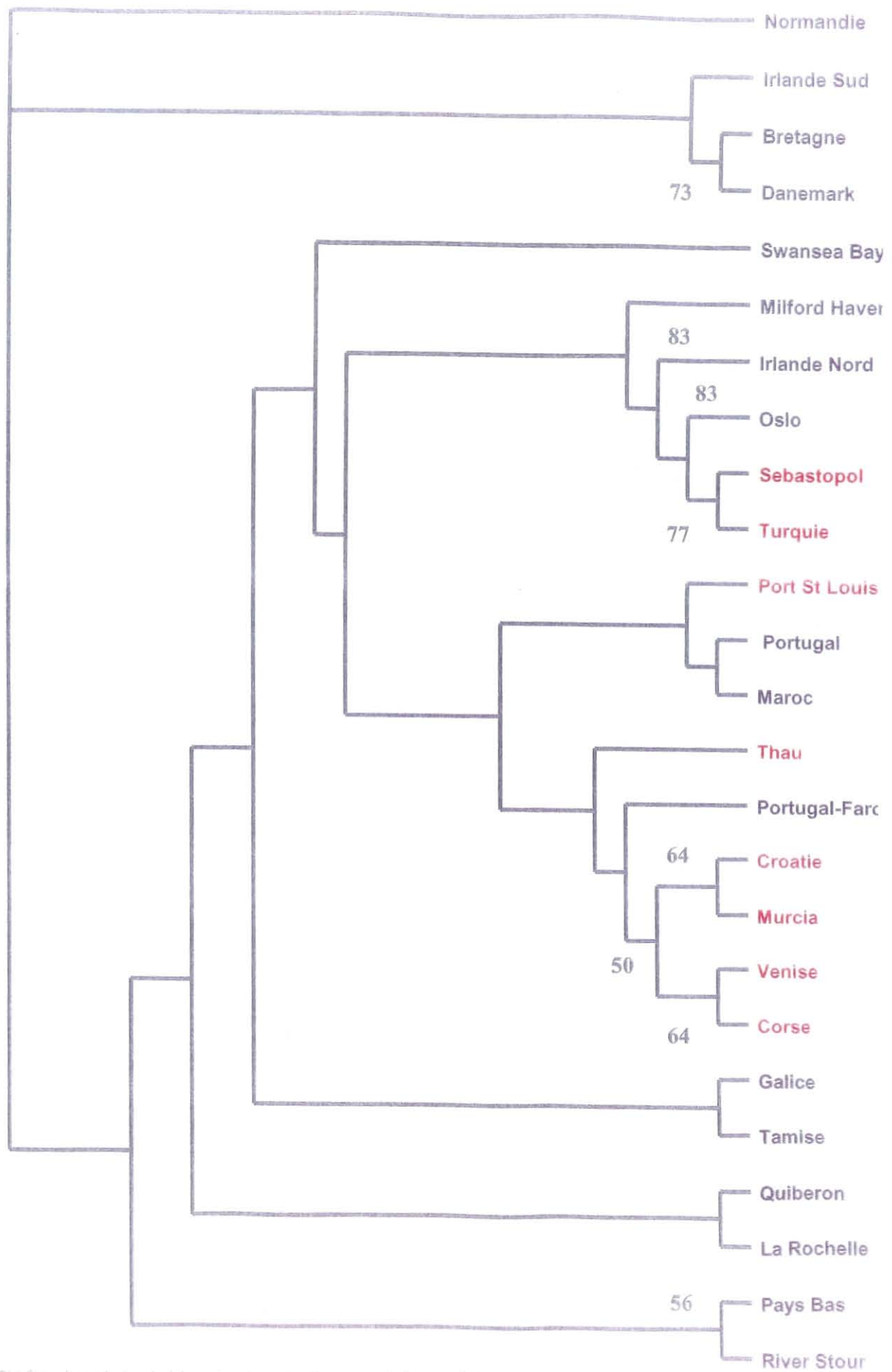


Fig 9 : arbre phylogénétique basé sur la distance génétique de Nei pour 25 populations Européennes pour 3 marqueurs microsatellites

- un groupe atlantique regroupant la population anglaise (River Stour) et la Norvège (bootstrap de 73%)

Intégration avec les données précédentes (Launey et al, 2002) :

Nous avons intégré mes données avec celles qui avaient déjà été effectuées. Nous avons réduit le nombre de locus microsatellites étudiés par rapport à l'étude de Launey et al car nous avons génotypé les nouvelles populations pour seulement 3 locus. Mais nous avons aussi un panel plus important de l'aire de répartition de l'espèce.

L'arbre phylogénétique (cf fig 9) nous montre trois groupes :

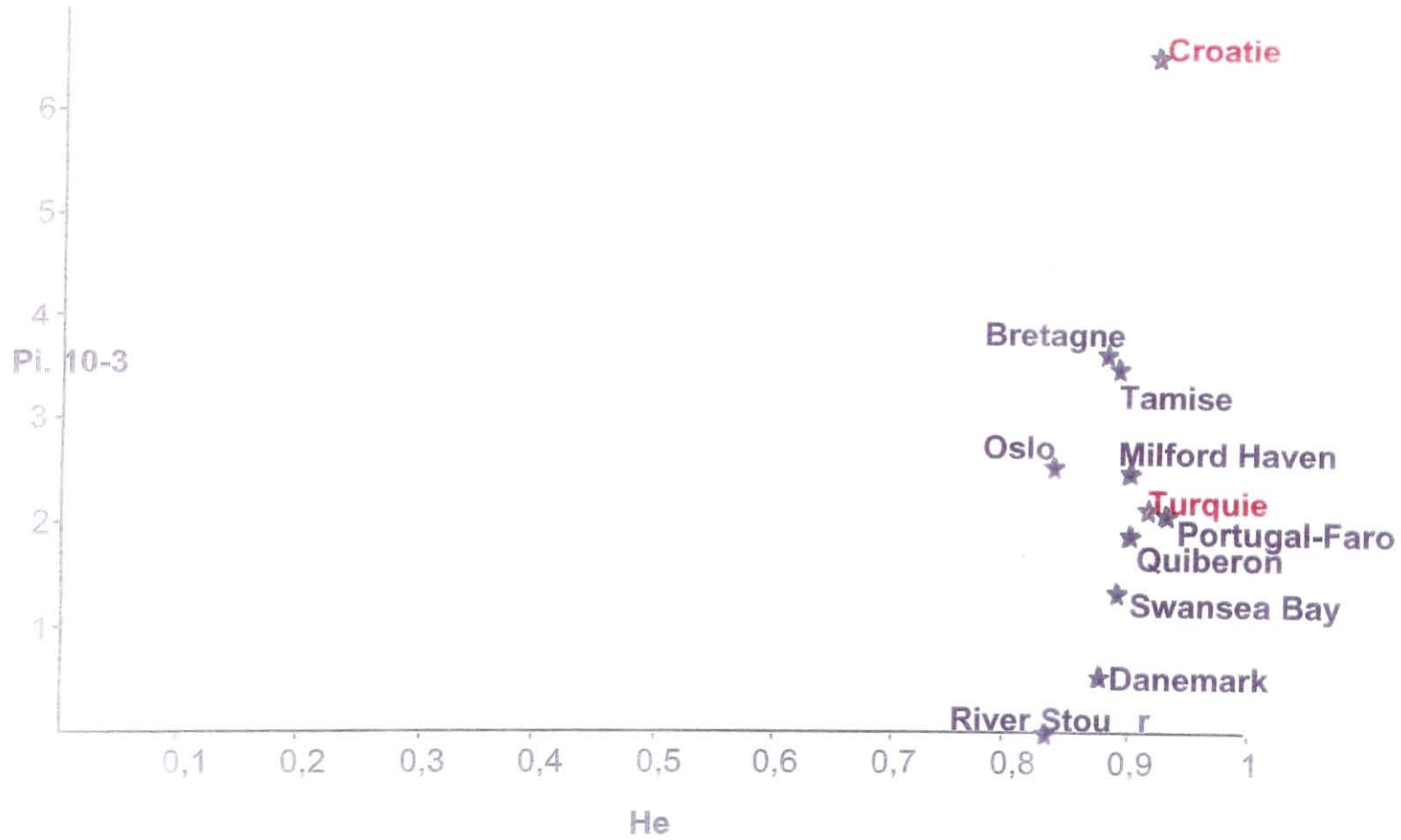
- un groupe Méditerranéen (50%) bifurquant en deux groupes chacun supporté à 64% : Croatie et Murcia, et, Venise et la Corse.
- Un groupe Atlantique où la population Bretonne (Quiberon 2005) se groupe avec le Danemark (73%) alors que celle de l'étude précédente avec La Rochelle. La population Faro (Portugal 2005) se groupe avec la Normandie alors que celle de l'étude précédente avec le Maroc. Donc ce groupe nous donne un mélange Atlantique Sud et Atlantique Nord (avec les populations britanniques)
- Un mélange Atlantique nord et Méditerranéen Est (83%) regroupant Sevastopol (Mer Noire) avec la Turquie (77%) et la population Norvégienne (83%) puis l'Irlande du Nord.

3-Comparaison des données marqueurs neutres/marqueurs non neutres

La figure 10 permet de comparer les données des marqueurs neutres avec celles des marqueurs non neutres. Ainsi en abscisse nous trouvons l'hétérozygotie calculée



Fig 10 : corrélation entre la diversité nucléotidique (Pi) pour MT et la diversité des microsatellites (He)



pour les microsatellites, et en ordonnée la diversité nucléotidique du fragment MT. Aucune corrélation entre ces deux types de marqueurs n'apparaît. La seule population pouvant appartenir à une droite imaginaire serait la Croatie.

### III-Discussion

Nous remarquons que les séquences étudiées d'*Ostrea edulis* présentent des taux de polymorphisme variable. Notre fragment de gène inconnu par exemple faisant 388 pb (après correction de la séquence) ne présente aucun polymorphisme. Une étude réalisée sur *Crassostrea gigas* pour le gène TIMP faisant 399 pb (Saminadin 2003) montrait 3 SNP dont deux dans des exons, même avec un nombre de populations moins important. Cependant, les 6 SNPs détectés sur le fragment MT ( 380 pb) montre qu'il peut exister un polymorphisme non négligeable si l'on s'intéresse à l'aire de répartition de cette espèce.

Les tests statistiques de neutralité obtenus pour MT ne sont pas significatifs, sauf pour la population Croate, donc nous ne pouvons mettre clairement en évidence un éventuel processus sélectif. La seule population présentant un test de neutralité significatif est la Croatie. Ce test étant nettement positif nous pouvons en déduire que la présence de quelques allèles rares visiblement fixés et éventuellement avantageux entraînerait un excès d'allèles intermédiaires. De telles structures de diversité nucléotidique peuvent résulter d'une structuration de la population Croate ou de l'action de la sélection naturelle.

Table 9 : Diversité génétique intrapopulation aux 6 locus de MT pour les 11 populations

Populations	taille	Na	Ho	He
Tamise	25	1,83	0,0867 (0,0927)	0,1241 (0,1026)
Turquie	6	1,5	0,0556 (0,0861)	0,2083 (0,2406)
Swansea Bay	11	1,5	0,0455 (0,0761)	0,0720 (0,0850)
Milford Haven	14	1,6	0,1190 (0,1330)	0,1267 (0,1044)
River Stour	4	1	0	0
Portugal-Faro	7	1,5	0,0694 (0,1108)	0,1288 (0,1508)
Quiberon 2005	12	1,6	0,0952 (0,1475)	0,2177 (0,1837)
Danemark	11	1,16	0,0303 (0,0742)	0,0275 (0,0675)
Oslo	7	1,5	0	0,1224 (0,1341)
Croatie	5	1,6	0,1667 (0,2658)	0,3100 (0,2412)
Quiberon	6	1,5	0,0944 (0,1639)	0,1413 (0,1712)

Na est le nombre moyen d'allèles par locus

Ho est l'hétérozygotie observée (écart type)

He est l'hétérozygotie calculée (écart type)

\* valeur significativement différente de 0 ie pop à l'équilibre de HW

Il ne faut pas oublier que nous avons biaisé le nombre d'haplotypes réels. Il faut également prendre en compte les conditions d'application de ce test qui sont entre autres une population à l'équilibre de Hardy-Weinberg, la taille de la population, l'absence de recombinaison entre les loci. Sur 30 individus en moyenne par population, le tiers dans la plupart des cas a pu être séquencé (résultat de la sélection des différentes étapes conduisant au séquençage à savoir l'amplification, la purification de ces produits, et le séquençage). Etant donné que nous avons pris pour les analyses tous les haplotypes possibles à partir des génotypes, nous avons augmenté le nombre de recombinaison entre les locus.

Néanmoins nous observons une certaine répartition de la diversité nucléotidique. En effet, des polymorphismes « quasi spécifiques » ont été mis en évidence. Ainsi, les populations Méditerranéennes présentent des génotypes qui sont soit rares soit inexistantes chez les populations Atlantiques. Ces populations sont donc différenciées. Dans les populations Turque et Croate, les homozygotes GG sont plus fréquents aux deux premiers locus tandis que, dans les autres populations, les homozygotes CC au locus 1 et AA au locus 2 sont plus fréquents. Dans le même ordre d'idée, les populations Turque et Croate présentent plus d'hétérozygotes aux mêmes locus que les autres populations (cf table 9). Une différenciation nette, uniquement pour les populations Méditerranéennes extrêmes de l'aire de répartition apparaît.

Ce travail s'est appuyé sur celui de Ryyänen et Primmer (2004) qui ont travaillé sur le polymorphisme d'un gène d'hormone de croissance (GH1) chez le saumon de l'Atlantique. Ils ont ainsi cherché la variation génétique de ce gène au sein de population Européenne et d'Amérique du Nord, afin de compléter des données

microsatellites. Ces données microsatellites montraient un modèle d'isolement par la distance. En séquençant la totalité du gène ( 4712 pb), ils trouvent 17 sites polymorphes (SNP, délétion et insertion) identifiés dans 9 populations. La diversité nucléique de ce gène apparaît similaire à celle d'autres espèces. Par contre, aucun polymorphisme chez le saumon n'a été observé dans les parties codantes du gène, indiquant que la diversité nucléique des exons est 3 à 25 fois moins importantes que chez l'Homme et la Drosophile. Les tests de neutralité sont significativement positifs pour deux populations. L'excès d'allèles intermédiaires rencontrés s'expliquerait par le fait que ces deux populations Européennes résultent d'un flux de gène plus ou moins récent venant d'Amérique du Nord.

Contrairement à cette étude, nous n'avons pas pu séquencer tout le gène MT, mais nous avons observé du polymorphisme dans un exon. Leur nombre d'haplotypes est supérieur au nôtre ce qui paraît logique étant donné la plus grande taille du fragment étudié, par contre, nos valeurs de  $\pi$  et de  $\theta W$  sont plus fortes (respectivement  $65,1 \cdot 10^{-4}$  et  $39,1 \cdot 10^{-4}$  contre  $14,8 \cdot 10^{-4}$  et  $13,2 \cdot 10^{-4}$ ).

Les deux études, saumon et huître, montrent respectivement une faible et nulle corrélation entre la diversité nucléotidique au fragment du gène étudié et la diversité aux marqueurs microsatellites. Ceci nous indique que la variation aux marqueurs neutres ne donne pas d'information sur la variation des gènes, au moins au gène MT étudié dans notre cas.

Les valeurs de Fis pour beaucoup de populations ne sont pas significativement différentes de zéro pour les données microsatellites. Ceci confirmerait les études de Launey en 2002 : les populations d'*Ostrea edulis* étudiées sont soit proches de la

panmixie soit en panmixie. Il a cependant été montré que certaines cohortes peuvent présenter de la consanguinité dans un espace temporelle et spatiale relativement restreint. Cette possible consanguinité à l'échelle locale est corroborée par l'observation d'une faible variabilité génétique (et donc d'effectifs efficaces locaux réduits) observée dans une cohorte recrutée en 1994 sur une courte période en Méditerranéen (Launey, communication personnelle). De plus, une étude réalisée elle aussi en Méditerranéen en 2001, a mis en évidence qu'un faible nombre de pères contribuait à une descendance femelle (Mira, 2001). En effet, la présence de consanguinité suppose plusieurs conditions : d'abord que les individus soient issus d'un nombre restreint de géniteurs (effectif efficace local réduit), ensuite que ces mêmes individus se soient fixés au substrat relativement près les uns des autres (implique une cohésion du nuage larvaire avant fixation), forment une cohorte et se reproduisent enfin entre eux (effet Wahlund temporel et spatial entraînant de la consanguinité à la génération suivante) (Taris, 2001).

Les données de l'ARNr 12S regroupaient par la présence de deux haplotypes (I et C) une population Atlantique du Nord (Oslo) avec une population de Mer Noire (Sebastopol). Ce regroupement des populations se situant dans les aires de répartition extrêmes, se retrouve avec les données microsatellites en ajoutant les 8 nouvelles populations au 17 populations déjà étudiées. Il est même soutenu par la présence de la population Turque, et celle de l'Irlande du Nord. Il est à noter toutefois que nous avons diminué le nombre de marqueurs microsatellites ( passage de 5 locus sur 17 populations à 3 locus sur 25 populations) brouillant par ailleurs la structure nette « Atlantique/Méditerranée » observée avec 5 locus.

## Conclusion et perspectives

Le but de ce sujet était de comparer les données des marqueurs neutres avec ceux des marqueurs non neutres. Il semble, dans le cas de cette étude, c'est à dire finalement que pour un unique gène, qu'il n'y ait pas de corrélation. Toutefois, l'étude devra être complétée en essayant de séquencer le gène entier, davantage d'individus par population, et de connaître les haplotypes grâce au clonage des allèles.

Le travail d'identification de gènes chez l'huître creuse devrait bénéficier d'une augmentation du nombre de gènes caractérisés chez la plate, et ainsi permettre de réaliser ce genre d'étude à une échelle plus importante.

Alors que les bivalves marins présentent un haut degré de polymorphismes allozymiques, les données de polymorphisme de séquence d'ADN codant sont inexistantes. Ces données sont pourtant indispensables à la fois pour reconstituer l'histoire évolutive des gènes mais aussi pour détecter les gènes qui sont sous l'emprise directe de la sélection.

Il faudrait également génotyper les 25 populations sur les 5 locus microsatellites pour vérifier le regroupement « des populations extrêmes » et confirmer la structure « Atlantique/Méditerranée ».

L'unique marqueur trouvé participera par la suite à la réalisation de la cartographie génétique de cette espèce. La cartographie d'*Ostrea edulis* se fait actuellement grâce à des AFLP\* et microsatellites.

## Bibliographie

Agelopoulou B., Aleporou-Marinou V., Cary P. D., Pataryas T., Crane-Robinson C. (2004), The sperm-specific proteins of the edible oyster (European flat oyster *Ostrea edulis* ) are products of proteolytic processing, *Biochimica et Biophysica Acta* **1676** (2004) 12-22

Bataillon T. & Kirkpatrick, M. 2000 Inbreeding depression due to mildly deleterious mutations in finite populations: size does matter. *Genet Res* **75**, 75-81

Bierne, N., Launey, S., Naciri-Graven, Y. & Bonhomme, F. 1998 Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* **148**, 1893-906

Bierne, N., Borsa, P., Daguin, C., Jollivet, D., Viard, F., Bonhomme, F. & David, P. 2003 Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology* **12**, 447-462.

Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F. & Gérard, A. 1998 Differentiation between populations of the portuguese oyster, *Crassostrea angulata* and the pacific oyster *Crassostrea gigas* revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **226**, 279-291.



Boutet I. (2003), réponses aux stress induits par les xénobiotiques chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : approches cellulaire et moléculaire, thèse, 61 p, Université de Bretagne Occidentale

Boutet I., Moraga D., Tanguy A. (2003), Organization and nucleotide sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate (*hsc70*) and heat shock protein (*hsp70*) genes, *Aquatic Toxicology* **65** 221-225

Daguin, C., Bonhomme, F. & Borsa, P. 2001 The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus mac-1. *Heredity* **86**, 342-354.

Diaz Almela E., Boudry P., Launey S., Bonhomme F., Lapègue S. (2004), Reduced female gene flow in the European flat oyster *Ostrea edulis*, *Journal of Heredity* 2004: **95**(6): 510-516

Escoubas J.M., Gueguen Y., Cadoret J.P., Flament D., Barreau-Roumiguière C., Girardot A.L., Garnier J., Hoareau A., Bachère E. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria challenged oyster *Crassostrea gigas*, *gene* **303** (2003) 139-145

Giribet (2003), Bivalve phylogeny and molecular data *Molecular Systematics and Phylogeography of Mollusks* : 45-90; Smithsonian Books, Washington, DC

Henry J-P, Gouyon P-H (1999), Précis de génétique des populations, édition Dunod, 186 p

Huvet, A., Lapègue, S., Magoulas, A. & Boudry, P. 2000 Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics* **1**, 251-262.

Launey S. (1998), marqueurs microsatellites chez l'huître plate, *Ostrea edulis* L. : caractérisation et applications à un programme de sélection pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae* et à l'étude de populations naturelles, thèse, 214 p, Institut National Agronomique Paris Grignon

Launey, S. & Hedgecock, D. 2001 High Genetic Load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* **159**, 255-265.

Launey S., Ledu C., Boudry P., Bonhomme F., Naciri-Graven Y. (2002), Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism, *Journal of Heredity* 2002: **93**: 40-47

Lodé Thierry (1998), cours de génétique des populations, édition Ellipses, 126 p

López, J. L., Mosquera, E., Fuentes, J., Marina, A., Vázquez, J. & Alvarez, G. 2001 Two-dimensional gel electrophoresis of *Mytilus galloprovincialis*: differences in

protein expression between intertidal and cultured mussels. *Mar Ecol Prog Ser* **224**, 149-146.

Lopez-Flores I., De La Herran R., Garrido-Ramos M.A., Boudry P., Riuz-Rejon C., Ruiz-Rejon M. (2004), The molecular phylogeny of oysters based on a satellite DNA related to transposons, *Gene* **339** (2004), 181-188

Marteil L. (1973), l'huître (p 1728), dans *La Mer* (tome 6) de G. Marais et G. Batelière, éditions Kister

Mira Da Silva S.M. (2001), La variabilité génétique chez l'huître plate : *Ostrea edulis* (L.1758) : Inférence du nombre de géniteurs instantané d'une population. Rapport de DEA, Université Montpellier II

Naciri-Graven Y., Martin A.G., Baud J.P., Renault T., Gérard A. (1998), Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*, *Journal of experimental Marine Biology and ecology* **224** (1998) 91-107

Naciri-Graven Y., Haure J., Gérard A., Baud J.P. (1999), Comparative growth of *Bonamia ostreae* resistant and wild flat oyster *Ostrea edulis* in a intensive system, second year of the experiment, *Aquaculture* **171** (1999) 195-208

Ryynänen H.J., Primmer C. R., (2004), Distribution of genetic variation in the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmon salar*) populations from Europe and North America, *Molecular Ecology* **13** 3857-3869

Saavedra C., Zapata C., Alvarez G. (1995), Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*, *Marine Biology* 122 : 95-104

Saminadin S. (2003), Evolution du gène Cg-TIMP chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : une signature de la sélection naturelle en réponse à la résistance aux pathogènes ?, rapport de DEA, 57 p, Université de Tours

Solé-Cava, A. M. & Thorpe, J. P. 1991 High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. *Biological Journal of the Linnean Society* **44**, 65-80.

Tagu D. (1999), Principes des techniques de biologie moléculaire, INRA édition, 131 p

Tanguy A., Moraga D., Boutet I., Riso R., Boudry P., Auffret M. (2003), Metallothionein genes in the European flat oyster *Ostrea edulis* : a potential ecological tool for environmental monitoring, *Marine Ecology progress Series* **257**: 87-97

Taris N. (2002), Diversité génétique et dynamique du recrutement chez l'huître plate *Ostrea edulis* L., rapport de DESS, 32 p, Université Pierre et Marie Curie Paris VI

Zouros, E., Pogson, G. H., Cook, D. I. & Dadswell, M. J. 1992 Apparent selective neutrality of mitochondrial-DNA size variation - A test in the deep-sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Evolution* **46**, 1466-1476

## Glossaire

AFLP (Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) : La technique permettant la recherche de polymorphisme de longueur de fragment de restriction au niveau de l'ADN a été introduite en 1993. Son principe repose sur l'amplification sélective de fragments de restriction générées à partir d'un échantillon d'ADN génomique. Ces fragments sont ensuite séparés en condition dénaturante sur gel de polyacrylamide.

Elle repose donc sur 4 étapes :

- La digestion : Les ADN sont digérés par deux enzymes de restriction coupant respectivement au niveau d'un site rare et d'un site fréquent.
- La ligation : des adaptateurs, spécifiques des sites de restriction utilisés, sont fixés aux extrémités des fragments de restriction obtenus.
- La pré-amplification et l'amplification sélective : les amplifications sont réalisées à l'aide d'amorces définies d'après la séquence des adaptateurs. Ces amorces portent sur leur extrémité 3'OH des extensions aléatoires de 1 à 3 bases permettant l'amplification sélective d'une partie seulement de la population des fragments de restriction. Une pré-amplification est réalisée en premier à l'aide d'amorces présentant une extension d'une base généralement (amorces +1). Le produit de cette pré-amplification servira de matrice pour l'amplification sélective à l'aide des amorces +3. Pour un seul couple d'enzymes, l'utilisation d'amorces +3 porte à 4096 ( $64 \times 64$ ) le nombre de combinaisons possibles. Les produits d'amplification sélective sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide.
- La détection des bandes d'AFLP : elle se fait par émission de fluorescence. Dans le cas d'une analyse à l'aide d'un séquenceur automatique, une des amorces d'AFLP (généralement celle correspondant au site de restriction rare) est marquée par un chromophore fluorescent (Tagu, 1999).

Cartographie génétique : une carte génétique est une représentation simplifiée du génome qui consiste à jalonner l'ensemble des chromosomes de points de repère (appelés marqueurs) et à déterminer les distances qui les séparent. Cette distance (en cM, centimorgan) est calculée à partir de la fréquence de recombinaison entre locus (marqueurs génétiques) pris deux à deux (Tagu, 1999).

Diversité nucléotidique ( $\pi$ ) : probabilité que deux gènes tirés au sein d'une population soient différents au niveau d'un nucléotide donné. C'est en quelque sorte l'hétérozygotie au niveau d'un nucléotide. On la calcule comme un nombre moyen de différence entre les séquences prises deux à deux, divisé par le nombre de nucléotides dans le gène. Cette mesure suppose des gènes alignés sans insertion ni délétion.

La diversité nucléotidique observée au sein d'un gène est la résultante de son histoire. En effet, elle résulte de la conjugaison des différences forces évolutives (la dérive génétique, la mutation, la migration et la sélection).

Loi de Hardy-Weinberg : dans une population isolée d'effectif illimité, non soumise à la sélection, et dans laquelle il n'y a pas de mutation, les fréquences alléliques restent constantes. Si les accouplements sont panmictiques, les fréquences génotypiques se déduisent directement de celles alléliques selon :  $AA = p^2$ ,  $Aa = 2pq$ , et  $aa = q^2$  si  $p$  et  $q$  sont respectivement les fréquences alléliques de  $A$  et  $a$ . Les fréquences génotypiques restent donc aussi constantes. (Henry et Gouyon, 1999)

Microsatellite : Ils sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétra nucléotidiques, par exemple  $(A)_n$ ,  $(TC)_n$ ,  $(TAT)_n$ ,  $(GATA)_n$ , la valeur de  $n$  pouvant varier de quelques unités à plusieurs dizaines. Les microsatellites sont caractérisés par un polymorphisme extrêmement élevé. Il s'agit d'un polymorphisme de nombre d'unités de répétitions. Ce

polymorphisme de longueur est révélé en gel très résolutif d'acrylamide. La technique PCR\* est utilisée pour révéler les loci microsatellites qui sont des marqueurs codominants et multialléliques (Tagu, 1999).

Paramètre mutationnel ( $\theta$ ) :  $\theta = 4 \cdot N \cdot \mu$  avec  $\mu$  le taux de mutation par génération et par site nucléotidique.

PCR (Polymerase Chain Reaction) : c'est une technique permettant d'amplifier in vitro des séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) et d'amorces nucléotidiques spécifiques.

Le principe de l'amplification repose sur trois processus :

- la dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (95°C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares
- l'hybridation d'oligonucléotides (ou amorces) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (entre 40 et 65°C C selon les amorces)
- la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable à partir des amorces hybridées sur les sites cibles (72°C)

Ce processus est réalisé de manière cyclique. Les produits de ce premier cycle sont ensuite dénaturés par la chaleur, les amorces sont à nouveau hybridées avec les brins provenant du premier cycle (chaque brin servant de matrice à la polymérase). De cette manière, à chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN est doublé (Tagu, 1999).



## Annexe 1 : Fiche d'identité (d'après Marteil, 1973)

**Nom :** huître plate Européenne  
**Ordre :** bivalve  
**Famille :** Ostreidae  
**Genre espèce :** *Ostrea edulis*  
**Auteur :** Linné 1758

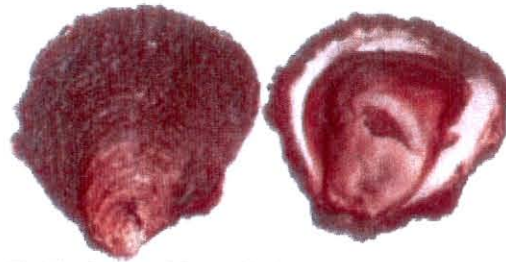


Fig 11 : *Ostrea edulis* vue de dessus et vue ouverte

**Différentes variétés :** L'huître plate Européenne (cf fig 11) comprend différentes huîtres à qualités gustatives spécifiques :

- la Cancale (iodée et charnue, au petit goût de noisette légèrement sucrée) appelée aussi Belon (dont l'énorme et très rare « pied de cheval », de 300 g en moyenne à... 1,5 kg ! pour certaines). La Belon porte le nom d'une rivière près de Riec-sur-Belon et désigne toutes les plates bretonnes de formes diverses à extrémités arrondies dont la chair blanche est nuancée de gris ou de brun. Les huîtres ne sont pas élevées, mais uniquement affinées dans l'estuaire. Cette affinage (durant plusieurs mois) lui permet d'acquérir ses caractéristiques organoleptiques. Quand elle arrive à Belon, l'huître a déjà trois ans. Elle est produite dans sa quasi-totalité en Bretagne : après le captage du naissain réalisé dans la Baie de Quiberon, l'élevage se fait soit sur des concessions en eaux profondes (baie de Cancale, de St-Brieuc, de Quiberon, et rade de Brest) de plusieurs manières, dont en immersion directe à plat sur les fonds, dans la couche d'eau en containers suspendus sous flotteurs en surface, en containers en suspension dans des supports posés à même le fond, soit sur estran (Paimpol, baie de

Morlaix, secteurs des Abers, rivière d'Étel et de St-Philibert, Golfe du Morbihan) dans des parcs découverts. Comme dans la plupart des régions productrices, la cueillette sur les bancs d'huîtres sauvages avait fini par entraîner la raréfaction des mollusques. Et, malgré les interdictions de pêche pendant la période de reproduction - de mai à octobre - l'huître avait quasiment disparu de l'estuaire.

- la Marennes d'Oléron (une délicieuse chair verte) celle que l'on appelle la "Reine des côtes de France" doit son appellation à un aliment tout à fait exceptionnel que l'on appelle la navicule et qui est issu de l'estuaire de la Seudre. Cette diatomée appelée "Navicula ostrearia" se forme d'abord sur le fond de la claire au printemps, puis étend son réseau à l'eau elle-même. On dit alors que la claire "bleuit", un phénomène naturel, impossible à reproduire.
- la « gravette » d'Arcachon (fine et iodée)
- la bouzigues (fruitée et saline) de l'étang de Thau.

Les productions des trois dernières sont devenues confidentielles voire inexistantes...

**Taille :** de 6 à 16cm de large (elle est nommée « pied de cheval » lorsqu'elle atteint une taille de 16 cm)

**Durée de vie :** plus de 30 ans ( en vieillissant, elle adopte une forme caractéristique et elle est alors nommée « pied de cheval »)

**Description :** le corps est protégé par une coquille composée de 2 valves réunies par un ligament élastique qui s'articule au moyen d'une charnière (cf fig 12). Un muscle adducteur antagoniste au ligament en assure la fermeture. La coquille représentant environ 95% de son poids est essentiellement constituée de carbonate de calcium et

d'une substance azotée, la conchyoline que l'on retrouve également au niveau du ligament. La valve concave est dite inférieure ou gauche, et, la valve plate est dite supérieure ou droite. Le corps est entouré d'un tégument ou manteau, formé par 2 lobes soudés entre eux sur une certaine distance, et bordé d'un bourrelet musculaire dont les 3 feuillets jouent un rôle important dans la sécrétion de la coquille, dans le contrôle de l'entrée et de la sortie d'eau, et enfin en tant qu'organe sensoriel. A l'abri du manteau apparaissent les branchies, qui en filtrant l'eau, retiennent l'oxygène qui est dissous et les particules en suspension. Organes de la respiration, elles collectent aussi la nourriture. Celle-ci, agglomérée par du mucus, est convoyée par des mouvements ciliaires jusqu'à la bouche, tandis que les éléments indésirables sont rejetés. Par un court œsophage les aliments parviennent à l'estomac, lequel, avec les diverticules et l'intestin, constitue le système digestif. Celui-ci apparaît sous le manteau comme une masse brunâtre lorsque l'huître est dite « maigre ». Cette masse peut être masquée par l'accumulation, dans le tissu conjonctif, de substances de réserves sous forme de glycogène, l'huître prenant alors un aspect particulier, bien connu des consommateurs, qui dans ce cas, parlent d'huître « grasse ».

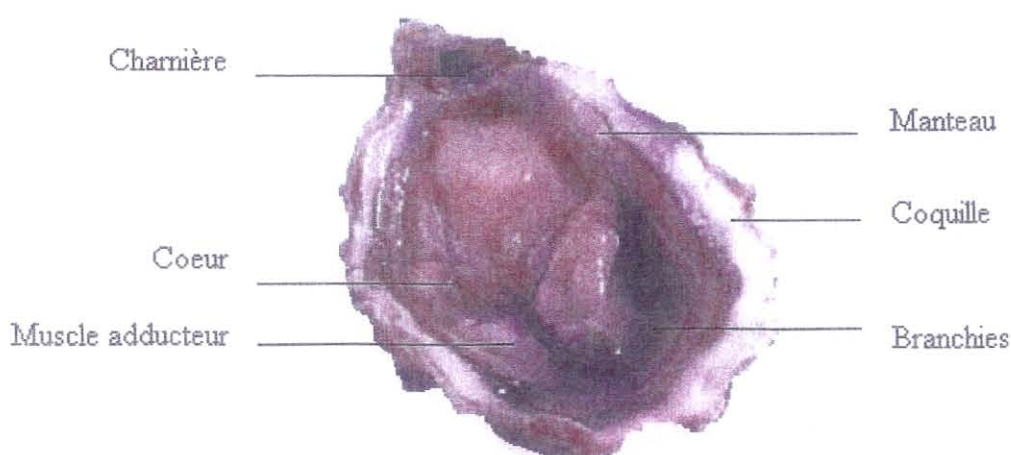


Fig 12 : détail anatomie par vue ouverte

**Alimentation :** filtre l'eau de mer pour en prélever diatomées pélagiques et parfois benthiques, spores d'algues, carapaces de copépodes, spicules d'éponges et débris divers (une huître moyenne a une capacité de filtrage de 2 à 3 litres d'eau à l'heure)

**Reproduction :** L'appareil reproducteur est très simple et ne comprend ni glande ni organe différenciés. La gonade se forme à partir des cellules germinatives (rassemblées dans le tissu conjonctif près du péricarde) qui, en se multipliant forment une masse blanchâtre enveloppant la masse viscérale. Les huîtres sont matures dès leur première année. Elles sont hermaphrodites à sexualité alternante (protandre). L'alternance se fait normalement par année, mais au cours d'une même saison, certaines huîtres peuvent être alternativement mâle puis femelle. Les huîtres plates ont également la particularité d'être incubatrices. L'huître mâle rejette donc ses spermatozoïdes dans l'eau et l'huître femelle expulse ses ovocytes dans sa cavité palléale, où les gamètes mâles apportés par l'eau viendront les féconder. Les œufs ( supérieurs à un million pour une huître de 7 à 8cm) forment une masse blanchâtre à laquelle le bivalve qui en est pourvu doit son nom d'huître « laiteuse ». Aussitôt après la fécondation, le développement progressif des larves modifie la coloration de la masse qui passe du blanc au gris clair puis au terme des 8 jours d'incubation au gris ardoise. Ces larves sont expulsées dans l'eau où elles mènent une vie pélagique pendant une durée qui varie de 8 à 14 jours selon la température ambiante. De millions de larves, bien peu survivront au terme de leur vie errante. Celles qui auront échappé à la dispersion par les courants et aux multiples prédateurs devront se fixer sur un support quelconque, au moyen d'un ciment sécrété par une glande byssogène, située à la base du pied et qui disparaîtra après la fixation. A ce stade, les larves, devenues naissains, grandiront attachés à leur support, à moins que, faisant l'objet d'élevage, elles n'en soient séparées par l'ostréiculteur.

**Biotope:** fixée sur rochers, températures optimales comprises entre 15 et 25°C

**Répartition :** Méditerranée et Atlantique (de la Mer Noire à la Mer Baltique)

**Ennemis :** les astéries, les gastéropodes (les bigorneaux perceurs), les poissons « à gueule pavé » comme la raie aigle et la dorade royale, le petit crabe enragé (*Carcinus maenas*), les champignons (*Labyrinthomixa sp.*), les haplosporidies (*Minchinia sp.*), les parasites protozoaires (*Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*) ainsi que le virus de l'herpès qui touche uniquement les larves dans les écloséries.

**Production et commercialisation :** dans le Morbihan, on dispose des tuiles chaulées en bouquets, plantées dans le sol sur lesquels se fixent les naissains d'huîtres. À Arcachon, on préfère la technique en ruches, c'est-à-dire de grandes cages surélevées au niveau du sol. Elles sont commercialisées entre 2 à 4 ans d'âge, et, pour un poids de 40 g minimum.

Principalement produite en Bretagne, l'huître plate se caractérise et se différencie de l'huître « creuse » par sa forme presque ronde, sa couleur marron clair, son habitat et son mode de reproduction (cf fig 13).



Fig 13 : *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*

## Annexe 2 : La petite histoire de l'huître plate Européenne

L'espèce est apparue au début du Pléistocène ( -6 à -5 Ma) et aurait colonisé l'Atlantique et la Méditerranéenne avant le début des glaciations du quaternaire (-1,7 Ma). Le quaternaire est marqué par une succession de variations climatiques importantes, ayant entre autre donné lieu à une série de périodes glaciaires et interglaciaires (dont la dernière – la plus importante – remonterait à -100 000 ans). Ces événements climatiques auraient pu engendrer l'extinction des stocks Atlantiques européens probablement jusqu'au détroit de Gibraltar. Les populations méditerranéennes n'auraient pas été touchées par ces événements étant donné que la Méditerranée a gardé une certaine stabilité écologique. En période post glaciaire, l'espèce aurait colonisé le littoral Atlantique à partir des populations ayant survécu, c'est à dire à partir des stocks de l'Atlantique Sud et ceux Méditerranéen. Cette histoire de peuplement pourrait expliquer la réduction du polymorphisme observée entre les populations Atlantiques et Méditerranéennes : la perte de la diversité génétique initiale serait dû à une réduction de la taille de la population (et donc à une dérive génétique) mais également à l'effet fondateur (recolonisation du milieu). (Launey, 1998)

Elles étaient déjà célèbres pour leur goût du temps des Romains qui les élevaient sur parcs déjà à l'Antiquité pour les déguster lors de leurs festins. Ils leur donnaient le qualificatif imagé de « callibléphares » c'est à dire belles paupières, en référence aux bords du manteau. L'huître sauvage abondait sur le littoral français. Elle formait des bancs entiers sur un terrain favorable à son développement c'est à dire dans des abris naturels bien protégés du flot de l'océan. Comme il lui fallait une eau ni trop salée ni trop douce, elle se fixait à l'entrée des rivières et parfois même elle les remontait avec la

marée et y restait si le niveau de l'eau le lui permettait. C'est ainsi que la Rivière de Crach (Morbihan) posséda dès le XVIII<sup>e</sup> siècle de très beaux bancs d'huîtres.

Si Louis XIV préférait l'huître verte des Charentes - artificiellement teintée par une longue station au fond d'anciens marais salants - Louis XVI demanda que l'huître plate fut désormais portée à sa table, créant par la même, l'engouement des gens de la cour puis de la noblesse qui se devait de suivre. Ce succès entraîna la surexploitation des gisements naturels, qui faillit la faire disparaître à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle. Ainsi les bancs naturels étaient continuellement dragués par les marins, et, à force de racler le fond de la rivière, ils finirent par épuiser cette ressource naturelle et de surcroît par détruire inconsciemment les larves qui n'arrivaient plus à se fixer. La raréfaction de l'huître se fit alors sentir, et son prix fut multiplié par quatre. Une réglementation essaya de limiter son exploitation aux seuls mois en « r » (c'est à dire de septembre à décembre).

En 1855, un savant du nom de Costes démontra qu'on pouvait capter les larves d'huîtres qui voguent au gré des marées et les élever dans des parcs spécialement conçus pour ces mollusques. Le captage se fit au début par des moyens élémentaires. Ainsi il plaçait des fagots lestés au fond du chenal sur lesquels les larves appelées " naissain " vinrent s'accrocher. Ce fut ce procédé et l'organisation qui s'en suivit qui firent naître " l'Ostréiculture " dont le terme n'apparaît officiellement dans le Littré qu'en 1877. Les premiers résultats ne furent pas très encourageants. En effet, le captage par fagots, planches ou pieux de bois ne permettait pas de survivre comme au temps du dragage. C'est alors qu'un trinitain, Monsieur Le Roux, créa le " Bouquet " qui relança immédiatement l'ostréiculture. Un enchevêtrement par dix ou douze tuiles rondes, liées entre elles par des fils de fer et placées à la tête d'un piquet en châtaigner, lui-même

d'une longueur d'environ un mètre cinquante, allait créer l'ostréiculture moderne. Cet ensemble était planté dans le chenal ou la rivière. L'avantage de ce système était que la préparation des tuiles pouvait être faite à terre et dans un temps très court par rapport aux fagots. Le naissain se fixait sans problème sur les tuiles. La méthode de « chauler » permettait de décoller le naissain plus facilement. Ce procédé qui consiste à plonger les bouquets dans un bain de chaux remplaçait l'écorce des fagots non réutilisable. C'est vers le 24 juin de chaque année, à la Saint Jean, que les bouquets étaient plantés sur les parcs. En 1875, plusieurs centaines de milliers de tuiles furent ainsi immergées dans la rivière d'Auray et de la Trinité.

Particulièrement fragile, l'huître plate a connu une succession d'épizooties (1920, 1970, 1980), notamment la « marteilliose » et la « bonamiose », ainsi que des périodes climatiques difficiles entraînant des chutes importantes de production. Elle est alors devenue marginale comparée à la creuse. Sa « survie » n'a tenu qu'à la persévérance d'ostréiculteurs et à la demande toujours présente des consommateurs. Elle occupe ainsi une niche dans la production française et européenne : sa production atteint 6 500 tonnes par an dans le monde (représentant environ 0.15 % de la production ostréicole), et 2 500 tonnes par an pour la France.



### Annexe 3 : Classification de la famille Ostreidea

#### OSTREIDES

Genre	caractères	espèce	noms communs	distribution géographique
<i>Ostrea</i>	absence de chambre promyale larvipares	<i>O. edulis</i> <i>O. lurida/olympia</i> <i>O. chilensis</i> <i>O. densalamellosa</i> <i>O. stentina</i> <i>O. angasi</i> <i>O. puelchana</i>	huître plate Européenne	Méditerranéen et Atlantique (de la Mer Noire à la Mer Baltique) côte pacifique du Canada et des Etats-Unis côte pacifique de l'Amérique du Sud (Chili, Pérou, Nouvelle-Zélande) côte pacifique asiatique (exURSS, Corée, Vietnam, Japon, Chine) Mediterranéen et Atlantique Sud ? ?
<i>Crassostrea</i>	chambre promyale valve inférieure creuse ovipares	<i>C. virginica</i> <i>C. gigas</i> <i>C. angulata</i> <i>C. commercialis</i> <i>C. rhizophorea</i> <i>C. gasar</i> <i>C. madrasensis</i>	huître creuse américaine huître creuse japonaise huître creuse portugaise	côte pacifique du Canada et des Etats-Unis côte pacifique asiatique (Japon, Chine) Méditerranéen et Atlantique (péninsule Ibérique) Australie Mer des Caraïbes Afrique occidentale Inde et Indochine
<i>Pycnodonta</i>	ovipares gonades de couleur orange le rectum traverse le cœur les dépôts crayeux sont vacuolaires	<i>P. cochlear</i>		Méditerranéen et Atlantique (du Sénégal aux Iles Britanniques)
<i>Gryphaea</i>			huîtres fossiles	