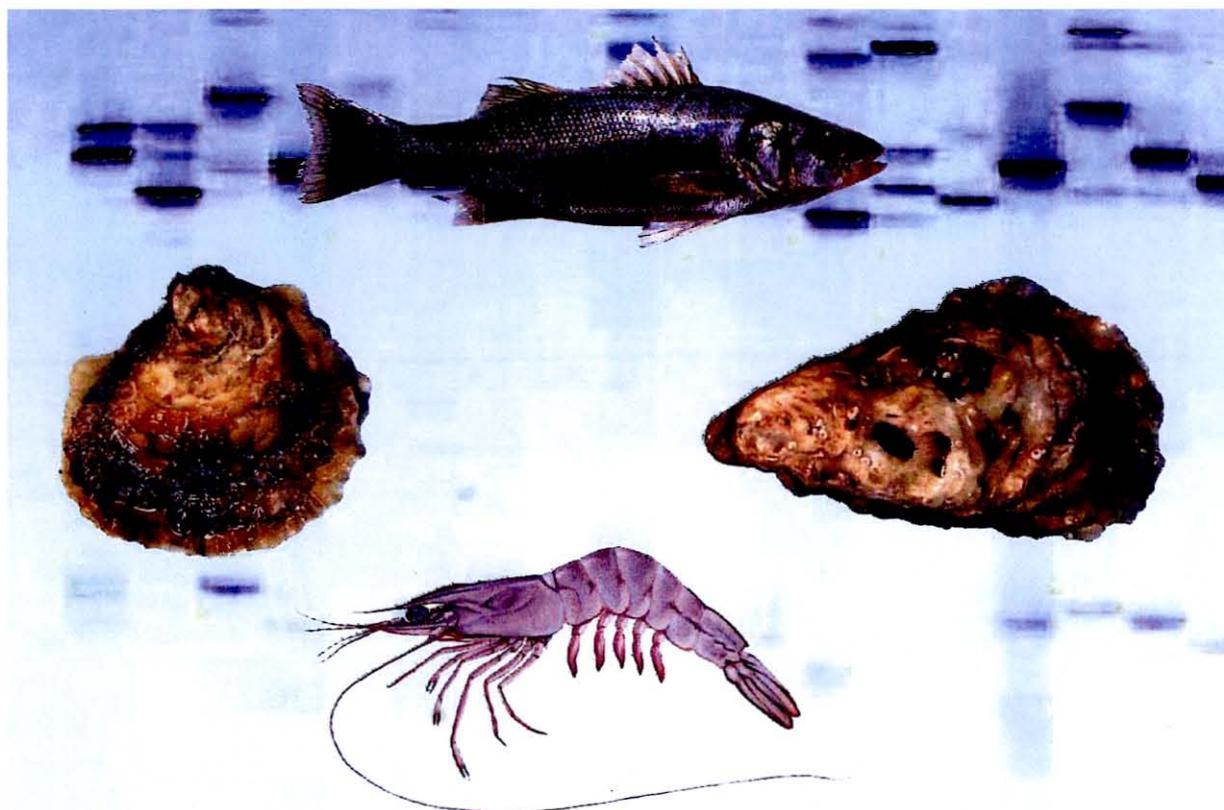


UNITE DE RECHERCHE MARINE - N°16

**DEVELOPPEMENT ET UTILISATION DES MARQUEURS
GENETIQUES HYPERVARIABLES CHEZ LES ESPECES MARINES.**

RAPPORT DE SYNTHESE

1995-1998



**Laboratoire Génétique et Pathologie
Station Ifremer
BP 133
17390 La Tremblade
Tel. : 05 46 36 98 36
Fax. : 05 46 36 37 51**

**Laboratoire Génome, Populations,
Interactions
Université de Montpellier II
34095 Montpellier cedex 5
Tel : 04 67 14 38 87
Fax : 04 67 14 45 54**

UNITE DE RECHERCHE MARINE - N°16

**DEVELOPPEMENT ET UTILISATION DES MARQUEURS
GENETIQUES HYPERVARIABLES CHEZ LES ESPECES
MARINES.**

RAPPORT DE SYNTHESE

1995-1998

**Responsable
Université/CNRS**

François BONHOMME
Laboratoire Génome, Populations, Interactions
(UMR 0000 ex-UPR-CNRS 9060)
Université de Montpellier II
Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral,
1 quai de la daurade
34200 Sète

Tél. : 04 67 46 33 90
Fax. : 04 67 14 45 54
e-mail : Bonhomme@crit.univ-montp2.fr

Responsable IFREMER

André GERARD
Station IFREMER de La Tremblade
Laboratoire Génétique et Pathologie
BP 133 - 17390 La Tremblade

Tél. : 05 46 36 98 36
Fax. : 05 46 36 37 51
e-mail : agerard@ifremer.fr

Date de création : 1er janvier 1995

Date d'évaluation : 1er janvier 1999

SOMMAIRE

1. LA CRÉATION DE L'URM-16.....	4
2. PROGRAMME SCIENTIFIQUE DE L'URM-16.....	5
3. LES MOYENS DE L'URM-16.....	7
3.1. MOYENS LOGISTIQUES.....	7
3.2. MOYENS HUMAINS.....	7
3.2.1. <i>Personnel permanent</i>	7
3.2.2. <i>Personnel non permanent</i>	7
3.3. MOYENS FINANCIERS.....	9
4. BILAN MORAL DE L'URM 16.....	10
4.1. BILAN MORAL.....	10
4.1.1. <i>Echanges de personnels statutaires (thésards et post-doctorants y compris)</i>	11
4.1.2. <i>Echanges ou accueils d'étudiants</i>	12
4.1.3. <i>Diplômes soutenus ou en cours dans le cadre de l'URM</i>	13
4.1.3.1. Soutenus.....	13
4.1.3.2. En cours.....	13
4.1.4. <i>Devenir des étudiants</i>	14
4.1.5. <i>Autres activités de formation</i>	15
4.1.6. <i>Rayonnement international</i>	15
4.1.7. <i>Réunions</i>	15
4.1.8. <i>Conclusion</i>	15
4.2. AUTRES COLLABORATIONS.....	16
5. BILAN SCIENTIFIQUE.....	18
5.1. MOLLUSQUES : LES HUÎTRES.....	18
5.1.1. <i>Recherche de marqueurs génétiques</i>	18
5.1.1.1. <i>Ostrea edulis</i>	18
5.1.1.2. <i>Crassostrea gigas</i>	19
5.1.2. <i>Sélection assistée par marqueurs</i>	19
5.1.2.1. <i>Cartographie du génome et recherche de QTL</i>	19
5.1.2.2. <i>Sélection assistée par marqueurs</i>	20
5.1.3. <i>Caractérisation des ressources génétiques, identification génétique des stocks et populations naturelles</i>	20
5.1.4. <i>Déterminisme génétique du recrutement et génétique en phase larvaire</i>	21
5.2. AUTRES MOLLUSQUES.....	22
5.2.1. <i>Moules</i>	22
5.2.1.1. <i>Recherche de marqueurs génétiques</i>	22
5.2.1.2. <i>Caractérisation des ressources génétiques, identification génétique des stocks et populations naturelles</i>	22
5.2.2. <i>Nacres</i>	22
5.3. POISSONS.....	23
5.3.1. <i>Recherche de marqueurs génétiques</i>	23
5.3.2. <i>Aide à la sélection chez D. labrax</i>	23
5.3.3. <i>Caractérisation des ressources génétiques, identification génétique des stocks et populations naturelles</i>	24
5.3.3.1. <i>Chez le loup D. labrax</i>	24
5.3.3.2. <i>Dans le genre Beryx</i>	25
5.4. CREVETTES PÉNÉIDES.....	25
5.4.1. <i>Recherche de marqueurs génétiques</i>	25
5.4.1.1. <i>Penaeus monodon</i>	25
5.4.1.2. <i>Penaeus stylirostris</i>	25
5.4.1.3. <i>Marqueurs introniques</i>	26
5.4.2. <i>Caractérisation des ressources génétiques</i>	26
5.4.3. <i>Aide à la sélection, diversité génétique au sein des stocks de géniteurs en captivité</i> ... 26	26
5.4.3.1. <i>Penaeus monodon</i>	26
5.4.3.2. <i>Penaeus stylirostris</i>	26

6. PUBLICATIONS, COLLOQUES ET RAPPORTS.....	27
6.1. PUBLICATIONS PARUES.....	27
6.2. PUBLICATIONS SOUS PRESSE.....	28
6.3. PUBLICATIONS SOUMISES.....	29
6.4. PRÉSENTATIONS À DES COLLOQUES ET POSTERS.....	29
6.5. RAPPORTS.....	31
6.6. THÈSES ET MÉMOIRES D'ÉTUDIANTS.....	32
6.7. RAPPORTS DE CONTRATS DE LA COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE.....	33
6.8. DIVERS.....	34
7. PERSPECTIVES.....	34
7.1. AU PLAN MÉTHODOLOGIQUE.....	34
7.2. PROBLÉMATIQUES SCIENTIFIQUES: SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DU POLYMORPHISME CHEZ LES ESPÈCES À FORTE FÉCONDITÉ.....	35
7.2.1. <i>Relation hétérozygotie/performances et consanguinité.</i>	35
7.2.2. <i>Recherche de gènes candidats liés à des fonctions d'intérêt adaptatif ou économique.</i>	35
7.2.3. <i>Populations naturelles</i>	36
7.3. ESPÈCES CIBLES.....	36
8. CONCLUSION.....	36
9. ANNEXE 1 : RAPPORT D'ACTIVITÉ DE L'ANNÉE 1995.....	38
10. ANNEXE 2 : RAPPORT D'ACTIVITÉ DE L'ANNÉE 1996.....	65
11. ANNEXE 3 : RAPPORT D'ACTIVITÉ DE L'ANNÉE 1997.....	108
12. ANNEXE 4 : RAPPORT D'ACTIVITÉ DE L'ANNÉE 1998.....	118
13. ANNEXE 5 : COMPTE RENDU DE LA REUNION "GENETIQUE DES POPULATIONS" DU 18 NOVEMBRE 1998.....	139

PRESENTATION DES TRAVAUX DE L'URM 16

1. LA CREATION DE L'URM-16

L'Unité de Recherche Marine n°16 "*Développement et utilisation des marqueurs génétiques* hypervariables chez les espèces marines" (GENEMAR) a été créée en 1995 après une période de collaboration soutenue entre le Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) de La Tremblade et le laboratoire Génome, Populations, Interactions (GPI) de l'Université de Montpellier II :

- organisation d'un séminaire franco-américain sur la génétique des huîtres. Ce séminaire s'est déroulé en juillet 1994 sur les deux sites de Sète et de La Tremblade, il a été financé par la NSF, le CNRS et l'Ifremer.
- identification des premiers marqueurs de type microsatellite sur l'huître plate *Ostrea edulis* dans le cadre de l'appel d'offres Ifremer-Biotechnologies (1993-1995). Au cours de ce projet, un des cadres du laboratoire Ifremer-LGP de La Tremblade a suivi une formation de 4 mois au laboratoire Génome et Populations de Montpellier.
- encadrement conjoint d'un stagiaire DEA.

Parallèlement, le laboratoire Génome et Populations poursuivait d'autres programmes de mise au point de marqueurs microsatellites en collaboration avec l'Ifremer :

- dans le cadre d'un projet CEE-FAR sur le loup *Dicentrarchus labrax* avec Ifremer-Palavas,
- dans le cadre de l'appel d'offres Ifremer-Biotechnologies sur les crevettes tropicales *Penaeus monodon* et *P. stylirostris* avec le COP de Tahiti.

A la fin de l'année 1994, les deux responsables scientifiques des laboratoires Ifremer-LGP et GPI-Sète ont soumis à la Direction Scientifique de l'Ifremer un projet de création d'une Unité de Recherche Marine afin de formaliser les relations existantes et poursuivre une collaboration active en génétique moléculaire en fournissant un environnement administratif simplifié pour les échanges de stagiaires et de personnel statutaire.

La création de l'URM-16 a officiellement été signée le 23 mars 1995 par les représentants de l'Ifremer, du CNRS de la Délégation Régionale de Languedoc-Roussillon et de l'Université de Montpellier II. Le contrat a été conclu pour une durée de 4 ans à compter du 1er janvier 1995.

2. PROGRAMME SCIENTIFIQUE DE L'URM-16

L'annexe scientifique jointe au contrat de l'URM-16 en 1995 était la suivante :

PREAMBULE

L'objectif scientifique de l'Unité de Recherche Marine n°16 est de partager les savoir-faire conceptuels et méthodologiques des deux équipes, pour faire aboutir des programmes appliqués ou fondamentaux dans le domaine de la génétique des organismes marins.

Ces programmes concernent plus particulièrement le développement et l'utilisation des marqueurs génétiques fournis par les techniques de biologie moléculaire dans les programmes suivants :

I-CHEZ LES HUITRES DES GENRES *OSTREA* ET *CRASSOSTREA*

Le modèle prioritaire de l'URM sera les huîtres *Crassostrea* et *Ostrea*. Pour des raisons historiques, les recherches sur *Ostrea* sont plus avancées et donneront des résultats plus rapidement.

1-Sélection assistée par marqueurs chez *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*

- 1.1. Recherche de marqueurs liés à la résistance à la bonamiose chez *Ostrea edulis*.
- 1.2. Recherche de locus à caractère quantitatif (QTL) sur les principaux caractères physiologiques chez *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*.
- 1.3. A terme contribution à l'obtention de cartes génétiques chez *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*.

2-Characterisation et gestion des ressources génétiques naturelles :

- 2.1. Etablissement et contrôle génétique d'un conservatoire de souches dans le genre *Crassostrea* dans le but du maintien et de l'utilisation de la biodiversité.
- 2.2. Identification génétique et contrôle des stocks chez *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*.

3-Déterminisme génétique du recrutement :

- 3.1. Relation hétérozygotie-croissance.
- 3.2. Génétique en phase larvaire : analyse des paramètres génétiques impliqués dans la croissance et la survie à ce stade.

II-AUTRES ESPECES

Des collaborations sont envisagées avec des laboratoires d'IFREMER impliqués dans des programmes similaires. Cela pourra se faire par des moyens annexes comme l'accueil de stagiaires ou de doctorants. La présente structure pourrait également servir de centre d'accueil pour d'autres équipes françaises (Université ou autres organismes) désireuses de développer des recherches dans ce domaine. Des propositions seront faites aux différentes instances concernées (CNRS, ORSTOM, Universités) pour la mise sur pied éventuelle d'un centre de formation en génétique des espèces marines.

L'URM 16 aura ainsi vocation à aborder chez les poissons des problèmes analogues à ceux cités précédemment, par exemple chez le loup *Dicentrarchus labrax*. Une collaboration entre le GPI et l'Ifremer-Palavas est déjà en cours sur cette espèce : elle a donné lieu à l'identification de marqueurs microsatellites (8). Ces marqueurs ont été

développés pour deux raisons principales qui correspondent aux objectifs affichés par l'URM :

- 1-Utilisation dans des tests de paternité, génotypage des géniteurs.
- 2-Evaluation de la biodiversité dans l'espèce *D. labrax* et identification génétique des stocks de ce poisson dans le Bassin Méditerranéen.
- 3- Aide à la sélection.

L'URM 16 aura également vocation à travailler sur d'autres espèces cultivées comme les crevettes du genre *Penaeus*. Une collaboration entre le GPI et le Ifremer-Tahiti est en effet en cours sur l'identification de marqueurs microsatellites, initiée dans le cadre de l'appel d'offres Biotechnologie 93 de l'Ifremer. Les premiers microsatellites ont, là aussi, été identifiés. Cette démarche a été amorcée dans un but de :

- 1-Génotypage des géniteurs,
- 2-Outil de simplification des procédures d'expérimentation (possibilité de mélange de différents lots avec assurance de pouvoir les départager par la suite),
- 3-Evaluation du polymorphisme des populations d'élevage,
- 4-Aide à la sélection.

III- CALENDRIER INITIAL

1-Poursuite de l'effort de mise au point de marqueurs moléculaires : Années N, N+1.

- *microsatellites chez *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*.
- *marqueurs anonymes simple copie sur *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas*.
- *marqueurs de l'ADN mitochondrial sur le genre *Crassostrea*.

2-Sélection assistée par marqueurs :

- *Suivi de la variabilité génétique des populations en voie de sélection chez *Ostrea edulis* : Année N.
- *Production des familles en ségrégation nécessaires à la mise en évidence de QTL chez *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas* : Années N et N+1.
- *Mise en évidence de QTLs et des premiers groupes de liaison sur les cartes génétiques : Années N+2 et N+3.

3-Délimitation génétique et utilisation des populations naturelles :

- *Structuration géographique des populations d'huîtres plates *Ostrea edulis* le long de l'Atlantique et de la Méditerranée : Années N et N+1.
- *Identification génétique des stocks de *Crassostrea* : Années N+1 et N+2.
- *Etablissement et contrôle d'un conservatoire de souches chez *Crassostrea* : Année N à N+3.

4-Déterminisme génétique du recrutement :

- *Comparaison chez *Ostrea edulis* des rôles respectifs du polymorphisme biochimique et microsatellitaire dans le déterminisme de la relation hétérozygotie croissance : Années N et N+1.
- *Suivi de la structure génétique d'une cohorte de la phase larvaire jusqu'au post-recrutement chez *Ostrea edulis* et *Crassostrea gigas* : problème de l'origine des déficits en hétérozygotes : Année N+2 et N+3.

5-Autres espèces :

- *Suite contrats en cours sur *Penaeus* et *Dicentrarchus labrax* : Année N
- *Années N+1, N+2 et N+3 : à discuter avec les équipes concernées.
- *Prise de contact déjà effectuée pour *Mytilus edulis* et *Pinctada margaritifera*

3. LES MOYENS DE L'URM-16.

3.1. Moyens logistiques

Le contrat prévoyait que les deux laboratoires mettaient en commun leurs moyens respectifs :

- Au niveau du laboratoire Ifremer-LGP de La Tremblade, principalement l'écloserie expérimentale et un laboratoire de biologie moléculaire (à créer au moment de la signature) pour l'utilisation en routine des marqueurs génétiques,
- Au niveau du GPI de Montpellier-Sète, principalement un laboratoire de biologie moléculaire situé à Sète pour la mise au point et l'utilisation des marqueurs. La station de Sète disposant de chambres d'hôtes pour l'accueil des stagiaires

3.2. Moyens humains

3.2.1. Personnel permanent

GPI Montpellier	Chercheur	François BONHOMME (CNRS) Philippe BORSA (ORSTOM)
	Ingénieur	Jean-Jacques VERSINI (Université) Eric DESMARAIS (CNRS)(1/4 temps)
Ifremer-LGP La Tremblade	Chercheur	André GERARD Pierre BOUDRY Yamama NACIRI-GRAVEN (jusqu'en oct 1996) Sylvie DUMOLIN-LAPEGUE (depuis fev. 1998) Claude DELSERT (détaché en permanence dans le cadre de l'URM à la station de Sète jusqu'en janvier 1998)
	Technicien	Serge HEURTEBISE Christophe LEDU Pascal PHELIPOT Frédéric BLOUIN
Ifremer-Palavas	Chercheur	Béatrice CHATAIN
Ifremer-Tahiti	Chercheur	Edouard BEDIER Denis SAULNIER
	Technicien	Vincent VONAU

3.2.2. Personnel non permanent

		Période	Lieu d'affectation
Chercheur	Dennis HEDGECK Chercheur du Bodega Marine Laboratory (USA, Californie)	oct 96-sept 97	Année sabbatique au GPI-Sète Année sabbatique

	Filip VOLCKAERT chercheur du FNRS Belge	oct 98- juin 99	au GPI-Sète
CDD et VAT	Yves VIGOUROUX (VAT) Nicolas BIERNE (VAT) Ivan BEUZART (VAT) Anne DOYE (CDD) Marc BARRE (CDD) Florence CORNETTE (CDD)	1995 - 1996 1996 - 1998 1998-1999 7 mois en 1996 oct 96-sept 97 4 mois en 1998	Ifremer-Tahiti Ifremer-Tahiti Ifremer-Tahiti GPI-Sète LGP-La Tremblade GPI-Sète
Post-doc	Marc OHRESSER Stefano PERUZZI (CDD)	avril 95-nov 97 fév 94-fév 96	GPI-Sète Ifremer-Palavas
Thèses	Lounès CHIKHI Sophie LAUNEY Bertrand COLLET Lilia BAHRI (pro parte) Mariam NACIRI (pro parte) Eric SAILLANT Sophie ARNAUD Arnaud HUVET Sophie HUBERT (pro parte) Christophe LEMAIRE Claire DAGUIN Nicolas BIERNE	1992 - 1996 1994 - 1997 1995 - 1998 3 mois en 1996 6 mois en 1996 1996 - 1999 1996 - 1999 1997 - 2000 5 mois en 1998 1997 - 2000 1997 - 2000 1998 - 2001	GPI-Sète LGP-La Tremblade LGP-La Tremblade GPI-Sète GPI-Sète Ifremer-Palavas GPI-Sète LGP-La Tremblade LGP-La Tremblade GPI-Sète GPI-Sète GPI-Sète
Polytechnique	Frédéric LE CLERC	4 mois en 1995	LGP-La Tremblade
DEA	Sophie ARNAUD Nicolas BIERNE Arnaud HUVET Christophe LEMAIRE Claire DAGUIN Véronique HERVOUET	8 mois en 1996 8 mois en 1996 8 mois en 1997 8 mois en 1997 8 mois en 1997 8 mois en 1998	GPI-Sète GPI-Sète LGP-La Tremblade GPI-Sète GPI-Sète LGP-La Tremblade
Erasmus/ Socrates	Miguel LACERDA Lucia OSTELLARI Vicky LEENTJES Sofia Ramos CAETANO	6 mois en 1995 7 mois en 1995 3 mois en 98 5 mois en 98	GPI-Sète GPI-Sète GPI-Sète GPI-Sète
Maîtrise	Miguel LACERDA Lucia OSTELLARI Sophie ARNAUD Mickaël MOREAU Christophe LEMAIRE Céline VIRAY Galice HOARAU Hélène DELANDES Delphine BRUN Cécile DUFOURG	6 mois en 1995 7 mois en 1995 2 mois en 1995 2 mois en 1995 3 mois en 1996 2 mois en 1996 2 mois en 1998 4 mois en 1997 2 mois en 1997 4 mois en 1998	GPI-Sète GPI-Sète GPI-Sète LGP-La Tremblade GPI-Sète GPI-Sète GPI-Sète LGP-La Tremblade GPI-Sète LGP-La Tremblade
Licence	Céline POUX	2 mois en 1998	GPI-Sète

3.3. Moyens financiers

Si l'on doit se satisfaire de la souplesse qu'offrent les statuts de l'URM pour les échanges de personnel entre les laboratoires, on ne peut en dire autant de la lourdeur des procédures pour la mise en place du soutien financier apporté par la Direction Scientifique de l'Ifremer à l'URM et pour la justification de celui-ci:

- la mise en place des crédits se fait selon un contrat de type Universitaire qui doit être renégocié tous les ans bien que l'URM soit prévue pour une durée de 4 ans,
- ceci entraîne au niveau de l'Université l'ouverture d'un nouveau compte chaque année, l'impossibilité d'effectuer des reports d'une année à l'autre, etc,
- l'argent est versé en 3 fois, ce qui engendre beaucoup de documents administratifs, ainsi que la rédaction d'un rapport intermédiaire qui n'a aucune justification du point de vue scientifique,
- l'ouverture des crédits se fait généralement à la fin du deuxième trimestre, ce qui nous amène à négocier un contrat avec l'Université pendant la période des vacances estivales (perte du contrat par les services de l'Université en 1996),
- bien qu'il soit alloué à l'URM, l'argent n'est versé à l'Université par les services financiers de l'Ifremer qu'après une demande écrite supplémentaire,
- ces divers points, associés à la disponibilité tardive des sommes allouées, ont eu pour conséquence en 1996 de retarder les deux premiers versements à la fin décembre,
- enfin il faut une nouvelle fois évoquer le problème récurrent du nombre de rapports nécessaires pour justifier les sommes allouées à l'URM et son bon déroulement scientifique. Le système mis en place nécessite en théorie **14 rapports différents** pour une période de 4 ans. Il a été dénoncé dès 1996 après que la "Commission du service fait" de Nantes ait refusé nos rapports 1995 et 1996 (Annexes 1 et 2) et il n'a toujours pas été modifié malgré nos nombreuses réclamations. L'ambiguïté réside en partie dans le fait que pour un contrat de type Universitaire, il ne faut pas qu'apparaissent des travaux effectués par les équipes de l'Ifremer, alors que pour la Direction scientifique et la Commission CB2, il faut au contraire montrer la symbiose des travaux des deux équipes. Les 14 rapports se dénombrent de la manière suivante : par an, il faut 1 rapport intermédiaire, 1 rapport final pour la Commission du service fait et 1 rapport pour la Direction Scientifique, auxquels il faut ajouter le rapport de synthèse à 2 ans et le rapport final. Les rapports annuels 1997 et 1998 (annexes 3 et 4) sont donc nettement moins complets car ils ont été produits uniquement pour la Commission du service fait.

Tout ceci conduit à une gestion et à une comptabilité malsaines, puisque le travail correspondant doit être fait avec d'autres sources d'argent dont dispose le GPI-Sète, l'argent de l'URM étant éventuellement utilisé de manière décalée.

Toutefois, comme le souligne le tableau de financement ci-après, les coûts occasionnés par les recherches menées dans le cadre de l'URM dépassent largement l'aide octroyée par la Direction Scientifique de l'Ifremer.

Financement de l'URM

Soutiens directs à l'URM en KF	1995		1996		1997		1998	
	Invest.	Fonct.	Invest.	Fonct.	Invest.	Fonct.	Invest.	Fonct.
DS-Ifremer	42	58	39	161	20	130	20	130
LGP-Ifremer	65	56	100	150	90	200	50	239
GPI-Sète	50	25	25	35	20	40	10	50
Soutiens indirects	1995		1996		1997		1998	
Ifremer-Biotechnologie	100							
Région Poitou-Charentes	100		100		100		100	
Conseil Général Charente-maritime							100	
Industrie (fermes de loups)			22					
DIVERSITAS			20		20		30	
Agriculture Demain			30					
GENEPHYS Partie marqueurs moléculaires			90		90		90	
Région Languedoc- Roussillon							100	
(ORSTOM) IRD (Pelfish et Beryx)					30		20	

4. BILAN MORAL DE L'URM 16.

4.1. Bilan moral

L'Unité de Recherche Marine n°16 a pour vocation principale le développement de la génétique moléculaire des mollusques bivalves (principalement sur les huîtres des genres *Ostrea* et *Crassostrea*) en relation avec les programmes de gestion et d'amélioration génétiques menés par le laboratoire Ifremer de La Tremblade et les intérêts en génétique théorique de l'ex-UPR 9060 (future UMR, ex. URA 1493) de Montpellier-Sète (origine et fonction de la variabilité génétique dans les populations naturelles). L'URM a aussi une vocation de soutien à d'autres programmes de génétique sur des espèces aquacoles (Crevettes Pénéides, Loup...) ou halieutique (Sardinelles, Béryx).

Pour développer de telles recherches, des échanges fréquents entre le personnel des deux laboratoires étaient indispensables mais totalement irréalisables pour les agents Ifremer si l'on appliquait les coûts forfaitaires de missions. La structure de l'URM a été choisie car elle offre un environnement administratif simplifié pour ces échanges.

4.1.1. Echanges de personnels statutaires (thésards et post-doctorants y compris)

Dès sa création, la structure simplifiée de l'URM a parfaitement rempli son rôle quant aux échanges de personnels permanents ou temporaires entre nos deux laboratoires. Ces échanges ont été nombreux vers le laboratoire de Sète durant les deux premières années durant lesquelles la formation du personnel de La Tremblade aux techniques de biologie moléculaire et la recherche de marqueurs génétiques ont été privilégiées.

- Il est bon en premier lieu, de rappeler le séjour de 4 mois effectué en 1994 avant la création de l'URM par Yamama NACIRI-GRAVEN dans le cadre de l'appel d'offres Ifremer-Biotechnologies. Ce séjour est en partie à l'origine de la création de l'URM,
- Il faut également souligner l'accueil permanent au laboratoire de Sète de Claude DELSERT (dépendant du Ifremer-LGP La Tremblade) entre 1995 et janvier 1998. Ses compétences en biologie moléculaire ont été précieuses pour le démarrage de l'URM,
- Marc OHRESSER, post-doc d'avril 1995 à mai 1997 à Sète au sein d'un projet de l'Union Européenne coordonné par Claude Delsert a travaillé à la caractérisation d'un intron de moule,
- Séjour de 3 mois en 1995 pour le clonage de microsatellites d'*Ostrea edulis* de Sophie LAUNEY en thèse à La Tremblade (dont le parrainage a été assuré par François BONHOMME),
- Séjour de 2 semaines en 1995 de Pierre BOUDRY pour le développement des marqueurs mitochondriaux chez les *Crassostrea*,
- Séjour d'1 mois en 1995 de Vincent VONAU (Ifremer-Tahiti) sur le développement des marqueurs microsatellites chez les crevettes Pénéides,
- Accueil en 1996 d'une technicienne Anne DOYE (CDD 6 mois) puis d'un post-doc Marc OHRESSER (6 mois) financés sur les crédits du programme de l'Union Européenne "GENEPHYS" coordonné par La Tremblade pour la mise au point de marqueurs microsatellites de l'huître creuse,
- Séjour de 3 mois (octobre à décembre 1996) de Vincent VONAU (IFREMER-Tahiti) au GPI-Sète sur le séquençage de marqueurs microsatellites chez *Penaeus stylirostris*.

4.1.2. Echanges ou accueils d'étudiants

A Sète

- Divers séjours fin 1995 et en 1996 de Stéphano PERUZZI (CDD Ifremer-Palavas) et de Christophe LEMAIRE en stage de maîtrise à Ifremer-Palavas dans le cadre du typage microsatellite de descendances gynogénétiques de géniteurs de loup présents dans les fermes françaises,
- Accueil en 1996 de Sophie ARNAUD en DEA dont le sujet demandé par l'ORSTOM, consistait à effectuer un suivi des stocks halieutiques de 3 poissons pélagiques en mer de Java,
- Accueil de 2 étudiantes Lilia BAHRI (de Tunisie) et Mariam NACIRI (du Maroc) qui ont travaillé à la caractérisation de populations naturelles de loup par marqueurs microsatellites,
- Arnaud TANGUY, de l'Université de Brest, a effectué un stage de 3 mois en 1998 dans le cadre de sa thèse (direction D. MORAGA) sur PGM et métallothionéines chez *Crassostrea gigas*.

A l'Ifremer

- Il est bon de rappeler les divers séjours d'Yves VIGOUROUX (DEA "Evolution et Ecologie") en 1994 dans le cadre de l'appel d'offres Ifremer-Biotechnologies et son travail sur la relation hétérozygotie-croissance chez l'huître plate *Ostrea edulis* en utilisant les marqueurs protéiques et microsatellites,
- Le laboratoire de Ifremer-Palavas a accueilli Fransisco GARCIA DE LEON pour la réalisation d'expériences dans le cadre de sa thèse de doctorat sur l'intérêt des marqueurs hypervariables dans les programmes d'amélioration génétique et dans l'étude des populations naturelles chez le loup *Dicentrarchus labrax*,
- Nicolas BIERNE qui a étudié la génétique de la phase larvaire de l'huître plate dans le cadre de son DEA et qui travaille actuellement sur la dynamique de la zone hybride de *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* pour sa thèse, a réalisé plusieurs séjours à La Tremblade en 1996 et 1998,
- En outre, le laboratoire Ifremer-LGP de La Tremblade qui s'est progressivement équipé en matériel de biologie moléculaire, a pu également apporter une aide précieuse au programme loup de Palavas en accueillant pendant 3 mois Christophe LEMAIRE en stage de maîtrise à Ifremer-Palavas dans le cadre du typage microsatellites des géniteurs de loup présents dans les fermes françaises,
- Véronique HERVOUET dont le DEA sur l'analyse des contributions parentales dans un croisement de *Crassostrea gigas* était encadré conjointement par Pierre BOUDRY et François BONHOMME, a réalisé son stage de 7 mois à La Tremblade en 1998.

4.1.3. Diplômes soutenus ou en cours dans le cadre de l'URM

4.1.3.1.Soutenus

2 thèses

- 1998 Sophie Launey 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.
- 1998 Bertrand Collet Bases génétiques des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

6 DEA

- 1996 Sophie Arnaud Le chinchard *Decapterus macrosoma*, poisson pélagique de mer de Java, un exemple d'espèce marine génétiquement structurée.
- 1996 Nicolas Bierne La génétique de la phase larvaire peut-elle expliquer les déficits en hétérozygotes chez les bivalves marins ? : Etude de la ségrégation de locus microsatellites chez *Ostrea edulis*.
- 1997 Arnaud Huvet Différentiation génétique de deux huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* : Apport des marqueurs microsatellites.
- 1997 Christophe Lemaire Analyse de la variabilité génétique des stocks domestiques de loup (*Dicentrarchus labrax*), comparaison avec les populations naturelles.
- 1997 Claire Daguin Polymorphisme d'intron, évolution moléculaire et biogéographie chez les moules du complexe d'espèces *Mytilus edulis*.
- 1998 Véronique Hervouet Utilisation d'un marqueur microsatellite pour l'étude des contributions parentales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

4.1.3.2.En cours

8 thèses

- 1997-2000 Mariam Naciri Différenciation génétique chez *D. labrax* le long des côtes marocaines.
(*pro parte*)
- 1996- Lilia Bahri Structuration génétique chez *D. labrax* de part et

1999	(<i>pro parte</i>)	d'autre du détroit siculo-tunisien.
1996-1999	Sophie Arnaud	Structure et variabilité génétiques comparées des nacres perlières des côtes Pacifique américaines et polynésiennes.
1996-1999	Eric Saillant	Etude de l'influence de facteurs environnementaux sur la détermination du sexe chez le loup (<i>Dicentrarchus labrax</i> , poisson Téléostéen Serranidae) et caractérisation du dimorphisme de croissance en faveur des femelles en conditions d'élevage intensif.
1996-1999	Sophie Hubert (<i>pro parte</i>)	Genetics and growth of the Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i>
1997-2000	Arnaud Huvet	Dispersion larvaire et sélection dans la zone d'hybridation des moules côtières <i>M. edulis</i> et <i>M. galloprovincialis</i> .
1997-2000	Christophe Lemaire	Étude du déterminisme génétique de la résistance au stress environnemental chez le loup (<i>Dicentrarchus labrax</i>).
1997-2000	Claire Daguin	Phylogéographie moléculaire chez les moules du complexe d'espèces <i>Mytilus edulis</i> .
1998-2001	Nicolas Bierne	Dispersion larvaire et sélection dans la zone d'hybridation des moules côtières <i>M. edulis</i> et <i>M. galloprovincialis</i> : comment expliquer le maintien de différenciations génétiques fortes en milieu marin ?

4.1.4. Devenir des étudiants

Il faut souligner également le rôle joué par l'URM dans la formation aux techniques de la biologie moderne d'étudiants en Maîtrise, DEA ou Thèse. Certains d'entre eux ont poursuivi leur activité dans le cadre :

- du programme crevette au COP de Tahiti comme Volontaire à l'Aide Technique (VAT) en assurant le transfert des marqueurs développés par l'URM sur les crevettes Pénéides (c'est le cas de Yves VIGOUROUX, Ivan BEUZART et de Nicolas BIERNE);
- de séjours post-doctorals, Sophie LAUNEY a effectué en 1998 et début 1999, un séjour post-doctoral aux Etats Unis dans le laboratoire de Dennis HEDGECOCK (Bodega Marine Laboratory, Californie). Bertrand COLLET fait actuellement un post-doctorat en Ecosse à Aberdeen,
- d'un recrutement à l'INRA de Jouy en Josas : Sophie LAUNEY pendant son séjour aux USA a brillamment été reçue au concours d'entrée de l'INRA.

4.1.5. Autres activités de formation

La présentation des programmes d'amélioration génétique des espèces marines par Yamama NACIRI-GRAVEN a fait l'objet de deux séminaires en 1995 et 1996 donnés aux étudiants d'un module du DEA d'écologie de Montpellier.

Le laboratoire de La Tremblade a organisé un stage de formation en Biologie Moléculaire d'une semaine en décembre 1998 pour le personnel de l'Ifremer. Eric DESMARAIS du GPI-Sète a participé à ce stage comme intervenant extérieur.

4.1.6. Rayonnement international

- Accueil de Dennis HEDGECOCK Chercheur du Bodega Marine Laboratory (USA, Californie) en année sabbatique au GPI-Sète pendant un an en 1996-97.
- Accueil de Filip VOLCKAERT, chercheur du FNRS à la KU Leuven (Belgique) en année sabbatique au GPI-Sète pendant 9 mois en 98-99.
- Séjour d'1 mois (mai-juin 1998) de Nicolas BIERNE au CSIRO (Cleveland, Australie) dans le laboratoire de Steve MOORE pour la recherche de marqueurs introniques chez les crevettes.
- Séjour de 2 mois en 1998 de Arnaud HUVET au CSIRO (Hobart, Australie) dans le laboratoire de Bob Ward pour l'étude de la diversité génétique des populations de *Crassostrea gigas* présentes en Australie.

4.1.7. Réunions

En plus de ces échanges de personnel et de ces actions de formation, plusieurs réunions plénières ont été organisées entre les deux laboratoires :

- le 19 janvier 1995 à La Tremblade, pour la mise en place de l'URM;
- le 4 décembre 1995 à Sète, pour effectuer le bilan de la première année et préparer le programme de 1996.
- le 16 janvier 1997 pour effectuer le bilan des deux premières années de fonctionnement. Cette réunion s'est tenue à Nantes en présence d'Alain MICHEL (Directeur de la DRV), d'un invité extérieur Bernard CHEVASSUS de l'INRA et pour la première fois des responsables des programmes de génétique crevettes et poissons.
- le 6 mai 1998, réunion de travail à Sète pour le programme prospectif à mettre en œuvre dans le cadre du renouvellement de l'URM.

Parallèlement nous avons organisé deux réunions sur l'utilisation des outils de biologie moléculaire et de la génétique des populations au sein de l'Ifremer, la première le 11 septembre 1996 à la demande de la Direction scientifique et la seconde à la demande de la Direction des Ressources Vivantes, le 18 novembre 1998 (Annexe 5).

4.1.8. Conclusion

On peut donc estimer que sur le plan humain, le bilan moral de l'URM est très satisfaisant, car les contacts entre les deux parties ont été fréquents et utiles. En

1994, le laboratoire de La Tremblade n'avait pas de compétence dans le domaine des marqueurs moléculaires, tous les programmes d'amélioration génétique ou de génétique des populations intègrent désormais cette composante. Les chercheurs, ainsi que deux des trois techniciens de l'équipe de génétique du laboratoire Ifremer-LGP et un technicien du COP de Tahiti, ont été formés à l'utilisation des marqueurs moléculaires.

Cette collaboration a également donné à l'Ifremer les compétences nécessaires au montage de laboratoires de biologie moléculaire permettant l'utilisation des marqueurs en routine à l'Ifremer-LGP et au COP, ainsi qu'une habilitation à l'utilisation de la radioactivité à l'Ifremer-LGP (P₃₂, P₃₃, etc.). La proximité du GPI-Sète n'a pas rendu un tel laboratoire nécessaire à Palavas. Enfin, le GPI-Sète a pu bénéficier des installations expérimentales de La Tremblade et Palavas qui sont sans commune mesure avec ce que peut offrir l'Université.

Par ailleurs, les sujets de recherches proposés ont attiré de nombreux étudiants provenant de diverses Universités (La Rochelle, Tours...), ce qui a permis à ceux-ci d'avoir un contact avec des sujets finalisés dans un cadre académique.

4.2. Autres collaborations

Les laboratoires de l'Ifremer et le GPI mènent parallèlement des projets en commun dans divers domaines qui interfèrent ou complètent les missions de l'URM 16 :

- Appel d'offres Ifremer-Biotechnologies : projet de 2 ans (1994-1995) coordonné par le laboratoire GPI de Montpellier-Sète associant le laboratoire Ifremer-LGP de La Tremblade et le laboratoire d'Aquaculture Tropicale de Tahiti visant le clonage et l'identification de marqueurs génétiques neutres hypervariables (microsatellites) chez l'huître plate *Ostrea edulis* et la crevette *Penaeus monodon*,
- GENEPHYS : projet européen de 5 ans (1996-2000) coordonné par le laboratoire Ifremer-LGP de La Tremblade qui vise à établir les relations entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance et leurs bases génétiques chez *C. gigas*. Ce projet associe des partenaires anglais, irlandais, grecs et français dont le laboratoire GPI de Montpellier pour le développement de nouveaux microsatellites et l'étude des microsatellites en phase larvaire,
- DIVERSITAS : une action commune a été soutenue par le programme Diversitas coordonné par le CNRS et auquel Ifremer est associé, dans le cadre du programme sur la biodiversité marine GENDIV. Pour ce qui concerne l'URM, le programme a soutenu en 96 les actions "*Crassostrea*" à La Tremblade, "*Sardinella*" et "*Pinctada*" à Sète,
- AGRICULTURE DEMAIN : dans le cadre de ce programme, Ifremer-Palavas soustraite au GPI-Sète le typage des familles de loup *Dicentrarchus labrax* (étude de paternité) ayant servi aux expériences concernant l'effet de l'environnement sur le déterminisme du sexe : recherche d'une éventuelle variabilité familiale,
- Dans le cadre d'une codirection du DEA de Christophe LEMAIRE (Industrie+URM) : typage microsatellitaire du stock français de géniteurs de loup *Dicentrarchus labrax* et comparaison de ce stock aux populations naturelles,

- PELFISH : Le GPI-Sète a mené, en partenariat avec l'ORSTOM, une petite action de caractérisation génétique des stocks des petits pélagiques côtiers de la mer de Java,
- EUROBASS : Il s'agit d'une action concertée dirigée par Ifremer-Palavas et regroupant 10 équipes européennes pour établir un programme d'amélioration génétique chez le loup. Ce programme touche à sa fin en décembre 2000 et débouchera sur plusieurs demandes de financement conjointes,
- Des actions non formalisées de coopération avec les équipes australiennes du CSIRO (Steve MOORE) et de l'AIMS (John BENZIE) ont été menées en marge de l'URM16, dans le cadre du programme crevettes. Elles ont conduit à l'utilisation des microsattellites développés pour *P. monodon* pour l'étude de populations sauvages australiennes et du stock captif de Tahiti. Dans le même cadre, la détermination de marqueurs introniques chez *P. monodon* et *P. vannamei* a été réalisée lors d'un séjour de N. BIERNE au CSIRO, à partir d'une banque génomique établie par ce laboratoire.

5. BILAN SCIENTIFIQUE.

Etant fédérée autour d'un outil plutôt que d'une thématique, l'URM 16 s'est intéressée à plusieurs espèces marines dont la sélection et la zootechnie font l'objet d'études à l'Ifremer. Alors que le calendrier prévisionnel concernait principalement les huîtres plates et creuses, les études réalisées sur le loup en collaboration entre Ifremer-Palavas et le GPI-Sète ont été intégrées à l'URM en 1996. Les résultats générés par ces études contribuent pour une partie substantielle au bilan scientifique de l'URM. De même, le développement de marqueurs microsatellites chez les crevettes Pénéides a également été intégré à l'URM en 1996, leur utilisation à Tahiti a pu fournir des données intéressantes sur la variabilité génétique des populations en élevage.

Le calendrier prévisionnel a été respecté dans ses grandes lignes, voire dépassé en ce qui concerne les recherches sur les autres espèces, hormis pour les aspects de cartographie génétique pour lesquels un projet international est toujours en cours de discussion (projet GIGAMAP sur la carte de *Crassostrea gigas*).

En ce qui concerne les crevettes Pénéides, les résultats obtenus restent en deçà de ce que l'on pouvait attendre au vu de l'utilisation des marqueurs chez les autres espèces. Le changement de l'espèce cible en cours de contrat, la difficulté du matériel biologique étudié, la situation éloignée du COP et le manque de personnel permanent qualifié sur cette thématique à Tahiti sont des éléments à prendre en compte dans ce bilan. La formation de Vincent Vonau dans le cadre de cette URM a permis de résoudre en partie ce dernier aspect. Le programme est resté malgré tout dépendant de la rotation des VAT qui en avaient la charge, avec des conséquences importantes sur la pérennité des actions (techniques, gestion des données et des produits).

5.1. Mollusques : les huîtres.

5.1.1. Recherche de marqueurs génétiques.

5.1.1.1. *Ostrea edulis*

Les marqueurs développés chez l'huître plate *Ostrea edulis* ont été les premiers disponibles, puisque leur recherche avait commencé dans le cadre de l'appel d'offres Ifremer-Biotechnologies qui a été à l'origine de la création de l'URM 16.

Une première banque génomique a été réalisée en 1993-1994 par Yamama Naciri, conduisant à l'identification de 12 locus microsatellites (9),(52). Trois de ces locus ont pu être utilisés en routine au laboratoire de La Tremblade. Afin d'augmenter le nombre de marqueurs potentiellement utilisables, une deuxième banque a été construite et criblée en 1995, lors d'un séjour de trois mois de Sophie Launey à Sète. Encadrée en permanence par Claude Delsert, elle a pu identifier 25 microsatellites supplémentaires. Après séquençage et définition des amorces à La Tremblade, 6 locus issus de cette nouvelle banque ont été retenus pour une utilisation en routine (67),(17). L'URM dispose donc de 9 locus utilisables en routine pour cette espèce, ce qui est un nombre tout à fait satisfaisant pour répondre à des problématiques tant de sélection que de dynamique des populations sauvages (69), (73). Ils sont

suffisamment nombreux et polymorphes (14 à 25 allèles) pour permettre des recherches de parenté complexes et l'étude de familles consanguines.

5.1.1.2. *Crassostrea gigas*

Les 3 premiers marqueurs microsatellites mis au point dans le cadre de l'URM sont issus de la collaboration de nos laboratoires avec l'Institute of Marine Biology of Crete (laboratoire de E. Zouros) dans le cadre d'un projet européen TRIPOS (76). A ces séquences se sont ajoutées 5 nouvelles séquences déterminées par le GPI-Sète dans le cadre du projet GENEPHYS (78). Leur amplification et leur utilisation en routine ont été réalisées à La Tremblade, les 7 microsatellites retenus présentent un fort niveau de polymorphisme avec 52 à 56 allèles par locus (3),(66),(16), (75).

Des marqueurs d'espèces ont également été définis dans le genre *Crassostrea* par l'étude du polymorphisme de restriction de fragments d'ADN mitochondrial (ADNr 16S et gène de la Cytochrome Oxydase) et nucléaire (ADNr 28S), amplifiés à partir de l'ADN total par PCR (4). Le laboratoire dispose actuellement d'échantillons des taxons suivants : *C. angulata*, *C. gigas*, *C. rivularis*, *C. sikamea*, *C. virginica*, *C. iredalei*, *C. belcheria*, *C. margaritacea*, *C. echinata*, *C. gasar*, *C. rhizophorae*, *S. commercialis* et *S. cucullata*, *O. edulis*, *O. stentina*, *O. densalamellosa*, *T. lutaria*. Les profils de restriction de ces espèces du fragment mitochondrial 16S sont étudiés pour 9 enzymes. Les profils de restriction du fragment mitochondrial 16S étant différents pour chaque taxon, nous disposons de marqueurs diagnostiques de chaque taxon. De tels marqueurs pourront être utiles en cas de litige ou d'importation douteuse (cf. programme «qualité des mollusques»). Ils représentent une première étape vers des études phylogénétiques plus fines, pour lesquelles une collaboration avec l'Université de La Rochelle a été initiée.

5.1.2. Sélection assistée par marqueurs.

5.1.2.1. Cartographie du génome et recherche de QTL.

Il était initialement prévu de commencer la cartographie du génome de l'huître plate et de l'huître creuse. Le faible nombre de marqueurs disponibles pour l'huître creuse, et leur disponibilité récente n'ont pas permis de commencer ce travail. Mais des contacts ont été pris pour participer à un projet international de cartographie du génome de *Crassostrea gigas* (projet GIGAMAP). Des familles en ségrégation seront créées par un des partenaires de ce projet et distribuées aux différents partenaires qui les analyseront avec les marqueurs dont ils disposent.

Pour l'huître plate, le LGP-Ifrémer a créé des familles issues de pleins-frères hybrides entre huîtres sauvages et huîtres sélectionnées pour la tolérance à la bonamiose. Deux familles ont été analysées avec tous les marqueurs microsatellites et isozymiques disponibles. L'étude des liaisons génétiques de 12 locus microsatellites et 4 locus allozymes (en collaboration avec S. Hubert, UCG Galway) a permis d'identifier 9 groupes de liaisons, dont 4 impliquant au moins deux marqueurs (24). Ce résultat constitue une première base pour l'élaboration d'une carte de liaison du génome d'*Ostrea edulis* (2N = 20). En revanche, il n'a pas été possible de cartographier des locus impliqués dans la tolérance à la bonamiose, parce que l'évaluation de la sensibilité individuelle à la bonamiose n'est pas encore possible.

5.1.2.2.Sélection assistée par marqueurs.

Si aucun marqueur de caractère quantitatif (QTL) n'a pu être encore développé dans le cadre de l'URM, la notion de Sélection Assistée par Marqueur au sens large a été abordée, notamment dans le cadre du programme de sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* pour la survie en milieu bonamiosé.

L'Ifremer a lancé un programme de sélection de l'huître plate pour la survie en milieu bonamiosé depuis 1985 (19),(2). Pour des raisons zootechniques et de mode de reproduction de l'huître plate, le nombre d'individus fondateurs des trois populations sélectionnées demeurait inconnu. En utilisant 5 locus microsatellites sur un nombre suffisant de leurs descendants, il a été possible de retrouver le nombre exact et le génotype des fondateurs d'une des populations sélectionnées. Pour les deux autres populations, le nombre de fondateurs a été estimé par le nombre de fratries détectables au sein de la population, ainsi que par comparaison du niveau de diversité allélique avec celui de la population sauvage dont étaient issus les fondateurs (69),(17). Ainsi, les trois populations sélectionnées sont issues respectivement de 3 individus fondateurs pour la population P89ni, environ 10 pour la population P89i et environ 15 pour la population P85. Ce faible nombre d'huîtres fondatrices a déjà entraîné l'apparition de consanguinité au sein des populations (65). La poursuite de la sélection impose l'importation de diversité génétique à partir d'un nombre suffisant d'individus sauvages. Comme chez le loup, la possibilité de trier les fratries à l'intérieur d'un mélange d'individus ouvre des possibilités nouvelles de schémas de sélection. Alors que la biologie particulière de l'huître plate nous oblige à placer les géniteurs par couples en isolement pour contrôler les croisements, il devient possible de faire pondre un groupe de plusieurs individus, puis de déterminer l'identité des individus qui ont réellement pondu et éventuellement leur sexe. De plus, le génotypage systématique des géniteurs des familles de pleins-frères du cycle de sélection actuel a permis de vérifier les apparentements et les généalogies. Il permettra à l'avenir d'éviter les croisements consanguins.

5.1.3. Caractérisation des ressources génétiques, identification génétique des stocks et populations naturelles.

La structuration géographique de la diversité génétique révélée par les marqueurs microsatellites est en cours d'étude chez l'huître plate et l'huître creuse, ce qui permettra à terme d'optimiser les collectes de ressources génétiques, afin d'obtenir la diversité génétique la plus large possible pour des caractères intéressants en sélection.

Chez l'huître plate, 13 populations sauvages ont été analysées avec cinq marqueurs microsatellites, les résultats comparés à la structuration révélée par les allozymes (travaux de l'équipe espagnole d'Alvarez). Cela a permis de vérifier l'hypothèse d'une différenciation entre un stock atlantique et un stock méditerranéen (69). Une étude complémentaire est en cours, par analyse du polymorphisme de restriction de séquences mitochondriales, dans le cadre d'un appel d'offres BRG 1997 et d'un DEA qui sera réalisé en 1999 par E. DIAZ.

Chez l'huître creuse, le polymorphisme de restriction de séquences mitochondriales a fourni des marqueurs d'espèces, ainsi qu'un certain polymorphisme au niveau intra-spécifique. Ils permettent de distinguer toutes les espèces du genre et d'étudier

leur phylogénie. L'étude de la différenciation entre populations d'huîtres creuses japonaises (*C. gigas*) et d'huîtres creuses portugaises (*C. angulata*), deux formes interfertiles d'une même espèce, a été entreprise à l'aide de 4 locus microsatellites (23), (58). La moyenne du nombre d'allèles par population est égale à 27. Les résultats obtenus sur un ensemble de 12 populations (468 individus au total) confortent l'hypothèse, émise à partir des marqueurs mitochondriaux, d'une origine taiwanaise de *C. angulata*. Les niveaux de différenciation observés entre populations sont relativement faibles (F_{st} global = 0.017, F_{st} par paires entre 0 et 0.044) et équivalent à ceux observés entre populations naturelles d'*Ostrea edulis*. Les populations de *C. angulata* montrent un niveau de polymorphisme équivalent à celles de *C. gigas*. On en conclut que l'introduction d'huîtres creuses en provenance de Taïwan vers le Portugal au XV^{ème} siècle n'a pas entraîné de réduction notable de la variabilité génétique. Les allèles les plus fréquemment observés chez ce taxon, pour 3 des 4 locus étudiés, sont d'une taille supérieure à ceux observés chez *C. gigas*. Les causes de ces différences de taille d'allèles (notamment la possible présence d'une insertion au sein du fragment amplifié) seront à rechercher par le séquençage de ces allèles.

5.1.4. Déterminisme génétique du recrutement et génétique en phase larvaire.

Une relation positive entre croissance et hétérozygotie à des locus allozymiques est fréquemment observée chez les mollusques bivalves marins, associée à des déficits en hétérozygotes (70). Ces aspects ont été étudiés chez l'huître plate avec des marqueurs microsatellites, à la fois aux stades larvaire et naissain dans des familles consanguines issues de pleins-frères (1), (55), (56), et dans un lot de captage naturel *a priori* non consanguin. La relation hétérozygotie-croissance n'a pas été retrouvée pour les microsatellites dans le lot de captage naturel, ce qui parle en faveur d'une superdominance directe des allozymes. Par contre, elle a été retrouvée au sein des familles consanguines, où ces locus sont alors des marqueurs de la part du génome qui est homozygote à cause de la consanguinité, donc marqueurs du fardeau génétique. En revanche, le déficit en hétérozygotes n'a été retrouvé dans aucune des deux expériences, ni avec les allozymes ni avec les marqueurs microsatellites. La ségrégation des allèles dans les familles consanguines a été normale, un excès en hétérozygotes se développant ensuite à cause d'une mortalité préférentielle des homozygotes, qui va dans le même sens que la relation hétérozygotie-croissance (1). Au cours de l'étude du lot de captage naturel, les marqueurs microsatellites se sont révélés être un très bon outil pour tester l'absence de consanguinité.

Le fort niveau de variabilité mis en évidence grâce aux marqueurs microsatellites ouvre la possibilité d'études de parenté, telles celles réalisées en 1998 dans le cadre du programme «Genephy» (79), (57), (72). Dans une de ces expérimentations, nous avons utilisé un marqueur microsatellite pour analyser les contributions parentales dans deux types de croisements contrôlés chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les résultats de cette expérience montrent que malgré des contributions gamétiques équilibrées entre les parents avant la fécondation *in vitro*, des contributions parentales déséquilibrées sont observées 6 jours après celle-ci. Des effets de compétition gamétique et zygotique ont été démontrés, ainsi qu'une survie différentielle des descendants (63).

5.2. Autres mollusques.

5.2.1. Moules

5.2.1.1. Recherche de marqueurs génétiques.

Suite à la mise en évidence au laboratoire d'un polymorphisme de longueur dans l'intron n°1 du gène *mac-1* de l'actine (10), un marqueur polymorphe a été développé et utilisé pour l'analyse génétique de populations naturelles de moules des espèces *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*. Un important polymorphisme de longueur (20 allèles de taille, répartis en 4 classes) a été révélé après amplification par PCR et séparation des produits d'amplification sur gel de polyacrylamide dénaturant (5), (59). Sa facilité d'emploi nous a incité à développer ces marqueurs chez d'autres espèces (cf crevettes).

5.2.1.2. Caractérisation des ressources génétiques, identification génétique des stocks et populations naturelles.

L'analyse des données génétiques a permis d'assigner à chacune des populations étudiées son statut taxonomique en utilisant des populations de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* de référence. Nous avons comparé des échantillons de *Mytilus* des côtes Nord-Ouest africaines (Maroc, Sahara occidental et Mauritanie) à des échantillons de référence pour chacune des deux espèces *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Nos résultats montrent que les moules nord-ouest africaines appartiennent à l'espèce *M. galloprovincialis* et confirment ce qu'on pouvait prédire d'après les données morphologiques et la localisation géographique. Ils mettent aussi en évidence une différence génétique significative entre ces populations *M. galloprovincialis* nord-ouest africaines, ainsi que des populations échantillonnées au Portugal et des populations *M. galloprovincialis* de Méditerranée (5). D'autre part, des caractéristiques génétiques particulières ont été trouvées pour les populations échantillonnées en Australie, Tasmanie et Nouvelle Zélande. En effet, ces populations présumées *M. galloprovincialis* à partir de données allozymiques sont quasiment monomorphes au locus *mac-1* pour un allèle fréquent chez *M. edulis*. Ces résultats, ainsi que des données moléculaires récentes sur les ADN mitochondriaux nous ont amené à remettre en cause la systématique du complexe *M. edulis* - *M. galloprovincialis* (59). Ces travaux nous ouvrent de nouvelles voies d'investigation pouvant conduire à une révision complète des relations génétiques entre les espèces du complexe *M. edulis* - *M. galloprovincialis* ainsi qu'à l'élaboration d'un scénario phylogéographique à l'échelle mondiale. Nous envisageons d'étendre l'étude à d'autres marqueurs nucléaires, et d'analyser les relations génétiques entre populations de moules sur la totalité de leur aire de répartition mondiale. Par exemple, nous avons d'ores et déjà mis en évidence la ségrégation de gènes de *M. edulis* chez les *M. trossulus* de la Mer Baltique (14).

5.2.2. Nacres

A la demande d'Ifremer-Tahiti d'une part, et en collaboration avec Françoise BLANC d'autre part (elle-même en contact avec le Mexique), une comparaison des structurations génétiques mitochondriales chez *Pinctada margaritifera* en Polynésie

et *P. mazatlanica* au Mexique a été réalisée à Sète dans le cadre de la thèse de Sophie Arnaud. Les premiers résultats montrent que :

1. les lignées mitochondriales des deux espèces sont complètement différenciées, ce qui confortent leur statut taxonomique un temps discuté (74),
2. la structuration mitochondriale est très faible en Polynésie, ce qui confirme les résultats allozymiques, alors qu'elle est très forte au Mexique, avec des niveaux de variabilité très différents dans les deux cas (21).

Ces résultats pourraient être corrélés avec une recolonisation récente des lagons de Polynésie suite aux variations du niveau de la mer, par rapport à la persistance de peuplements plus stables sur les marges continentales mexicaines. Les conclusions à en tirer quant à la gestion des stocks des différentes îles seront à confronter aux résultats issus de la deuxième partie de la thèse de Sophie Arnaud consacrée aux marqueurs nucléaires qui ont été développés par la technique DALP (60).

5.3. Poissons.

5.3.1. Recherche de marqueurs génétiques.

Chez le loup (*Dicentrarchus labrax*), 7 marqueurs microsatellites (*Labrax-3*, *Labrax-6*, *Labrax-8*, *Labrax-13*, *Labrax-17* et *Labrax-29*) ont été développés et utilisés au GPI par F. J. Garcia de Leon (8), (62). Sur 7 locus, six se sont révélés extrêmement polymorphes dans les populations naturelles. Le nombre d'allèles par locus varie de 30 à 50 pour des hétérozygoties (H_{nb}) allant de 0.70 à 0.93. Outre l'étude de la structuration des populations naturelles, ces marqueurs constituent à l'heure actuelle un outil de choix dans les programmes d'amélioration (voir ci-dessous). Il est enfin intéressant de signaler que ces marqueurs sont aussi utilisables chez une espèce congénérique *Dicentrarchus punctatus*.

5.3.2. Aide à la sélection chez *D. labrax*.

Les marqueurs moléculaires offrent de larges possibilités de simplification de la zootechnie appliquée à la génétique grâce aux mélanges de lots qu'ils autorisent. Pour la première fois, des tests en vraie grandeur des possibilités d'étiquetage génétique ont été réalisés sur du matériel marin. L'idée de base est de pouvoir trier *a posteriori* des individus de génotypes différents élevés en bassins communs et donc dans des conditions rigoureusement identiques. Ceci permet de s'affranchir de la variance environnementale souvent très forte pour du matériel aquatique, et par là donne une puissance statistique inégalée pour détecter des effets génétiques minimes. Nous avons appliqué avec succès cette technique chez le loup sur un croisement expérimental 3x3, où nous avons pu suivre les effets associés à chaque famille de demi-frères sur la survie et la croissance. Ceci a donné lieu à une publication dans la revue *Aquaculture* qui a reçu un très bon accueil des spécialistes et a servi de point de départ à de nombreuses études similaires (6). Depuis, un programme identique, en cours à la station de Palavas dans le cadre de la thèse d'Eric Saillant, est réalisé sur une plus grande échelle (3 femelles X 9 mâles) et sur plusieurs environnements d'élevage. L'analyse des typages génétiques de cette deuxième étude confirme l'importance des effets parentaux, aussi bien maternels que paternels, mais aussi dévoile leur constance quel que soit l'environnement.

5.3.3. Caractérisation des ressources génétiques, identification génétique des stocks et populations naturelles.

5.3.3.1. Chez le loup *D. labrax*

Le typage d'un grand nombre d'échantillons naturels couvrant l'essentiel de l'aire de répartition de *D. labrax* a été un autre des sous-produits de la disponibilité des 6 locus microsatellites clonés par F. Garcia-de Leon (7),(8). Ces outils moléculaires figuraient, à notre connaissance, parmi les premiers utilisables sur une espèce marine. Sans rentrer dans les détails abondamment exposés dans les différents rapports joints en annexe, la réalisation de trois thèses sur le sujet a permis de donner une image génétique cohérente de cette espèce. Trois grands groupes ont été identifiés, en Atlantique, Méditerranée occidentale et Méditerranée orientale. Le groupe de Méditerranée occidentale apparaît comme le plus homogène avec une situation quasi-panmictique (7) et sa transition avec le groupe Atlantique s'effectue à l'est de Gibraltar, probablement au niveau du front océanographique Alméria/Oran (20). Quant à la Méditerranée orientale dont les populations se séparent des précédentes au niveau du détroit siculo-tunisien, elle est constituée de groupes plus différenciés correspondant probablement à ses différents sous-bassins (22).

L'intérêt de cette caractérisation génétique initiale est multiple : cela va permettre par exemple d'objectiver la notion de stocks en halieutique, et de proposer une gestion des cheptels d'élevage en fonction de leur origine géographique. Ceci est inclus dans les propositions faites pour le programme d'amélioration génétique EUROBASS. Cela permet aussi de "suivre à la trace" les échappés d'élevage. En effet, le génotypage à 6 locus très polymorphes donne un pouvoir d'assignation quasi individuel, et il est possible de dire avec une très bonne certitude si un individu est originaire de l'un ou l'autre des trois principaux stocks. Cela nous a permis par exemple d'identifier des contaminations génétiques patentées en Méditerranée orientale (cas de Bardawill en Egypte notamment) liées à des transferts en provenance de Méditerranée occidentale où ont eu lieu les premières domestications.

Enfin, une collaboration avec le laboratoire du Pr. Valerio Sbordoni de Rome a permis de comparer les données sur les marqueurs microsatellites avec des résultats obtenus sur marqueurs enzymatiques à l'échelle des populations méditerranéennes. Cette comparaison a permis de démontrer l'existence de processus sélectifs chez les post-larves entrant en lagune pour y effectuer une partie de leur cycle de vie (18).

Ces mêmes possibilités de génotypages ont été appliquées aux stocks captifs. La comparaison des stocks provenant de cinq écloséries françaises avec un ensemble d'échantillons de populations provenant des zones de Méditerranée occidentale et orientale ainsi que de l'océan Atlantique a été réalisée au cours du DEA de Christophe Lemaire (71). Les résultats indiquent une nette tendance vers la réduction de polymorphisme (mesurée par le nombre d'allèles par locus avec correction pour la taille de l'échantillon par rééchantillonnage de type bootstrap) chez les populations d'élevage. Cependant, aucune différence n'est observée sur la diversité génique (mesurée par le H de Nei (1978)) ni sur la mesure du Fis (mesurant l'écart à l'équilibre de Hardy Weinberg), indiquant que cette réduction de variabilité n'est sans doute pas imputable à de la consanguinité. Pour les stocks à variabilité réduite, il semblerait donc que la dérive par réduction du nombre de géniteurs

(effectif efficace réduit) puisse être invoquée. En effet, de nombreuses écloséries constituent leur cheptel à partir de poissons d'élevage présentant des phénotypes d'intérêt. Cependant, chaque année, de nombreux géniteurs provenant directement du milieu naturel sont injectés dans les cheptels afin de maintenir un haut niveau de diversité. Il semble donc que selon les écloséries les stratégies diffèrent, celles dont le polymorphisme est réduit semblent avoir moins recours aux géniteurs naturels que les autres.

5.3.3.2. Dans le genre *Beryx*

A la demande et avec la participation de l'IRD une caractérisation mitochondriale et nucléaire des poissons de profondeurs inféodés aux monts sous-marins du genre *Beryx* a pu être réalisée sur un échantillonnage principalement réalisé autour de la Nouvelle-Calédonie (64), avec quelques points extérieurs. Les résultats, surprenants, mettent en évidence l'existence d'une espèce jumelle insoupçonnée présente dans les seuls échantillons du nord de la Calédonie, alors que l'autre espèce est présente partout et remarquablement homogène sur l'ensemble du Pacifique, voire de l'Atlantique. Ces résultats posent clairement la question de la validité des données biologiques employées à la base des estimations de productivité des pêcheries, de même qu'elles renvoient à la problématique générale des moteurs de la spéciation en milieu marin.

5.4. Crevettes Pénéides.

5.4.1. Recherche de marqueurs génétiques.

5.4.1.1. *Penaeus monodon*

Neuf marqueurs microsatellites ont été développés chez *Penaeus monodon* en 1995, dans le cadre de l'Appel d'Offre Biotechnologies. Du fait du recentrage des programmes génétiques crustacés sur l'espèce *Penaeus stylirostris*, ces marqueurs n'ont pas fait l'objet de développement en interne (61).

5.4.1.2. *Penaeus stylirostris*

Les ressemblances phénotypiques recouvrant de profondes divergences phylogéniques chez les Pénéides, les marqueurs développés chez *P. monodon* n'ont pu être transférés chez *P. stylirostris* après que cette dernière fût devenue l'espèce cible. Un nouveau clonage a du être réalisé fin 1996 et a abouti au séquençage de 13 nouveaux microsatellites (11).

Au bilan, sur ces 13 locus :

- 3 ont du être abandonnés (Styli6, Styli8 et Van3),
- 3 nécessitent une mise au point supplémentaire (Styli1, Styli2 et Styli11),
- 2 se sont révélés monomorphes sur les échantillons testés (Styli21 et Styli22),
- 3 semblent pouvoir être utilisés en routine (Styli5, Styli9 et Styli19).

5.4.1.3. Marqueurs introniques

Suite au succès de mac-1 chez les moules, la recherche de marqueurs introniques a également été effectuée chez les crevettes Pénéides, en collaboration avec l'équipe de S. Moore du CSIRO Cleveland (Brisbane, Australie). A partir d'une banque d'ADN complémentaire de *P. monodon*, des amorces PCR ont été dessinées pour amplifier les introns potentiels de 9 gènes préalablement localisés à partir de séquences d'espèces proches. Quatre gènes ont montré un polymorphisme de longueur chez *P. monodon*, 4 chez *P. vannamei*, et un chez *P. japonicus* (13). Ces marqueurs introniques, dont les amorces sont situées dans des régions conservées des exons, ont montré un taux de transfert excellent entre des espèces phylogénétiquement très éloignées et sont donc potentiellement utilisables sur toutes les espèces de Pénéides.

5.4.2. Caractérisation des ressources génétiques

Trois des marqueurs microsatellites développés chez *Penaeus monodon* d'entre eux (Pmo9, Pmo25 et Pmo27) ont été utilisés dans le cadre d'une action ponctuelle de collaboration avec le groupe de John Benzie (AIMS, Townsville, Australie) pour l'étude du polymorphisme de populations sauvages australiennes (15).

Une étude de la diversité génétique de cette espèce de part et d'autre de l'archipel indo-malais a également été menée en collaboration avec B. Mc Andrew (University of Stirling) et Jean-Jacques Versini du GPI.

5.4.3. Aide à la sélection, diversité génétique au sein des stocks de géniteurs en captivité.

5.4.3.1. *Penaeus monodon*

Les marqueurs Pmo25 et Pmo27 ont été utilisés ponctuellement pour caractériser la souche captive *P. monodon* du COP, à l'occasion d'une mission de J. Benzie à Tahiti en avril 1998. Les analyses montrent l'existence de deux allèles seulement à chacun des locus, et de trois génotypes, ce qui indique que le stock actuel provient d'un seul accouplement de deux parents hétérozygotes à chacun des locus.

5.4.3.2. *Penaeus stylirostris*

L'utilisation des trois microsatellites Styli5, Styli9 et Styli19 a permis de caractériser les stocks captifs présents à Tahiti au niveau des fréquences alléliques, des diversités géniques et de la valeur des coefficients Fis. Si la variabilité génétique apparaît faible sur ces stocks, les résultats ne montrent pas, dans la population COP, d'écart à Hardy-Weinberg. Ce déséquilibre s'avère plus faible que le déséquilibre théorique attendu, ce qui peut s'expliquer par une sélection contre les homozygotes du fait d'effets hétérotiques dans la population. Les microsatellites montrent l'existence d'une variabilité génétique en dépit des goulots d'étranglement s'étant produits dans l'histoire de ces stocks. A noter que les difficultés de mise au point ont retardé l'analyse d'animaux sauvages (fournis par E. Cruz-Suarez de l'Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexique).

Une corrélation significative a été trouvée entre le taux d'hétérozygotie multi-locus (MLH) et le taux de croissance dans la population COP. Les résultats permettent de rejeter l'hypothèse d'une superdominance associative. L'hétérozygotie aux locus marqueurs neutres semble suffisamment bien corrélée avec le coefficient de consanguinité individuel pour mettre en évidence une dépression de consanguinité significative pour le taux de croissance dans la population de *P. stylirostris* du COP (12)

6. PUBLICATIONS, COLLOQUES ET RAPPORTS.

Toutes les actions de coopération menées entre les différents laboratoires se développent de manière très positive, et se traduisent par un certain nombre de publications, thèses, mémoires d'étudiant et rapports.

6.1. Publications parues

1. **Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y. et Bonhomme F. (1998).** Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analysis on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* 148 (4):1893-1906.
2. **Boudry P., Chatain B., Naciri Y., Lemaire C. et Gérard A. (1997).** Genetical improvement of marine fish and shellfish: a french perspective. Proceedings of the 5th International Conference for Productivity Enhancement of the Coastal Waters. Pusan, Korea, May 23-24 1996.
3. **Boudry P., Collet B., Kotoulas G., Magoulas A., Hervouet V., Bonhomme F. et Gérard A. (1998).** The use of microsatellite markers for parentage analysis in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). ICES C.M. 1998/K7.
4. **Boudry P., Heurtebise S., Collet B., Cornette F. et Gérard A. (1998).** Differentiation between populations of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226: 279-291.
5. **Daguin C., Borsa P. (1999).** Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 235, 55-65.
6. **Garcia de Leon F. J., Canonne M., Quillet E., Bonhomme F., Chatain B. (1998).** The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 159 (3-4): 303-316.
7. **Garcia de Leon F. J., Chikhi L., et Bonhomme F. (1997).** Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Mol. Ecol.*, 6, 51-62.
8. **Garcia de Leon F. J., Dallas J., Chatain B., Canonne M., Versini J-J. et Bonhomme F. (1995)** Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Perciformes, Serranidae). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 4(1), 62-68.

9. **Naciri Y., Vigouroux Y., Dallas J., Desmarais E., Delsert C. et Bonhomme F. (1995)** Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 4(1):83-89.
10. **Ohresser M., Borsa P. et Delsert C. (1997)** Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1*: a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 6(2): 123-130.
11. **Vonau V., Ohresser M., Bierne N., Delsert C., Beuzart I., Bédier E., Bonhomme F. (1999)**. Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Anim. Genet.*, 30 (3): 234-235.

6.2. Publications sous presse

12. **Bierne N., Beuzart I., Vonau V., Bonhomme F., Bédier E., Aquacop (1998)**. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*.
13. **Bierne N., Lehnert S.A., Bédier E., Bonhomme F., Moore S.S. (1999)**. Screening for Intron-Length Polymorphisms in Penaeid Shrimp Using Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) PCR. *Mol. Ecol.*
14. **Borsa P., Daguin C., Ramos Caetano S., Bonhomme, F. (1999)**. Nuclear-DNA evidence that northeastern atlantic *Mytilus trossulus* mussels carry *M. edulis* genes. *J. Mollus. Stud.*
15. **Brooker A., Benzie J.A.H., Blair D., Versini J.-J. (1999)**. Population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Australian waters, using microsatellite markers. *Mar. Biol.*
16. **Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C., Bonhomme F. (1999)**. Microsatellites in the Pacific Cupped Oyster *Crassostrea gigas* and Other Cupped Oyster Species. *Anim. Genet.*
17. **Launey S., Barré M., Gérard A., Naciri-Graven Y., (1999)**. Evidence for bottleneck and family structure in *Bonamia ostreae*-resistant strains of *Ostrea edulis* as revealed by microsatellite markers. *Genet. Res.*
18. **Lemaire C., Allegrucci A., Naciri M., Bahri-Sfar L., Kara H., Bonhomme F. (1999)**. Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ? *Mol. Ecol.*
19. **Naciri-Graven Y., Launey S., Lebayon N., Baud J.P., (1999)**. Influence of parentage upon growth in *Ostrea edulis*: evidence for inbreeding depression. *Genet. Res.*
20. **Naciri M., Lemaire C., Borsa P., Bonhomme F. (1999)**. Genetic study of the Atlantic / Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Hered.*

6.3. Publications soumises

21. **Arnaud S., Bonhomme F., Blanc F. (1999)** "Population structure and genetic variability of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along the American Pacific coasts", soumis.
22. **Bahri-Sfar L., Lemaire C., Ben Hassine O. K., Bonhomme, F. (1999).** Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. Proc. R. Soc. London B., soumis.
23. **Huvet A, Lapegue S., Magoulas A. and Boudry P. (1999).** Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of two closely related cupped oyster taxa *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. Soumis à Molecular Ecology;
24. **Launey S., Hubert S., Delsert C., Boudry P., Naciri-Graven Y. (1999).** Non-Mendelian segregation of microsatellite and allozyme markers and its influence on linkage analysis in the European flat oyster *Ostrea edulis*. Soumis à Heredity.

6.4. Présentations à des Colloques et Posters

25. **Bierne N., Beuzart I., Vonau V., Bonhomme F., Bédier E., Aquacop (1998).** Heterosis associée aux marqueurs microsatellites dans les populations d'élevage de la crevette *Penaeus stylirostris*. Poster. XXème Colloque du Groupe de Biologie et Génétique des Populations, Lille, Septembre 1998.
26. **Bierne N., Bonhomme F. et Naciri-Graven Y. (1996).** La génétique de la phase larvaire peut-elle expliquer le déficit en hétérozygotes chez les bivalves marins? Etude de la ségrégation de locus microsatellites chez *Ostrea edulis*. Poster. XVIIIème Colloque du Groupe de Biologie et Génétique des Populations, Grenoble, Août 1996.
27. **Bierne N., Bonhomme F., Launey S. and Naciri-Graven Y. (1996).** Selection at larval stage in *Ostrea edulis*. Poster. 9th Annual Colloquium on "The genetic and physiological bases of heterosis", Bodega Bay (California, USA), 12-14 Septembre 1996.
28. **Bierne N., Naciri-Graven Y. et Bonhomme F. (1996).** Microsatellites en phase larvaire chez *Ostrea edulis*. 18ème Congrès du Groupe de Génétique des Populations 27 août-30 août 1996. Grenoble.
29. **Bierne N., Naciri-Graven Y., Launey S. et Bonhomme F. (1996).** Microsatellites during the larvae phase in *Ostrea edulis*. Workshop on Heterosis in Oysters. September 1996. Davis University.
30. **Boudry P., (1996).** Les huîtres creuses dans le monde : acclimatation et hybridation. 24ème Salon Ostréicole de La Tremblade, 10-13 Mai 1996.
31. **Boudry P., Chatain B., Naciri Y., Lemaire C. et Gérard A. (1996).** Genetical improvement of marine fish and shellfish: a french perspective. 5th international Conference for productivity Enhancement of the Coastal Waters. Pusan, Korea, Mai 23-24 1996.

32. **Boudry P., Heurtebise S., Cornette F., Collet B. et Gérard A. (1996).** Where does the portuguese oyster really come from ?. Poster. 30th annual meeting of the Population Genetics Group. Edinburg, United-Kingdom, 17-20 Décembre 1996.
33. **Boudry P., Huvet A., Launey S. (1998).** Approche comparative de la variabilité et de la structuration génétique chez deux espèces d'huîtres cultivées (*Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis*) présentant des stratégies reproductives et des histoires contrastées. Workshop Dispersion larvaire et conséquences sur la variabilité génétique spatiale et temporelle du recrutement en milieu marin. Programme National sur le Déterminisme du Recrutement, Perpignan, France, 8-9 Janvier 1998.
34. **Boudry P., Naciri Y., Heurtebise S., Ledu C., Phelipot P. et Gérard A. (1995).** Les ressources génétiques dans le genre *Crassostrea* : une nécessité pour l'ostréiculture. Poster. 17ème Congrès du Groupe de Génétique des Populations. 29-31 Août 1995. Lyon. Prix du troisième meilleur poster.
35. **Daguin C., Bonhomme F., et Borsa P. (1998).** Polymorphisme d'intron et hybridation dans la zone de sympatrie entre les deux espèces de moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* sur les côtes françaises. XXème Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Lille, septembre 1998.
36. **Daguin C., Bonhomme F., et Borsa P. (1999).** Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* populations using intron-length polymorphism. 8th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions. Kavala, Mai 1999.
37. **Daguin C., Bonhomme F., et Borsa P. (1999).** Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* populations using nuclear DNA markers. Biology and Evolution of Bivalvia, Cambridge, Septembre 1999.
38. **Diaz Almela E., Boudry P., Launey S., Lapègue S., Ledu C., et Bonhomme F. (1999).** Structuration spatiale des populations européennes d'huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) : comparaison entre marqueurs mitochondriaux et nucléaires. Poster, XXIème Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Rennes, septembre 1999.
39. **Launey S. (1995).** Utilisation de marqueurs microsatellites dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique chez un mollusque bivalve *Ostrea edulis*. Colloque "Microsatellites et génétique des populations". Montpellier 18-19 décembre 1995.
40. **Launey S., Naciri-Graven Y., Delsert C., Bonhomme F. et Gérard A. (1996).** Variabilité génétique de deux populations d'huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) sélectionnées pour une résistance à *Bonamia ostreae*. 18ème Congrès du Groupe de Génétique des Populations - 27 août -30 août 1996. Grenoble.
41. **Launey S., Vigouroux Y., Naciri-Graven Y. et Bonhomme F. (1997).** Relation hétérozygotie-croissance chez l'huître plate : apport des locus microsatellites. 2ème Colloque Microsatellites et Génétique des populations, Paris, juin 1997.

42. **Launey S., Vigouroux Y., Naciri-Graven Y., Boudry P., Ledu C., Barré M. et Bonhomme F. (1997).** Growth-heterozygosity relationship in oysters : new evidence from microsatellite markers. Vème Congrès de l'European Society for Evolutionary Biology, Arnhem (Pays-Bas), 24-28 Août 1997.
43. **Lemaire C., Allegrucci A., Naciri M., Bahri-Sfar L. et Bonhomme F. (1998).** Action de la sélection au sein du système mer-lagune ? Allozymes-microsatellites : deux visions complémentaires de la biologie du loup de mer *Dicentrarchus labrax*. XXème Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Lille, septembre 1998.
44. **Lemaire C., Allegrucci A., Naciri M., Bahri-Sfar L., Kara H., et Bonhomme F. (1999).** Microsatellites and allozymes : two complementary views on the selection between marine and lagoon habitats in the sea bass. VIIth Congress of the European Society for Evolutionary Biology, Barcelona 1999.
45. **Naciri Y. (1995).** Broodstock management and breeding programs in France. WRCC-99 : USDA committee on 'Genetics, broodstock management and breeding in molluscs', San Diego, 30-31 January 1995.
46. **Naciri-Graven Y. (1996).** La sélection pour obtenir des souches mieux adaptées. 24ème Salon Ostréicole de La Tremblade, 10-13 mai 1996.
47. **Naciri-Graven Y. (1996).** L'huître plate *Ostrea edulis*: génétique des populations et génétique quantitative. Séminaire de l'Institut de Zoologie et d'Ecologie Animale (IZEA). Université de Lausanne.

6.5. *Rapports*

48. **Boudry P., Naciri Y., Héral M., Collet B., Bougrier S., Geffard O., Ledu C., Phélipot P., Heurtebise S., et Gérard A. (1996).** Amélioration de la qualité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par sélection de souches performantes. 2ème partie : année 1995. Contrat Etat-Région Poitou-Charentes 1994-1998. Convention 95/RPC-R-57 "Génétique", 30 p.
49. **Boudry P., Naciri Y., Heurtebise S., Delsert C., Ledu C. Phélipot P., Chollet B., Cochenec N. et Gérard A. (1996).** Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : Hybridations et conservatoire de souches. 2ème Partie : année 95. Contrat Etat-Région Poitou-Charentes 1994-1998. Convention 95/RPC-R-57 "Génétique", 20 p.
50. **Boudry P., Naciri Y., Launey S., Ledu C. Phélipot P., Heurtebise S. et Gérard A. (1995).** Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : Hybridations et conservatoire de souches. 1ère Partie : année 94. Contrat Etat-Région Poitou-Charentes 1994-1998. 59 p.
51. **Naciri Y., Héral M., Boudry P., Ledu C., Heurtebise S., Phélipot P. et Gérard A. (1995).** Sélection de l'huître creuse *Crassostrea gigas* pour de meilleures performances de croissance. 1ère partie : année 1994. Contrat Etat-Région Poitou-Charentes 1994-1998. 22 p.

52. **Versini J. J. (1995)** Recherche de marqueurs génétiques hypervariables chez l'huître plate et les crevettes pénaïdes. Rapport de fin de contrat universitaire 95.5.570066 Université Montpellier II.
53. **Vonau V. (1996)** Rapport de stage de formation effectué au Laboratoire Génome et Populations de l'Université de Montpellier II (du 4/9 au 4/10/95).
54. **Vonau V. (1997)**. Recherche de microsatellites chez la crevette *Penaeus stylirostris*. Rapport de stage de formation effectué au Laboratoire Génome et Populations de l'Université de Montpellier II (du 1/10 au 21/12/96). 56 p.

6.6. Thèses et Mémoires d'étudiants

55. **Bierne N. (1996)**. La génétique de la phase larvaire peut-elle expliquer le déficit en hétérozygotes chez les bivalves marins ? Etude de la ségrégation de locus microsatellites chez *Ostrea edulis*. Rapport de DEA, Université Montpellier II.
56. **Brun D. (1997)**. La génétique méiotique peut-elle expliquer les déficits en hétérozygotes chez les bivalves marins ? Etude de la ségrégation d'un locus microsatellite chez *Crassostrea gigas*. Rapport de stage.
57. **Collet B. (1998)**. Bases génétiques des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris Grignon, 208 p.
58. **Cornette F. (1996)**. A la recherche de l'huître portugaise : identification de marqueurs moléculaires discriminant *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*. Certificat de spécialisation en aquaculture, CEMPAMA-Beg Meil Fouesnant, 43 p.
59. **Daguin C. (1997)**. Polymorphisme d'intron, évolution moléculaire et biogéographie chez les moules du complexe d'espèces *Mytilus edulis*. Rapport de DEA, Université Montpellier II.
60. **De Barry J. (1999)** rapport de stage de Maîtrise de Biochimie "Utilisation de marqueurs génétiques pour l'étude de la dynamique de populations de deux espèces de nacres perlières" 5 p.
61. **Folco S. (1995)**. Contribution à la révélation de marqueurs génétiques chez la crevette *Penaeus monodon* (Fab.). Stage de DEA Université Française du Pacifique.
62. **Garcia de Leon F. J. (1995)**. Marqueurs hypervariables chez le loup *Dicentrarchus labrax* : applications aux programmes d'amélioration génétique et à l'étude des populations naturelles. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille. Centre d'Océanologie de Marseille.
63. **Hervouet V. (1998)**. Utilisation d'un marqueur microsatellite pour l'étude des contributions parentales chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Stage de DEA de Biologie des populations , génétique et Ecoéthologie de l'Université de Tours.
64. **Hoarau G. (1999)** Etude génétique des populations de *Beryx splendens* (Téléostéen : Berycidae) à différentes échelles géographiques ; comparaison

entre marqueurs nucléaires et mitochondriaux. Rapport de DEA Université de Paris XI).

65. **Höll K. (1996)**. Evaluation du polymorphisme de deux populations d'huîtres plates : *Ostrea edulis* sélectionnées pour une résistance au parasite : *Bonamia ostreae*. Mémoire de DTSM Intechmer-Cherbourg, 23 p.
66. **Huvet A. (1997)**. Différentiation génétique de deux huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* : Apport des marqueurs microsatellites. Rapport de DEA, Faculté des Sciences et Techniques de Tours.
67. **Launey S. (1995)**. Recherche de marqueurs génétiques et évaluation de la variabilité génétique dans le cadre d'un programme de sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* au parasite *Bonamia ostreae*. Rapport annuel de thèse 1ère année. 26 p.
68. **Launey S. (1996)**. Recherche de marqueurs génétiques et évaluation de la variabilité génétique dans le cadre d'un programme de sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* au parasite *Bonamia ostreae*. Rapport annuel de thèse 2ème année.
69. **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 de Doctorat de l'Institut National Agronomique Paris Grignon, 108 p.
70. **Le Clerc F. (1995)**. Evolution de la relation hétérozygotie-croissance et du déficit en hétérozygotes dans une population synthétique d'*Ostrea edulis*. Mémoire de l'option Biologie et Ecologie de l'Ecole Polytechnique.
71. **Lemaire C. (1997)**. Analyse de la variabilité génétique des stocks domestiques de loup (*Dicentrarchus labrax*), comparaison avec les populations naturelles. Rapport de DEA, Institut National Agronomique Paris Grignon.
72. **Morand B. (1996)**. Etude de la variabilité de croissance d'une population d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* - bases génétiques. DESS "Exploitation des Ressources Vivantes Côtières", Université de Caen, 75 p.
73. **Moreau M. (1995)**. Etude du transfert d'un microsatellite d'*Ostrea edulis* à *Crassostrea gigas*, *Crassostrea rivularis*, *Crassostrea virginica* et *Ostrea chilensis*. Mémoire de Maîtrise de Biochimie, Université des Sciences de Poitiers.
74. **Valera L. (1999)** rapport de stage INSA "Etude phylogénétique de deux espèces de nacres perlières à partir de séquences d'haplotypes mitochondriaux" p1-15.
75. **Vano L. (1996)**. Recherche de marqueurs de l'ADN nucléaire chez les huîtres creuses du genre *Crassostrea*. Rapport de stage de 2^{ème} année de BTS Biochimie. Lycée Jean Perrin, Reze (44).

6.7. Rapports de contrats de la Communauté Européenne

76. **Rapport TRIPOS (1996)** Assessment of aquacultural advantages following the cytogenetic induction of polyploidy in commercially important shellfish. Contract n°

AIR1-CT92-0168, Commission of the European Communities, Final report (report (1st January 1993 - 31st July 1996).

77. **Rapport GENEPHYS (1996).** Genetic basis and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*. Contract n° FAIR 95-421, Commission of the European Communities, First progress report (1st January-31st December 1996).

78. **Rapport GENEPHYS (1997).** Genetic basis and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*. Contract n° FAIR 95-421, Commission of the European Communities, Second progress report (1st January-31st December 1997).

79. **Rapport GENEPHYS (1998).** Genetic basis and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*. Contract n° FAIR 95-421, Commission of the European Communities, Third progress report (1st January-31st December 1998).

6.8. Divers

80. **Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L., Bonhomme F. (1996).** GENETIX, Logiciel sous WINDOWS™ pour la génétique des populations, version 3.3. Université Montpellier 2, Montpellier.

7. PERSPECTIVES.

A l'occasion d'une réunion de travail effectuée en 1998, nous avons passé en revue les objectifs qui nous semblent devoir mériter la poursuite d'un effort commun :

7.1. Au plan méthodologique

Après la première phase d'acquisition et de maîtrise des marqueurs microsatellites dans plusieurs espèces des trois principales filières aquacoles (mollusques, crustacés, poissons), il semble nécessaire de compléter la boîte à outils dont nous disposons par des marqueurs moléculaires qui apparaissent comme complémentaires dans leurs utilisations. Les microsatellites, du fait de leur grand polymorphisme (nous avons pu par exemple détecter jusqu'à 60 allèles à un locus chez *Ostrea edulis*, et une quarantaine chez le loup), sont l'outil idéal pour l'étiquetage génétique et les assignations de parenté. Ils sont donc utilisés en routine pour évaluer les contributions parentales de descendance élevées en mélange (cf. travaux sur le loup et sur *C. gigas*). Néanmoins ils sont parfois délicats à mettre en œuvre du fait même de leur grande variabilité et il semble possible de s'intéresser, avec des moyens de détections raisonnablement rapides, à deux autres types d'approches :

- L'une concerne la recherche rapide de marqueurs anonymes ayant le niveau de polymorphisme requis pour une application donnée. Il s'agit de mettre en œuvre des techniques de sélection directe de bandes polymorphes de types DALP ou AFLP,

- L'autre vise à obtenir des marqueurs génétiques qui soient situés, *a contrario* des marqueurs réputés neutres, à l'intérieur d'un gène de fonction connue ou supposée telle. On s'intéressera par exemple aux polymorphismes introniques qui semblent prometteurs, voire à des variants situés dans les exons et directement susceptibles d'être mis en rapport avec une fonction physiologique.

Nous développons rapidement ci-après les problématiques qui nous semblent devoir être abordées avec ces marqueurs.

7.2. Problématiques scientifiques: signification biologique du polymorphisme chez les espèces à forte fécondité.

7.2.1. Relation hétérozygotie/performances et consanguinité.

Au cours de la phase précédente, l'enjeu consistait à obtenir des marqueurs de l'ADN pour pouvoir mesurer l'hétérozygotie et ses effets dès les phases précoces du développement. Les premiers résultats acquis montrent l'étendue du fardeau génétique chez une espèce à forte fécondité comme l'huître. La prochaine question se pose maintenant comme suit : le fardeau observé résulte-t-il seulement de l'action de gènes délétères récessifs démasqués par les effets de la consanguinité ou bien y a-t-il d'autres types d'effets des gènes (épistasie, superdominance vraie, effets variables selon le milieu,...) qu'il convient de comprendre à la fois pour optimiser les stratégies d'amélioration et pour guider l'établissement des stocks de géniteurs. A ce stade, nous avons donc clairement besoin de pouvoir analyser le polymorphisme de gènes qui ne soient pas seulement des marqueurs neutres et non exprimés, mais qui correspondent à des fonctions déterminées susceptibles de contribuer directement au phénotype des hétérozygotes. Ceci correspond d'ailleurs à une tendance forte en génétique des populations à l'heure actuelle.

7.2.2. Recherche de gènes candidats liés à des fonctions d'intérêt adaptatif ou économique.

D'une manière plus large, la possibilité d'identifier des gènes qui codent pour des fonctions reconnues grâce aux approches moléculaires recensées en introduction permettrait d'aborder certaines questions comme la résistance aux stress (salinité, chocs thermiques, métaux lourds,...) ou aux pathogènes, à condition bien entendu que ces caractères soient sous la dépendance de gènes à effet majeur. A côté des méthodes purement mendéliennes comme la recherche de QTL, assez lourdes à mettre en œuvre et qui nécessitent des cartes génétiques saturées pour le moment indisponibles chez les espèces qui nous intéressent ici, on peut penser aux méthodes de type BSA (Bulk Segregant Analysis) appliquées à des techniques de détection du polymorphisme telles que l'expression différentielle des messagers (RNA differential display) ou encore DALP, AFLP, etc.... Concrètement, certaines opérations sont déjà dans une phase d'approche. Il s'agit par exemple du contrôle du polymorphisme de l'amylase chez *C. gigas*, et du rôle de l'aldolase dans l'adaptation au milieu lagunaire chez *D. labrax*. D'autres gènes candidats sont également en question, comme les métallothionéines, la phosphoglucomutase, les peptides antibactériens, ou encore la leucine amino-peptidase.

7.2.3. Populations naturelles

Nous pouvons considérer qu'avec les outils mentionnés ci-dessus, nous entrons maintenant dans la phase de maturité des techniques et des concepts disponibles pour cerner de plus près la notion d'unité de reproduction dans le milieu marin. Pour harmoniser les concepts dynamique et génétique du stock, nous pouvons espérer tirer de l'information des variations spatiales et temporelles des fréquences alléliques de marqueurs hypervariables pour, tout au moins dans certains cas d'espèces favorables, mettre en évidence des événements de reproductions en petits groupes, et éventuellement assigner les individus à la cohorte dont ils proviennent. Ceci serait une étape très importante pour comprendre où, comment (et donc pourquoi) un « stock » peut se maintenir génétiquement homogène sur une certaine aire géographique.

7.3. Espèces cibles

Huîtres, Pénéides et Loup restent des espèces phares dont les filières ne peuvent que bénéficier des travaux développés dans l'une ou l'autre des thématiques évoquées ci-dessus. Des efforts ont été également entrepris sur des espèces qui ne faisaient pas nommément l'objet du précédent plan mais dont l'importance économique ne peut plus être négligée. Nous citerons la nacre *Pinctada margaritifera*, mais aussi les petits pélagiques ou les ressources des monts sous-marins (en collaboration avec l'IRD). Un certain effort de recherche pourrait à l'avenir être également développé sur d'autres espèces cibles revêtant une importance stratégique en aquaculture ou halieutique. Mentionnons néanmoins que pour progresser, il est nécessaire de maintenir un juste équilibre entre l'approfondissement sur des espèces clés particulièrement bien maîtrisées et le défrichage sur des espèces moins étudiées.

8. CONCLUSION

Quatre ans après sa création, nous pensons que l'URM16 a bien rempli ses objectifs, puisqu'elle a permis à l'Ifremer d'acquérir des compétences en matière de mise au point et d'utilisation de marqueurs moléculaires qui lui faisaient défaut auparavant. Pour l'Ifremer, ceci s'est traduit par l'équipement du laboratoire de biologie moléculaire pour l'utilisation des marqueurs mitochondriaux et microsatellites, et par la formation des personnes, statutaires ou étudiants, y travaillant. Il est devenu un interlocuteur scientifique valable pour le laboratoire GPI de Montpellier-Sète, ce qui est concrétisé par le développement de thématiques communes et l'encadrement commun de plusieurs étudiants, qui valorisent la mise au point de marqueurs pour répondre à des questions de génétique des populations ou de gestion de stocks de géniteurs.

Au sein du département Ressources Aquacoles de l'Ifremer, les marqueurs microsatellites apportent des informations cruciales pour tous les programmes nécessitant la gestion d'un stock de géniteurs, que celui-ci soit associé ou non à un programme de sélection. L'impact de ces marqueurs sur les programmes huîtres plate et creuse, loup et crevette est significatif. Chez les huîtres et le loup, ils permettent déjà d'évaluer la quantité de diversité génétique disponible par comparaison avec des populations sauvages, d'estimer le nombre d'individus

fondateurs et d'éviter l'apparition de consanguinité dans les populations d'élevage. Ils donnent également une vision différente de la variabilité interspécifique qui, lorsqu'elle était considérée, ne pouvait auparavant l'être que de façon statistique. L'étude de la structuration géographique de la diversité génétique des huîtres et du loup avec les mêmes marqueurs a déjà débuté et elle est prévue pour *Penaeus stylirostris*. Elle va permettre un choix raisonné des géniteurs des populations d'élevage au sein de l'ensemble des ressources génétiques.

Les réunions internes Ifremer du 11 septembre 1996 et du 18 novembre 1998 (Annexe 5) sur "l'utilisation de la biologie moléculaire" au sein de l'Institut et sur "la génétique des populations" ont souligné l'intérêt des marqueurs moléculaires pour les autres départements de la Direction des Ressources Vivantes : Ressources Halieutiques (RH) et Valorisation des Produits (VP). Le département RH a besoin de marqueurs génétiques pour étudier la structuration géographique des stocks halieutiques, ainsi que pour étudier l'effet de l'effort de pêche sur la structure génétique des populations. Le département VP a quant à lui besoin de marqueurs d'espèces ou d'origine géographique pour compléter l'analyse des protéines pour la traçabilité des produits. Le rôle central et pionnier de l'URM16 sur ces thématiques à Ifremer a été souligné lors de ces réunions.

**9. ANNEXE 1 :
RAPPORT D'ACTIVITE DE L'ANNEE 1995**

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	40
2. FONCTIONNEMENT DE L'URM EN 1995	40
2.1. BILAN MORAL.....	40
2.2. BILAN FINANCIER.....	41
2.3. BILAN SCIENTIFIQUE.....	41
3. ETUDE DU POLYMORPHISME MICROSATELLITAIRE EN PHASE LARVAIRE ET POST-LARVAIRE CHEZ L'HUÎTRE PLATE <i>OSTREA EDULIS</i>	42
3.1. INTRODUCTION.....	42
3.2. MATERIEL ET METHODES.....	42
3.2.1. <i>Géniteurs</i>	42
3.2.2. <i>Pontes</i>	42
3.2.3. <i>Mesures effectuées</i>	43
3.2.4. <i>Techniques employées</i>	43
3.3. RESULTATS.....	43
3.3.1. <i>Mesures de larves</i>	43
3.3.2. <i>Premiers résultats sur le polymorphisme des populations</i>	45
3.4. DISCUSSION.....	47
3.4.1. <i>Optimisation des techniques</i>	47
3.4.2. <i>Analyse de la croissance et du développement des différents lots</i>	47
3.4.3. <i>Les enjeux scientifiques de cette étude</i>	48
3.5. CONCLUSION.....	48
4. DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES CHEZ L'HUÎTRE PLATE (<i>OSTREA EDULIS</i>)	50
4.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	50
4.1.1. <i>Matériel biologique</i>	50
4.1.2. <i>Clonage</i>	50
4.1.3. <i>Transformation</i>	51
4.1.4. <i>Criblage de la banque</i>	53
4.1.5. <i>Séquençage</i>	53
4.2. RÉSULTATS.....	53
4.2.1. <i>Identification et caractéristiques des microsattellites</i>	53
4.2.2. <i>Estimation des densités des microsattellites (AC/GT)<i>n</i> et (AG/CT)<i>n</i></i>	55
4.2.3. <i>Définition des amorces et premières amplifications</i>	57
4.3. CONCLUSION.....	57
5. DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES DU GÉNOME MITOCHONDRIAL CHEZ LES HUÎTRES CREUSES DU GENRE <i>CRASSOSTREA</i>	58
5.1. INTRODUCTION.....	58
5.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	59
5.2.1. <i>Matériel biologique</i>	59
5.2.2. <i>Extraction de l'ADN total</i>	59
5.2.3. <i>Amplification PCR</i>	59
5.2.4. <i>Digestion par enzyme de restriction</i>	59
5.2.5. <i>Migration sur gel d'agarose</i>	60
5.3. RÉSULTATS.....	60
5.3.1. <i>Amplifications</i>	60
5.3.2. <i>Polymorphisme de longueur de fragments de restriction</i>	60
5.4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	62
6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63

RAPPORT D'ACTIVITE DE L'URM 16 POUR L'ANNEE 1995

1. INTRODUCTION

L'URM16 a pour but le développement et l'utilisation de marqueurs hypervariables chez les espèces marines. Elle a été instituée pour permettre le développement des compétences dans le domaine de l'utilisation de ces marqueurs, que ne possédait pas l'IFREMER. Parallèlement, elle officialisait la coopération débutée dès 1994 dans le cadre de l'appel d'offre IFREMER-Biotechnologie entre le laboratoire (GAP) de La Tremblade dirigé par André Gérard et le Laboratoire Génome et Populations (LGP) de l'Université de Montpellier II dirigé par François Bonhomme.

2. FONCTIONNEMENT DE L'URM EN 1995

2.1. BILAN MORAL

L'URM "Genemar" a été créée au 1er janvier 95 avec comme vocation principale la génétique moléculaire des mollusques bivalves (huîtres des genres *Ostrea* et *Crassostrea* principalement) en relation avec les programmes de gestion et d'amélioration génétique (résistance aux pathogènes notamment) développés à l'URGE (La Tremblade) et les intérêts en génétique théorique (origine et fonction de la variabilité génétique dans les populations naturelles) de l'URA 1493 (Montpellier-Sète). Secondairement, l'URM a aussi vocation de soutien à d'autres programmes de génétique sur des espèces d'intérêt aquicole (Crevettes Pénéides, Loup, Tilapias,...) ou halieutique (Sardinelles, Béryx,...).

Une réunion s'est tenue le 4 décembre à la station de Sète pour constater l'avancement des travaux à la fin du premier exercice. Etaient présents F. Bonhomme, P. Boudry, C. Delsert, A. Gérard, S. Launey, Y. Naciri-Graven, M. Ohresser et J.J. Versini. Le bon fonctionnement de l'URM a été reconnu par tous. Sur le plan humain, l'existence de cette structure légère qu'est l'URM aura permis l'accueil à Sète de C. Delsert et de M. Ohresser (post-doctorant U.E. recruté sur contrat de C. Delsert), ainsi que celui de S. Launey pour une période de trois mois (clonage de μsats *Ostrea edulis*), P. Boudry pour deux semaines (ADN mito *Crassostrea*), et V. Vonau du COP pour un mois sur le programme pénéides. F. Bonhomme et Y. Naciri ont participé à quatre journées de cours organisés à la station sur le thème "génétique des organismes marins" dans le cadre du DEA évolution et écologie. Un étudiant de ce DEA (N. Bierne) va d'ailleurs effectuer en 96 un stage co-encadré sur le programme "huître", deux ans après celui de Y. Vigouroux.

2.2. BILAN FINANCIER

Le budget 95 était de 100 KF H.T., réparti en trois versements, un versement initial de 30 KF reçu le 25 septembre, un versement intermédiaire de 40 KF reçu le 26 décembre et un versement final de 30 KF prévu à réception de ce rapport. Malgré les retards dans les transferts de fonds, le système a pu fonctionner grâce à une avance consentie par l'université de Montpellier II en début d'année. L'intégralité des sommes disponibles a été affectée aux compléments d'équipement nécessaires notamment à ce que C. Delsert puisse travailler (environ 50 KF) et à l'accueil de S. Launey et P. Boudry à Sète.

2.3. BILAN SCIENTIFIQUE

Le calendrier prévisionnel a été respecté dans ses grandes lignes. Le bilan des trois principales actions "huître" est donné ci-après dans les trois chapitres rédigés par Y. Naciri-Graven, S. Launey et P. Boudry respectivement. En plus de ces actions, un travail d'analyse des données est en cours avec Y. Vigouroux pour publier un premier bilan des résultats "hétérozygotie croissance" et "déficits en hétérozygotes" chez *O. edulis*. Par ailleurs, en collaboration avec le COP, 10 nouveaux locus microsatellites ont été clonés chez *Penaeus* par L. Ostellari et J.J. Versini (résultats détaillés dans le rapport du programme Biotechnologie). Enfin, la fin de l'année 95 a vu la soutenance des thèses de F. Garcia de Léon sur *D. labrax* (en coll. avec IFREMER-Palavas) et celle de L. Chikhi sur *Sardinella* (en coll. avec l'ORSTOM).

3. ETUDE DU POLYMORPHISME MICROSATELLITAIRE EN PHASE LARVAIRE ET POST-LARVAIRE CHEZ L'HUITRE PLATE *OSTREA EDULIS*.

3.1. INTRODUCTION

Une première expérimentation a été conduite entre Mai et Juin 95 au Laboratoire URGE de La Tremblade pour aborder le problème du polymorphisme microsatellitaire en phase larvaire chez l'huître plate *Ostrea edulis*. La constitution d'une population de larves à partir du croisement d'une cinquantaine d'individus parentaux, puis l'échantillonnage, à différents stades, d'une fraction représentative de cette population (200 larves à chaque fois) pour des mesures individuelles et l'analyse par microsatellite de chaque larve comporte un certain nombre d'intérêts théoriques:

- L'étude de l'évolution du déficit en hétérozygotes dans la population devrait apporter des éléments pour la compréhension des données génétiques observées en populations naturelles.
- Le suivi dans le temps de la relation hétérozygotie-croissance au sein d'une même population (à l'aide des microsatellites) devrait permettre de clarifier les rôles respectifs des marqueurs neutres (microsatellites) et des allozymes, et de séparer relation hétérozygotie-croissance et relation hétérozygotie-poids en cas de phénomènes de compensation.
- L'étude des fréquences alléliques dans la population devrait permettre à terme de déterminer la contribution respective de chaque individu parental et le nombre total de reproducteurs efficaces. Le grand nombre d'allèles observé pour certains locus microsatellites devrait permettre de déterminer avec certitude les parents de chaque individu de la population, la possibilité d'autofécondation (*Ostrea edulis* étant hermaphrodite) pouvant également être examinée.

3.2. MATERIEL ET METHODES.

3.2.1. Géniteurs

Un échantillon d'huîtres plates vivant en eau profonde a été prélevé au large de La Rochelle fin Janvier 1995. Le 3 Mars 1995, cinquante d'entre elles ont été placées dans un bac à fond nu de 100 litres pour une maturation forcée. Au cours de ce conditionnement, la température de l'eau a progressivement augmenté de 10 à 16,6°C du 3 Mars au 4 Avril (1 mois). Afin de permettre la fécondation, les huîtres ont subi, les 5 et 6 Avril, un choc thermique à une température de 20°C avant d'être ramenées à 16,2°C pendant 4 jours. Elles ont ensuite été conditionnées à une température comprise entre 17,3 et 19,7°C. Au cours de ce conditionnement, une mortalité globale de 11 huîtres a été constatée, dont 7 avant le choc thermique. Quatre huîtres ont été sacrifiées en cours d'expérience pour analyse de leur stade physiologique. Sur 50 au départ, 35 ont donc potentiellement participé aux pontes.

3.2.2. Pontes

A la suite des chocs thermiques effectués, six pontes ont pu être observées :

- Le 16 Avril, une ponte de 1 200 000 larves d'un diamètre moyen de 197 μm a été recueillie.
- Le 2 Mai, une ponte de 1 140 000 larves d'un diamètre moyen de 174 μm a été recueillie.
- Le 12 Mai, une ponte de 1 400 000 larves d'un diamètre moyen de 167 μm a été recueillie.
- Le 14 Mai, une ponte de 1 400 000 larves d'un diamètre moyen de 185 μm a été recueillie.
- Le 16 Mai, une ponte de 4 200 000 larves d'un diamètre moyen de 162 μm a été recueillie.
- Le 17 Mai, une ponte de 2 800 000 larves d'un diamètre moyen de 174 μm a été recueillie.

Pour chaque ponte, un échantillon de 300 000 larves a été mis en élevage à une température de 23,2°C et l'évolution de la mortalité des larves et de leur croissance a été suivie jusqu'à la phase de fixation, phase à laquelle les huîtres sont mélangées à de la brisure de coquille afin de disposer d'un support de fixation. Les mesures ne sont alors plus possibles pendant une période d'une douzaine de jours, à la suite de quoi les jeunes huîtres, qui ont alors leur apparence définitive, sont tamisées et poursuivent leur croissance en tamis.

3.2.3. Mesures effectuées

Pour connaître le génotype parentales, les géniteurs ont subi une biopsie au cours de laquelle ont été prélevés des échantillons de branchies.

Pour chaque ponte, un échantillon de 200 larves a été prélevé, chaque larve étant mesurée (le profil de répartition de la taille, donc de la croissance des larves est ainsi disponible), puis stockée individuellement en attendant l'analyse génétique.

3.2.4. Techniques employées

En raison de l'absence de radioactivité au laboratoire, seul un locus microsatellite (Oedu.B0) a été utilisé (Naciri *et al.*, 1995). Ce locus présente en effet l'avantage d'avoir un faible nombre d'allèles, tous visualisables sur gel de polyacrylamide coloré au bromure d'éthyldium.

Deux types d'extractions d'ADN ont été réalisés :

- Une extraction classique au phénol-chloroforme a été pratiquée sur des quantités variables de tissus (ici < 0,2 cm²). Ce type d'extraction a essentiellement été utilisé sur les parents.
- En raison des très faibles quantités de tissus que contiennent les larves, l'utilisation de Chelex (Singer-Sam *et al.*, 1989) a été employée pour l'extraction de l'ADN. La larve est traitée avec 100 ml de Chélex 5% pendant une nuit à 56°C; la solution est ensuite chauffée à 95-100°C pendant 15 min, avant d'être centrifugée pendant 5 min. C'est le surnageant contenant l'ADN qui est directement récupéré pour la PCR.

Une fois l'ADN extrait et grossièrement dosé, le polymorphisme des individus pour le locus Oedu.B0 a été obtenu par réaction PCR classique.

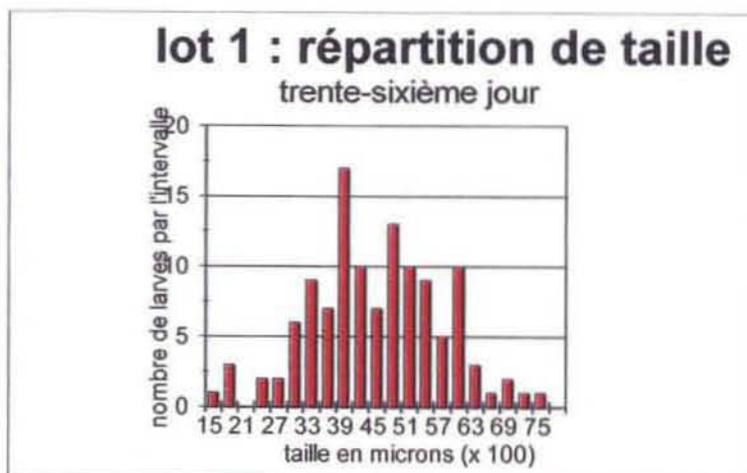
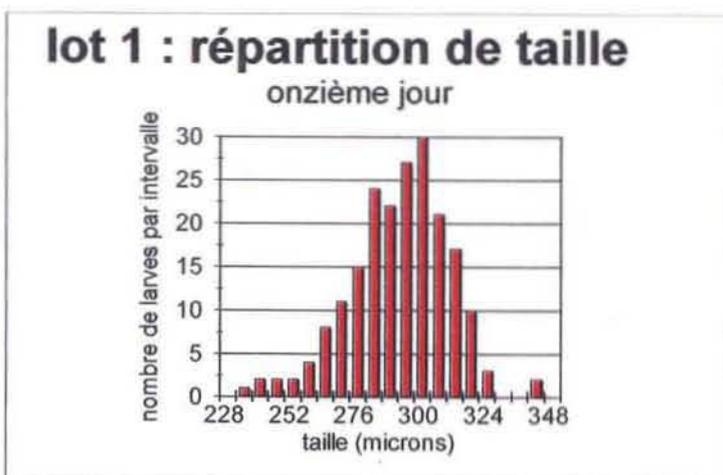
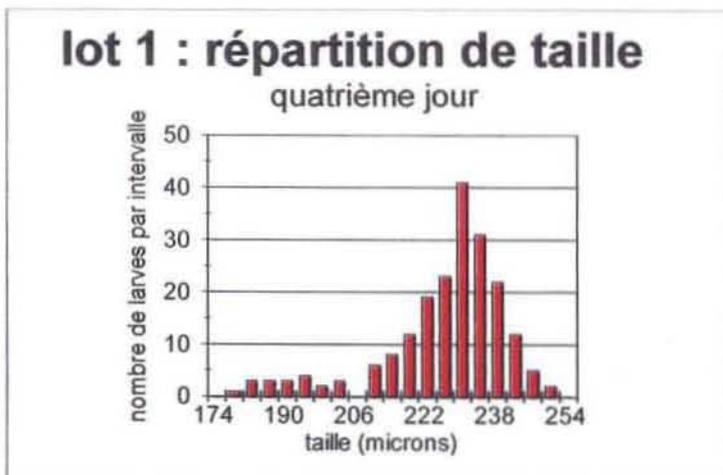
3.3. RESULTATS

3.3.1. Mesures de larves

Plusieurs séries d'échantillonnages et de mesures ont été effectuées pour les six pontes successives. Toutes les pontes ont atteint la phase de fixation. Le 20 Mai cependant, l'assèchement accidentel de l'un des bacs contenant différents lots de post-larves a conduit dans un premier temps à la mort de ses occupantes. Alors que les dégâts semblaient limités, la vague

de mortalité s'est étendue aux autres bacs de la salle de micronurserie. Seuls les lots 1 et 3 ont pu donner lieu à un échantillonnage après fixation. Pour les autres lots, seules les données avant fixation sont disponibles. La figure 1 présente les profils de taille obtenus pour le lot 1.

Fig 1 Suivi de la répartition des tailles au sein de la population de larves du lot 1, analyses effectuées sur des échantillons de 200, 200 et 100 larves respectivement.



3.3.2. Premiers résultats sur le polymorphisme des populations

En raison de difficultés rencontrées, dues au transfert de la technique d'analyse par PCR des locus microsatellites au laboratoire, nous avons décidé dans un premier temps d'analyser le polymorphisme microsatellitaire de la population parentale qui posait moins de problèmes de qualité d'extraction, pour enchaîner ensuite par l'analyse des populations larvaires.

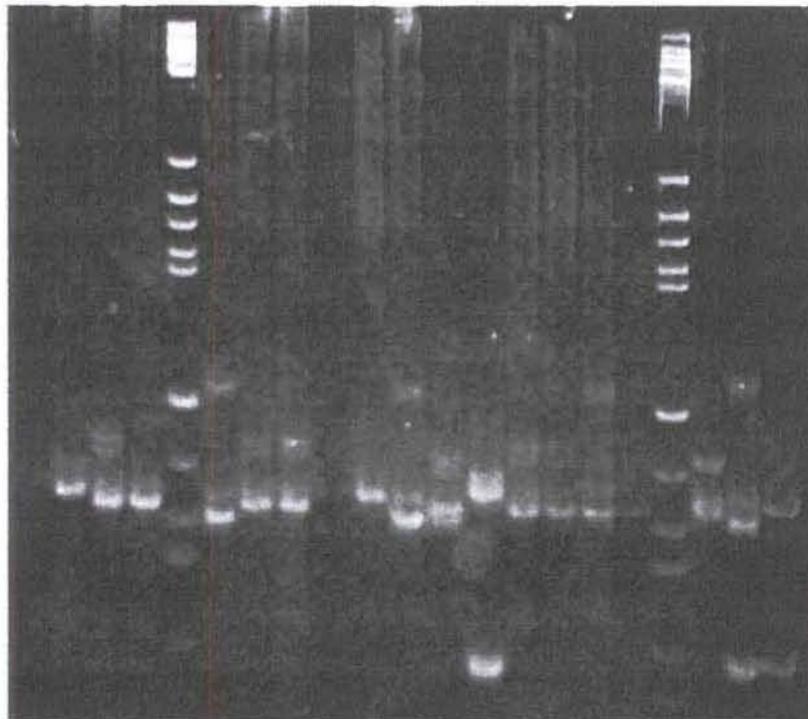
Population parentale

Le polymorphisme de 35 parents a été déterminé pour le locus Oedu.B0. Une partie des résultats est présentée Figure 2. Sept motifs différents ont été reconnus, pour 4 des 5 allèles répertoriés dans Naciri et al. (1995). Les fréquences respectives des allèles 90 pb, 93 pb, 96 pb et 99 pb sont de 8.6%, 31.4%, 44.3% et 15.7%. L'allèle 102 n'a pas été retrouvé dans cette population. La matrice des génotypes est donnée dans le Tableau 2.

Tab 2. Matrice génotypique sur les 35 individus analysés. Les effectifs attendus en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg sont indiqués entre parenthèses.

	90	93	96	99
90	0 (0.22)			
93	1 (1.91)	4 (3.35)		
96	5 (2.70)	12 (9.88)	2 (6.74)	
99	0 (0.96)	1 (3.51)	10 (4.94)	0 (0.80)

Fig 2. Gel de migration sur acrylamide. Parents LR25 à LR44. En piste 1 : individu hétérozygote 96-99, en piste 2 : individu hétérozygote 93-96, en piste 5 : individu hétérozygote 90-96, en piste 11 : individu 90-93, en piste 15 : individu 93-99, en piste 16 : individu homozygote 93-93. Il n'y a aucun individu homozygote pour l'allèle 96 sur ce gel.



L'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé en utilisant le logiciel GENEPOP (Raymond et Rousset, 1994). Du fait du faible effectif de la population, le test exact de Fisher a été mis en oeuvre. Le Fis calculé ($Fis = (fréq. \text{ obs.} - fréq. \text{ att.}) / fréq. \text{ att.}$) est égal à -0.217 et

la probabilité d'obtenir une telle valeur en supposant l'équilibre de Hardy-Weinberg est de 1.57%. Avec un risque de première espèce de 5%, on peut donc rejeter l'hypothèse d'équilibre et le signe du Fis indique qu'il y a un excès en hétérozygotes dans la population parentale.

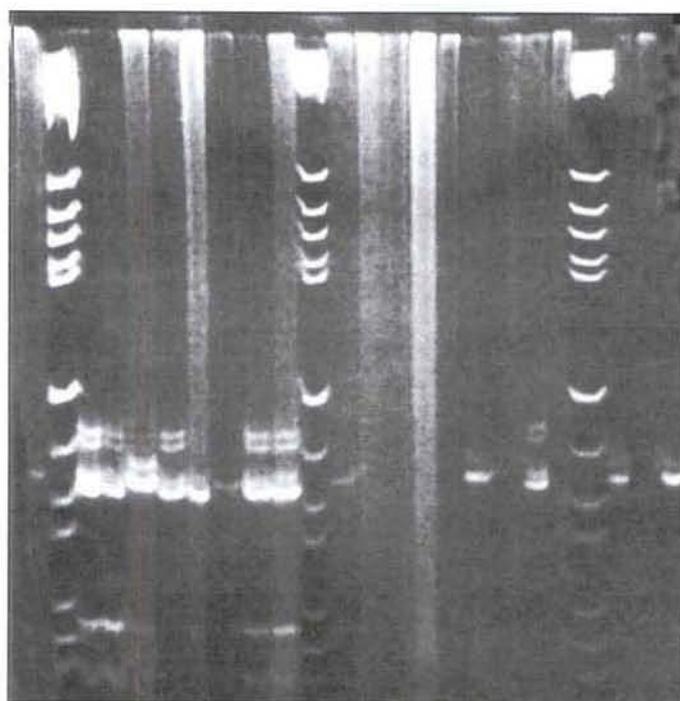
Population post-larvaire (3ème ponte)

En raison des difficultés rencontrées pour l'amplification d'ADN à partir de larves, un essai a été fait sur une population plus âgée (post-larves, taille moyenne de 4.06 ± 1.96 mm). Des résultats préliminaires sont présentés Figure 3. Malgré le faible nombre d'amplifications obtenues (17 individus seulement), un traitement statistique par GENEPOP a été effectué. Les fréquences alléliques dans la sous-population étudiée sont respectivement pour les allèles 90, 93, 96 et 99 de 0%, 26.5%, 61.7% et 11.8%. La matrice génotypique est reproduite dans le Tableau 3 et le Fis obtenu est de -0.405 ($p=0.134$). Bien que l'hypothèse de l'équilibre ne puisse être rejetée au risque α de 5%, une tendance à un excès en hétérozygotes est néanmoins relevée. La petite taille de l'échantillon doit cependant faire prendre ces résultats avec précaution.

Tab 3. Matrice génotypique sur les 17 individus analysés. Les effectifs attendus en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg sont indiqués entre parenthèses.

	90	93	96	99
90	0 (0.00)			
93	0 (0.00)	0 (1.19)		
96	0 (0.00)	9 (5.56)	4 (6.47)	
99	0 (0.00)	0 (1.06)	4 (2.55)	0 (0.24)

Fig 3. Gel de migration sur acrylamide. Post-larves de la 3ème ponte. En piste 1 : individu homozygote 96-96, en piste 3 : individu hétérozygote 93-96, en piste 5 : individu hétérozygote 96-99, en piste 11 : individu 90-93, en piste 15 : individu 93-99, en piste 16 : individu homozygote 93-93. Il n'y a aucun individu homozygote pour l'allèle 96 sur ce gel.



3.4. DISCUSSION

3.4.1. Optimisation des techniques

Une amélioration des techniques d'analyse a été obtenue au fur et à mesure des expériences. La bonne visualisation des bandes sur le dernier gel en est la preuve (Figure 3). Cependant, l'étude des larves avant fixation n'est toujours pas accessible dans l'état actuel de l'optimisation réalisée. Plusieurs voies d'amélioration sont possibles :

- Une meilleure conservation des larves devrait permettre d'obtenir une meilleure qualité de l'ADN. Il s'agit de s'assurer que les enzymes digestives sont inactivées en effectuant une congélation plus rapide des échantillons après immersion dans de l'éthanol absolu.
- Il semblerait que dans un premier temps, la technique d'extraction au phénol-chloroforme soit préférable à celle au Chelex : le phénol a en effet comme propriété d'inactiver les enzymes et cela permettrait peut-être de réduire la dégradation de l'ADN qui a été relevée dans la plupart des échantillons. Les résultats positifs obtenus sur les post-larves du lot 3 sont encourageants à cet égard.

Ces améliorations n'ont pas encore toutes été testées mais vont faire l'objet des prochaines expérimentations menées au laboratoire.

3.4.2. Analyse de la croissance et du développement des différents lots

La comparaison en croissance des 6 lots confirme l'homogénéité des élevages (cuves identiques, même milieu de culture : eau de mer chauffée, même bullage); les courbes d'évolution permettent en effet de suivre les différences entre les pontes, et leur similarité prouve qu'aucune ponte n'a subi d'évolution anormale. Nous nous retrouvons donc dans des conditions expérimentales intéressantes pour une étude comparative des populations. Les fortes mortalités visibles sur les courbes de survie montrent des évolutions normales et représentatives des mortalités habituellement obtenues en éclosion.

L'évolution de la répartition en tailles des larves au sein d'une même ponte (Figure 1) permet de faire deux remarques intéressantes :

- Les deux premiers histogrammes (quatrième jour et onzième jour) présentent un aspect de «gaussienne à queue»; ces «queues» pourraient être constituées de larves non viables. En effet, la stratégie de reproduction de l'huître est plus une stratégie de quantité que de qualité et une grande part des larves d'huîtres présentent des anomalies génétiques (aneuploidie en particulier) qui les handicapent dans leur développement. Signalons toutefois que l'huître plate *Ostrea edulis* fabrique environ 10 fois moins d'ovules que l'huître creuse *Crassostrea gigas*, qui par contre ne nurse pas les larves pendant 10 jours dans la cavité palléale.
- La variabilité en taille de la population semble augmenter avec le temps; cela est particulièrement visible pour la répartition des tailles au trente-sixième jour soit après fixation (troisième histogramme) mais le phénomène s'amorce dès le stade larvaire. Or les conditions d'élevage au sein d'une même population sont

très homogènes (bullage permettant le mélange jusqu'à la fixation, puis homogénéisation des tamis de fixation tous les jours lors du nettoyage). Si l'influence du milieu s'avère être effectivement aussi homogène entre individus, cette variabilité interne de la population pourrait donc être déterminée par la variabilité génétique de la population, mais cela reste bien entendu à démontrer.

3.4.3. Les enjeux scientifiques de cette étude

L'étude de la relation hétérozygotie-croissance n'a pas pu être abordée dans le cadre de ce stage, faute de résultats suffisants sur les larves et post-larves. Seule une première étude du déficit en hétérozygotes a pu être effectuée. Nous sommes bien sûr conscients de n'avoir travaillé que sur un seul marqueur et qu'il n'est bien entendu pas imaginable de généraliser les résultats obtenus à l'ensemble du génome.

Cependant, l'étude des adultes nous livre des renseignements intéressants bien qu'incomplets sur l'étude du déficit en hétérozygotes. En effet, le pourcentage d'homozygotes (17.1 %) est faible en regard du pourcentage théorique attendu (31.7 %). Bien qu'il ne s'agisse pas du même type de marqueur, ces résultats corroborent ceux obtenus sur l'évolution du déficit en hétérozygotes aux locus enzymatiques. Par ailleurs, des résultats non publiés Vigouroux (1994) montrent qu'il existe, sur du naissain de 6 mois, des déficits en hétérozygotes importants voire très importants (de 10 à 40%) sur les 3 locus microsatellites étudiés. Bien que les deux analyses n'aient pas été effectuées sur les mêmes populations, les résultats obtenus semblent montrer, comme pour les enzymes, une réduction du déficit en hétérozygotes en fonction de l'âge. Si ce phénomène est confirmé sur un nombre plus important de locus microsatellites, l'hypothèse d'une contre-sélection aux stades jeunes des hétérozygotes (au niveau du génome dans sa totalité et non plus aux locus enzymatiques seulement) suivie d'un effet contraire aux stades ultérieurs devrait se trouver renforcée. L'influence de l'aneuploïdie (Thiriot-Quévieux *et al.*, 1988) peut aussi donner des résultats similaires mais la tendance ne devrait se manifester que pour certains marqueurs (ceux portés par le chromosome manquant).

Toutes ces hypothèses nécessitent bien entendu de plus amples expérimentations. Les résultats provisoires obtenus sur les post-larves du lot 3 semblent au contraire indiquer une tendance à un déficit en homozygotes contrairement à ce qui a été observé sur le naissain naturel de 6 mois. Deux explications peuvent être fournies. En premier lieu, ces résultats sont peut-être imputables aux conditions contrôlées dans lesquelles les élevages ont été menés. En effet, certaines études ont montré l'absence de déficits en hétérozygotes pour les locus enzymatiques sur du naissain en provenance d'écloserie. la seconde explication tiendrait au fait que seul un petit nombre d'individus auraient pondu pour le lot étudié : la ponte ne correspondrait alors pas à une situation de panmixie et il n'y a donc pas de raison d'observer l'équilibre de Hardy-Weinberg.

3.5. CONCLUSION

Des expériences préliminaires ont été effectuées sur le polymorphisme en phase larvaire au cours de l'année 1995. En l'état actuel des choses, la phase larvaire proprement dite (avant métamorphose) n'a pas été étudiée en raison de problèmes liés à la la bonne conservation de l'ADN des larves dont la taille varie alors entre 170µm à 300µm. Des expérimentations plus poussées sont donc nécessaires pour définir des conditions de bonne conservation compatibles avec les manipulations des larves (mesure en particulier). En effet, pour avoir accès à la

relation hétérozygotie croissance, il est nécessaire d'immobiliser les larves, c'est-à-dire de les tuer, pour pouvoir relever leur taille, ceci avant d'en extraire l'ADN. Plusieurs solutions sont d'ores et déjà envisagées.

Malgré les problèmes rencontrés, des données ont été récoltées sur des post-larves ainsi que sur un échantillon des géniteurs. La population parentale n'est pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg et un excès significatif en individus hétérozygotes a été relevé. De tels résultats sont compatibles avec ceux obtenus par allozymes sur des adultes. Par contre l'étude d'une population de post-larves a montré également un faible excès en hétérozygotes, ce qui était moins prévisible au regard des résultats déjà obtenus sur des juvéniles. Ceci peut être lié soit aux conditions expérimentales soit à un nombre de géniteurs effectifs trop réduit qui ne traduirait pas des conditions de panmixie.

Tous ces résultats ont été obtenus sur un seul locus microsatellite et il serait bien entendu dommageable de vouloir tirer des conclusions définitives de cette étude.

4. DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS MOLECULAIRES CHEZ L'HUITRE PLATE (*OSTREA EDULIS*)

L'élevage de l'huître plate (*Ostrea edulis*) a été considérablement affecté par l'apparition successives de deux parasites, *Marteilia refringens* au début des années 1970, puis *Bonamia ostreae* au début des années 1980. Un programme de sélection pour la résistance à *Bonamia ostreae* a été engagé par IFREMER depuis 1985 (Martin *et al.*, 1993). Récemment, le laboratoire URGE (La Tremblade) en collaboration avec le laboratoire Génome et Population (CNRS - Montpellier) a commencé un travail d'identification de marqueurs moléculaires dans trois buts principaux : étudier le polymorphisme des populations sélectionnées, réaliser un début de cartographie du génome de l'huître plate et, à terme, identifier d'éventuels marqueurs de la résistance.

L'effort de recherche a été axé sur les marqueurs microsatellites. Ces marqueurs, constitués de répétitions en tandem de motifs simples (de 2 à 5 paires de bases), ont été choisis pour leur fort taux de polymorphisme attendu, leur facilité de détection par la technique de PCR, et leur probable distribution dans tout le génome.

Une première banque génomique a été réalisée en 1993-1994 par Yamama Naciri, conduisant à l'identification de 12 locus microsatellites (Naciri *et al.*, 1995). Trois de ces locus ont pu être utilisés en routine. Afin d'augmenter le nombre de marqueurs potentiellement utilisables, une deuxième banque a été construite et criblée, lors d'un séjour de trois mois (en cours) de Sophie Launey au laboratoire Génome et Populations, dans le cadre de l'URM n°16 (GENEMAR). Ce travail a été réalisé avec l'aide de Claude Delsert, chercheur rattaché à l'URGE.

4.1. MATERIEL ET METHODES

4.1.1. Matériel biologique

L'ADN a été extrait à partir d'un unique individu. Après élimination de la glande digestive, les tissus (branchies + manteau + muscle) ont été broyés dans l'azote liquide puis récupérés dans 50 ml de tampon d'extraction (Tris 50 mM, EDTA 125 mM, SDS 0.1%). Après ajout de 1 ml de NaCl 5M et 0.5 ml de protéinase K (10 mg/ml), le mélange a été mis en incubation toute une nuit à 55°C.

Après une rapide centrifugation destinée à éliminer les plus grosses particules, un demi-volume de phénol a été ajouté. Après quelques minutes d'agitation douce, un demi-volume de chloroforme a été ajouté. Après une centrifugation à 2000 tr/min pendant 15 minutes, le surnageant a été prélevé et l'ADN a été précipité à l'isopropanol (isovolume) pendant 2 heures à -20°C. Une centrifugation "moyenne vitesse" (9000 tr/min) pendant 30 minutes a permis d'obtenir un culot d'ADN, lequel, après lavage à l'éthanol 70 et séchage, a été repris dans de l'eau distillé et dosé au spectrophotomètre.

4.1.2. Clonage

Deux techniques de clonages ont été utilisées.

Clonage I

Il s'agit d'un clonage en blunt, reproduisant la technique utilisée par Yamama Naciri lors de la réalisation de la première banque.

Après digestion de l'ADN par AluI, RsaI et HaeIII (10 U de chaque pour 25 µg d'ADN), et migration sur gel d'agarose à 2%, les fragments de 400 à 800 pb ont été récupérés par électroélution, utilisant du papier chromatographique DE81 (Whatman). Après élution, les fragments ont été traités au phénol-chloroforme et précipités à l'isopropanol. La taille des fragments récupérés a été contrôlée sur minigel d'agarose.

Le plasmide utilisé pour la ligation est le pBluescript II KS- (Stratagene), digéré par SmaI et, pour empêcher la recircularisation, déphosphorilé à la CIP (Calf Alkaline Phosphatase) selon le protocole d'Eurogentec. La ligation a été effectuée à 4°C pendant toute une nuit, en utilisant 100 ng de plasmide et des quantités d'ADN variant entre 100 et 300 ng, avec 1 µl de T4 DNA Ligase Haute concentration (600 U/µl, Eurogentec.).

Clonage II (clonage en bouts collants)

L'ADN a été digéré par Bsp143I (Eurogentec, isoschizomère de Sau3A) (250 U pour 25 µg d'ADN), et les fragments d'une taille comprise entre 400 et 800 pb ont été récupérés de la même façon que précédemment. Ces fragments ont été ensuite traités à la Klenow en partial filling, avec seulement deux nucléotides (dATP et dGTP).

Le plasmide utilisé est le pBluescript II KS+ (Stratagene), digéré par XhoI, et traité également à la Klenow en partial filling, avec les seuls nucléotides dCTP et dTTP. (voir figure 4).

L'intérêt de ce protocole est triple:

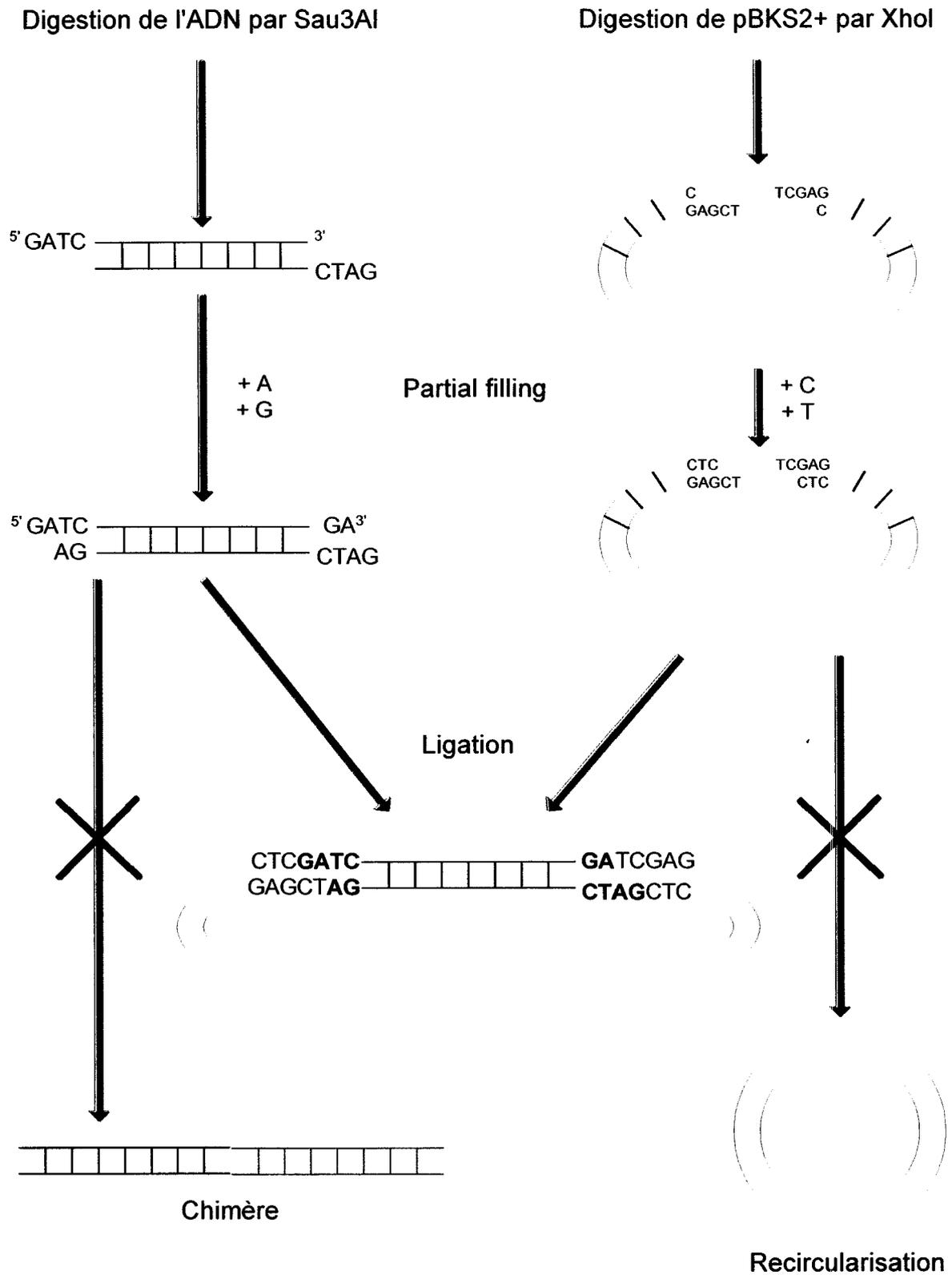
- les extrémités du plasmide et des fragments d'ADN sont complémentaires.
- le plasmide ne peut plus se refermer sur lui-même (d'où un plus fort pourcentage de clones recombinants)
- les fragments d'ADN ne sont pas complémentaires entre eux (pas de risques d'apparition de chimère, c'est à dire de fragments composés en fait de deux fragments qui n'étaient pas voisins dans le génome.).

La ligation a été effectuée à 4°C pendant toute une nuit, en utilisant 50 ng de plasmide et des quantités d'ADN variant entre 100 et 400 ng, avec 1 µl de T4 DNA Ligase Haute concentration (600 U/µl, Eurogentec.).

4.1.3. Transformation

Des cellules de *E. Coli* (DH5α, souche K12) ont été rendues compétentes par lavage au CaCl₂ 0,1M à froid, et transformées avec les plasmides potentiellement recombinants, sur milieu 2XYT, contenant de l'IPTG et du Xgal. Les colonies contenant un insert sont repérables à leur coloration blanche, due à la rupture d'un gène participant à l'activité de la β-galactosidase. L'IPTG est l'inducteur du promoteur de cette enzyme, et le Xgal est son substrat; il se colore en bleu quand l'activité enzymatique est préservée.

Figure 4 : Schématisation de la technique de clonage en bouts collants (clonage II)



4.1.4. Criblage de la banque

Les clones recombinants ont été repiqués individuellement puis transférés sur une membrane de nylon (Biodyne A). La librairie ainsi constituée a été criblée avec un mélange équimolaire de trois sondes dinucléotidiques : (dAdC)_n/(dTdG)_n, (dAdG)_n/(dTdC)_n, (dAdT)_n/(dTdA)_n (Pharmacia). Ces sondes ont été marquées au $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP par random priming (Kit Gibco BRL). L'hybridation a été effectuée en milieu 5X SSC, 0.1% SDS, 5% Denhardt, à 65°C.

Des essais de criblage ont été effectués avec des sondes trinuécléotidiques ((TGT)₈, (TCT)₈, (TAT)₈, (TAG)₈) et tétranucléotidiques ((TACT)₇, (TTAT)₇ et (ACTC)₇). Ces sondes oligonucléotidiques ont été marquées par kination en 5' avec du $\gamma^{33}\text{P}$ ATP. L'hybridation a été effectuée en milieu 5X SSC, 0.1% SDS, 5% Denhardt, à 42°C. Les clones positifs après criblage ont été repiqués, puis mis en culture en milieu liquide, et l'ADN en a été extrait par minipréparation (lyse alcaline).

4.1.5. Séquençage

La séquence des clones positifs a été déterminée par la technique du séquençage alcalin double brin (Sanger et al., 1977, Sambrook et al., 1989), à l'aide du Kit de séquençage T7 (Pharmacia), en utilisant le primer universel T7 et le primer M13 reverse. Chaque fois que cela a été possible, des amorces ont été déterminées autour de la séquence microsatellite, à l'aide du logiciel Primer. En raison d'une taille un peu élevée des inserts, il a parfois été nécessaire de déterminer une amorce interne en amont du microsatellite et de refaire une réaction de séquence.

4.2. RESULTATS

4.2.1. Identification et caractéristiques des microsatellites

clonage I (en blunt)

Un nombre total de 3639 clones a été repiqué, d'une taille moyenne de 650 pb. En supposant que chaque insert est unique, la taille du génome ainsi criblée a été estimée à 2300 kb. En se basant sur une moyenne des tailles du génome chez deux autres espèces du genre *Ostrea* (Hinegardner, 1974), il est possible d'estimer la taille du génome haploïde d'*Ostrea edulis* à 1100 Mb; la librairie étudiée représente alors 0.2% du génome.

Le criblage à l'aide des sondes dinucléotidiques a permis l'identification de 24 clones positifs (soit 0,65 % des clones). Dix-huit ont été séquencés à ce jour. Onze clones contenaient un microsatellite, et deux clones contenaient deux microsatellites. Sur les 15 microsatellites mis en évidence, 6 sont constitués de motifs dinucléotidiques purs (type (AC/GT)_n ou (AG/CT)_n), un est constitué d'un motif dinucléotidique impur, 7 sont des motifs composés, et un est un tétranucléotide.

clonage II (en bouts collants)

Un nombre total de 4259 clones a été repiqué, d'une taille moyenne de 650 pb. La taille de la portion de génome ainsi criblée est évaluée à 2700 kb, soit 0.25% du génome.

Le criblage par les sondes dinucléotidiques a permis de mettre en évidence 19 clones positifs

(soit 0.45 % des clones). Dix-huit ont été séquencés à ce jour. Onze clones contenaient un microsatellites, et un clone en contenait deux. Sur les 13 microsatellites mis en évidence, 7 sont des motifs dinucléotidiques purs, 1 est un motif dinucléotidique impur, 4 sont des motifs composés, et un est un motif trinucléotide.

Les caractéristiques des différents microsatellites identifiés sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Caractéristiques des microsatellites identifiés.

Nom du locus	Motif	Clonage	Amorces	Amplification
J12	(GT) ₁₄	II	O	
F2	(GT) ₁₄	II	S	
I9	(CA) ₂₆	II	O	OK (N)
T5	(CA) ₁₅	II	O	OK (P)
B16	(GT) _n	II	S	
B113	(GA) ₂₂	II	O	
G11	(AT) ₂₀	II	O	OK (P)
W18	(GT) ₂₄ ·(GTGTGC) ₆ (GT) ₄₁	II	O	
G9	(AT) ₄ (GT) ₃₅	II	O	OK (P)
Z44	(AT) ₆ (GT) ₁₄	II	N	
M14	(TA) ₂₀ (CA) ₁₃	II	S	
R9	(CT) ₂₇ C(CA) ₁₉	II	O	
D1	(AGG) ₅	II	O	
P7	(AC) ₂₀	I	O	OK (P)
K7	(CT) ₂₈	I	O	OK (P)
O9	(GA) ₃₆	I	O	
E10	(AG) _n	I	S	
T18	(CT) ₂₁	I	S	
D8	(GA) ₂₄	I	O	
I22	(CT) ₁₁ CCC(CT) ₆	I	N	
H10	(CA) ₁₈ (TA) _n	I	S	
G12	(CA) ₂₆ (TA) ₃	I	S	
O3	(TA) ₈ (GA) ₂₆	I	N	
N8	(AT) ₈ ·(AT) ₂₂ ·(CT) ₂₆	I	O	OK (P)
P8	(TA) ₇ (GA) ₂₂	I	S	
E8	(AT) ₁₇ AC(AG) ₂₃	I	S	
U2	(AC) _n (AG) _n	I	S	
H15	(ATCT) _n (dégradé)	I	O	

O: Amorces définies autour du microsatellite

N: site d'insertion trop près du microsatellite pour définir des amorces

S: en cours de séquençage

OK: amplification sur quelques individus, montrant du polymorphisme (P) ou non (N)

Les essais d'hybridation avec les sondes tri et tétranucléotidiques n'ont pas été concluants, probablement faute d'avoir trouvé les bonnes conditions d'hybridation.

4.2.2. Estimation des densités des microsatellites (AC/GT)_n et (AG/CT)_n

Les calculs de densité ont été effectués sur les microsatellites de types (AC/GT)_n et (AG/CT)_n, avec une méthode comparable à celle utilisée par Naciri *et al.* (1995) à partir de la première banque. On considère pour ces calculs que les motifs composés sont constitués en fait de deux microsatellites accolés. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Comparaison des résultats de clonage et des estimations de densité des microsatellites entre les 2 banques réalisées sur *Ostrea edulis*.

	Banque 1993 (Naciri <i>et al.</i> , 1995)		Banque 1995			
			Clonage I		Clonage II	
Nb de clones criblés	3560		3639		4259	
Taille moyenne des inserts	195		650		650	
Taille du génome criblé	700 kb		2300 kb		2700 kb	
% du génome criblé	0,064%		0,2%		0,25%	
% de clones positifs	0,6%		0,65 %		0,45 %	
Nb de μ satellites identifiés	12		15		13	
(AC/GT) _n	5		4		11	
Nb estimé et densité	7900	139 Kb *	2000	550 Kb	4400	250 Kb
(AG/TC) _n	8		11		2	
Nb estimé et densité	12700	87 Kb	5500	200 Kb	800	1375 Kb
Nb total estimé et densité	20600	54 Kb	7500	146 Kb	5200	200 Kb

*: distance moyenne estimée entre deux microsatellites

Ces résultats sont intéressants à deux titres:

1. il y a tout d'abord une grande différence, dans la banque réalisée en 1995, entre les types de motifs mis en évidence par les deux techniques de clonage utilisées. Dans le cas du clonage I, on a surtout révélé des motifs du type (AG/CT)_n, ce qui était également le cas lors du criblage de la banque réalisée par Yamama Naciri avec la même technique. Par contre, lors du clonage II, ce sont surtout les motifs du type (AC/GT)_n qui ont été révélés.

Il est difficile de donner une explication. On peut noter les différences essentielles entre les deux types de clonage. On peut noter que les sites de coupure ne sont pas les mêmes selon les enzymes de restriction utilisées (voir tableau 6)

Tableau 6: Sites de restriction des différentes enzymes utilisées.

	Enzyme	Site de restriction
Clonage I	<i>AluI</i>	AG ∇ CT
	<i>HaeIII</i>	GG ∇ CC
	<i>RsaI</i>	GT ∇ AC
Clonage II	<i>Sau3A</i>	∇ GATC

De plus, dans le cas du clonage I, la digestion enzymatique n'a été que partielle, mais a tout de même permis de couper la quasi totalité du génome en fragments compris entre 400 et 800 pb. On aurait donc une bonne représentativité du génome dans les

fragments clonés. Par contre, dans le cas du clonage II, et malgré une digestion complète, les fragments compris entre 400 et 800 pb ne représentaient qu'une fraction du génome.

Si ce paramètre s'avère effectivement déterminant, une estimation correcte du ratio entre les motifs (AC/GT)_n et (AG/CT)_n peut être donnée en combinant les résultats du clonage I à ceux obtenus par Naciri *et al.* (1995); ce ratio serait de 1 motif (AC/TG)_n pour 3 motifs (AG/TC)_n. On peut noter que c'est le ratio inverse de ce qui a été trouvé chez les vertébrés (homme, rat ou truite, Beckman and Weber, 1992; Estoup *et al.*, 1993.)

2. Il est étonnant de voir une différence aussi grande, entre les deux banques génomiques, dans les estimations du nombre et de la densité des motifs microsatellites dans le génome. La différence essentielle entre les deux banques tient au choix de la taille des fragments. Il est possible alors que l'on n'ait pas criblé la même population de microsatellites, et qu'il y ait davantage de "petits" microsatellites que de "grands".

Il est fréquent de trouver, dans les génomes humains et porcins, des microsatellites avec moins de 12 répétitions (Weber, 1990; Wintero *et al.*, 1992.). Si c'est le cas également chez *Ostrea edulis*, il est possible que dans le travail présenté ici, la grande taille des fragments n'ait pas permis la détection de ces motifs, et que l'on ait donc sous-évalué le nombre de microsatellites potentiels et leur densité dans le génome.

La distance réelle entre deux microsatellites (de type (AC/GT)_n ou (AG/CT)_n) dans le génome d'*Ostrea edulis* doit se situer entre 54 Kb et 146 Kb. En l'absence de données analogues chez d'autres mollusques, et à titre de comparaison, les résultats obtenus chez d'autres animaux (vertébrés) et chez une plante sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7: Distance en Kb entre les motifs microsatellites, estimée chez différents organismes.

	(AC/GT) _n	(AG/CT) _n	Total
Homme (Stallings <i>et al.</i> , 1991; Beckmann & Weber, 1992)	30-50	115	
Rat (Beckmann & Weber, 1992)	15	30	
Chien (Rothuizen <i>et al.</i> , 1994)	42		
Porc (Wintero <i>et al.</i> , 1992)	46		
Truite commune (Estoup <i>et al.</i> , 1993)	23	76	
Huître plate (Naciri <i>et al.</i> , 1995)	139	87	54
Huître plate (cette étude)	550	200	146
Riz (Wu & Tanksley, 1993)	480	225	150

On peut espérer dans un futur proche, la parution d'études utilisant des microsatellites chez d'autres mollusques (en particulier *Crassostrea gigas*); nos résultats pourront alors être réexaminés à la lumière de ces nouvelles informations.

4.2.3. Définition des amorces et premières amplifications.

A l'aide du logiciel Primer, nous avons défini des couples d'amorces pour 15 microsatellites. (voir Tableau 1). Pour trois autres microsatellites (Z44, I22 et O3), il n'a pas été possible de définir des amorces en raison de la trop grande proximité du site d'insertion. Pour les autres, le séquençage est encore en cours.

Les premières amplifications ont été tentées avec 7 couples d'amorces (microsatellites I9, T5, G9, G11, P7, K7 et N8), sur l'ADN de trois individus (ADN extrait à partir d'une biopsie de branchie, par une technique équivalente à celle présentée au paragraphe I.1). Les PCR ont été réalisées dans un volume de 25 μ L dans des conditions standards (1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de chaque dNTP, 20 pmol de chaque amorce, 0.2 U GoldStar Polymérase (Eurogentec)), à des températures d'annealing de 45°C ou 50°C selon les locus. Le contrôle de l'amplification se fait après migration sur minigel d'agarose 2%, par coloration au BET (Bromure d'Ethidium)

Pour tous les locus, des amplifications satisfaisantes (une bande unique ou deux bandes proches) ont été obtenues. De plus, ces résultats préliminaires semblent indiquer l'existence de polymorphisme à tous les locus à l'exception du locus I9. La prochaine étape consistera à évaluer le polymorphisme réel de tous ces loci, en analysant un plus grand nombre d'individus et en utilisant des techniques de visualisation plus résolutive (migration sur gel de polyacrylamide dénaturant après marquage radioactif d'une amorce).

4.3. CONCLUSION

Le séjour de Sophie Launey au Laboratoire Génome et Population, dans le cadre de l'URM n°16, a permis d'atteindre l'objectif initial qui était d'augmenter le nombre de marqueurs moléculaires utilisables chez l'huître plate. En effet, alors même que l'exploitation de la banque génomique est encore en cours, 25 nouveaux microsatellites potentiellement utilisables ont été identifiés. Les premiers essais d'amplification, avec un succès de 100%, laissent espérer que le nombre de locus effectivement utilisables en routine ne sera pas très éloigné de 25. Avec les résultats déjà obtenus (Naciri *et al.*, 1995), on peut espérer avoir entre 20 et 30 microsatellites polymorphes utilisables. Il est alors tout à fait envisageable d'utiliser ces marqueurs pour la réalisation d'un début de carte de liaison du génome d'*Ostrea edulis*, sachant que celle-ci n'a que 10 chromosomes (2N=20).

La mise au point des amplifications va se poursuivre au cours de l'année 1996 et la première utilisation des marqueurs microsatellites sera l'évaluation de la variabilité génétique dans les populations d'huîtres plates sélectionnées pour la résistance à *Bonamia*, en comparaison avec des populations issues du milieu naturel.

5. DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS MOLECULAIRES DU GENOME MITOCHONDRIAL CHEZ LES HUITRES CREUSES DU GENRE *CRASSOSTREA*

5.1. INTRODUCTION

La recherche de marqueurs moléculaires du génome mitochondrial chez les huîtres creuses du genre *Crassostrea* est en lien direct avec le développement du conservatoire de souches d'huîtres creuses, implanté au sein de l'Unité de Recherche en Génétique (Station IFREMER de La Tremblade). Celui-ci a pour principaux objectifs les points suivants :

- L'étude des potentialités d'acclimatation dans les eaux françaises d'huîtres de différentes espèces, afin de pouvoir identifier celle qui pourrait se substituer à *Crassostrea gigas* en cas d'épizootie majeure ou pour une diversification des productions.
- L'étude des possibilités d'hybridations inter-spécifiques au sein de genre *Crassostrea*, et l'étude des performances (croissance, fertilité) des hybrides obtenus.
- L'étude de la différenciation génétique (intra- et inter-spécifique) au sein du genre *Crassostrea*, à l'aide marqueurs génétiques (allozymes et marqueurs de l'ADN nucléaire et mitochondrial). Ces travaux servent de base à la mise au point de marqueurs diagnostiques d'espèces ou de souches géographiques. Ces marqueurs sont souhaités par la profession ostréicole afin de venir en appui en cas d'importations frauduleuses. On peut citer à titre d'exemple les résultats obtenus par Brown et Paynter en 1991, qui montrent une forte différenciation entre populations sauvages et stocks ("domestiqués") dans la baie de Chesapeake, USA.

La stratégie qui a été privilégiée jusqu'à présent repose sur la recherche de polymorphisme de fragments de restriction dans des fragments amplifiés par PCR. Cette méthode a été notamment choisie pour les raisons suivantes :

- La technique est "relativement légère" (comparativement aux R.F.L.P. sur ADN mitochondrial purifié comme utilisé par Brown et Paynter, 1991), donc applicable à de grands échantillons (études "en population", contrôles d'importations...).
- La possibilité de mise en oeuvre au sein du laboratoire de La Tremblade (machine PCR et table U.V étant disponibles).
- La "compatibilité" (collection des ADN totaux) avec le prochain développement de marqueurs microsatellites.
- La possibilité de séquencer ces fragments (séquençage direct des produits des P.C.R.) afin d'obtenir des informations sur les relations phylogénétiques entre les espèces (en lien avec le programme d'hybridations inter-spécifiques).

Ces travaux ont été initiés à la Station Biologique de Sète par Pierre Boudry au cours d'un séjour de 2 semaines. Ils sont actuellement poursuivis à la Station de La Tremblade.

5.2. MATERIEL ET METHODES

5.2.1. Matériel biologique:

Nous disposons au sein du conservatoire de souche d'individus vivants des espèces ou taxons suivantes (effectifs au 15/12/95):

- *Crassostrea virginica*, origine Canada, GO : 66 individus.
- *Crassostrea virginica*, origine Pays de Galles, G1: 98 individus.
- *Crassostrea rivularis*, origine USA GO : diploïdes: 10 individus.
- *Crassostrea angulata*, origine Espagne, GO : 74 individus.
- *Crassostrea sikamea*, origine Californie, GO : 140 individus, G1 (Septembre 95): X environ
- hybrides *C. gigas* x *C. rivularis* (RSGR9525, lot 2): environ 30 individus "présumés" hybrides.
- hybrides *C. angulata* x *C. sikamea* (RSGR95, lot): environ 50 individus "présumés" hybrides.

L'ensemble des individus adultes sont numérotés et les biopsies sont réalisées ou en cours.

5.2.2. Extraction de l'ADN total

L'ADN de chaque individu est extrait suivant le protocole décrit dans Naciri *et al.* 1995 : digestion d'un fragment de branchies ou de manteau par de la ProteinaseK (55°C toute la nuit) puis extraction "classique" au phénol-chloroforme. Cette méthode semble donner toute satisfaction pour l'amplification par PCR de l'ADN nucléaire et mitochondrial.

5.2.3. Amplification PCR

L'obtention d'amorces permettant l'amplification de fragments de l'ADN mitochondrial d'huîtres a été menée à partir des données disponibles dans la littérature. Nous avons utilisé les couples d'amorces suivantes:

Fragment mitochondrial amplifié et taille du fragment	Références et espèces concernées	Amorces
12S : 450 bp	Mokady <i>et al.</i> (1994): <i>Litophaga</i> spp., <i>Mytilus edulis</i> .	12SBR : 5'-TTTCCCGCGAGCGACGGGCG 12SAR : 5'-GAAACCAGGATTAGATACCC
16S : 570 bp	Banks <i>et al.</i> (1993) : <i>Crassostrea</i> spp. Geller <i>et al.</i> (1993) : <i>Mytilus</i> spp.	16SBR : 5'-GTCTGAACTCAGATCAGATCACGT 16SAR : 5'-CTGTTTATCAAAAATA
COI : 710 bp	Folmer <i>et al.</i> (1994): 80 espèces d'invertébrés.	LCO1490 : 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG HCO2198 : 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA

5.2.4. Digestion par enzyme de restriction

Les produits d'amplification sont directement digérés par les différentes enzymes de restriction. Un essai a été réalisé pour comparer les profils de restriction après précipitation des produits

d'amplification (afin d'éliminer les divers autres composants de la réaction de PCR) à une digestion directe. La digestion directe donne des résultats équivalents ou meilleurs.

Le choix des enzymes de restriction testées s'est porté en premier lieu sur des enzymes à 4 paires de bases afin de maximiser la probabilité de sites de coupure. Le tableau ci-dessous résume les caractéristique des enzymes testées. D'autres enzymes, notamment des enzymes à 6 paires de bases, seront testées prochainement.

Nom de l'enzyme	Site de reconnaissance	Température optimale d'activité
TaqI	TCGA	60°C
Sau3A	GATC	37°C
Acil	CCGC	37°C
MseI	TTAA	37°C
HhaI	GCGC	37°C
HaeIII	GGCC	37°C
RsaI	GTAC	37°C
SacI	GAGCTC	37°C

5.2.5. Migration sur gel d'agarose

Le contrôle des amplifications PCR ainsi que les fragments digérés sont migrés sur gel d'agarose à 1% et visualisé sur table U. V. par coloration au bromure d'ethidium (B.E.T.).

5.3. RESULTATS

5.3.1. Amplifications

La mise au point des amplifications PCR a été réalisée sur 6 individus "test", à raison d'un individu par espèce d'huître.

L'amplification des fragments 16S et COI n'a pas posé de problèmes particuliers. Nous avons obtenu les fragments des poids moléculaires attendus dès les premières tentatives. Une légère augmentation de la température d'appariement a permis de se débarrasser du bruit de fond.

Par contre, le fragment 12S n'a pu être amplifié correctement avec les amorces utilisées malgré les multiples tentatives faisant varier température d'appariement et concentration en MgCl₂. Afin de vérifier la qualité de ces amorces, nous les avons testées sur la moule *Mytilus edulis*, espèce à partir de laquelle elles avaient été définies par Mokady et al (1994). L'amplification ayant été réalisée avec succès (obtention d'un fragment de la taille attendue: 450 bp), on en conclut que l'impossibilité d'amplifier le fragment 12S chez les huîtres creuses est sans doute du à un manque d'homologie entre nos amorces et les régions correspondantes du gène 12S chez les huîtres. Il faudra donc sans doute faire appel à d'autres amorces si l'on souhaite amplifier cette région chez les huîtres.

5.3.2. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction

Les fragments 16S et COI de 4 à 5 individus par espèce ont été digérés par 6 ou 7 enzymes. Ce travail est en cours et les résultats acquis à ce jour sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats au 22/12/95 concernant le polymorphisme de longueur de fragments de restriction les produits d'amplification PCR 16S et COI (les types sont désignés arbitrairement par des lettres pour chaque couple fragment/enzyme).

Individu	16S							COI						
	Sau3A	SacI	Acil	RsaI	MseI	HhaI	HaeIII	TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	Acil	RsaI	HaeIII
CA3	a	a	a	a	a	a	a	c	c	b	b	b	c	a
CA4	a	a	a	a	a	a	a	c	c	b	b	b	c	a
CA2	a	a	a	a	a	a	a	c	c	b	c	b	c	a
CA1test	a	a	a	a				c	c			b	c	
CA1	d	a	a	a	a	a	a	c	d	b	c			a
CG10		a	a		a	a	a							
CG3test	a	a	a	a				g	c			b	c	
CG2		a	a		a	a	a							
CG3		a	a		a	a	a							
CR18	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a?	a	a	a	a
CR2test	a	b	a	a				a	a			a	a	
CR12	b	b	a	a	a	a	a	a	a	b?		a	a	
CR17	a		a	a	a	a	a	a	a	a?	a	a	a	a
CS2	c	a	a	a	a	a	a	b	b	b?		b	c	
CS4	a	a	a	a	a	a	a	b	b	a?	a	b	c	a
CS1	a		a	a		a		b	b	a?	a	b	c	a
CS2test	a	a	a	a				e?	b			b	c	
CVgb4		a	a		b	a	b							
CVca20		a	a		b	a	b							
CVca26		a	a		b	a	b							
CVgb25		a	a		b	a	b							
CV2test	a	a	a	b				f	c			c	c	
Nb. de profils observés	4	2	1	2	2	1	2	6	4	2	3	2	2	1
Inter	A	A	/	A	A	/	A	A	A	A	A	A	A	/
Intra	W							W	W	W?	W			

"CA" = *Crassostrea angulata*

"CG" = *Crassostrea gigas*

"CR" = *Crassostrea rivularis*

"CS" = *Crassostrea sikamea*

"CV" = *Crassostrea virginica*

"?" = profil nécessitant une confirmation

"A" = polymorphisme inter-spécifique

"W" = polymorphisme intra-spécifique

Bien qu'il soit bien évidemment nécessaire de compléter cette première étape de recherche de polymorphisme, on peut désormais tirer quelques premières informations.

Comme on pouvait s'y attendre, le fragment 16S apparaît moins variable que le fragment COI. Le niveau de polymorphisme observé est plutôt encourageant (voir tableau ci-dessous). On espère pouvoir identifier prochainement des couples fragment/enzyme qui permettront de distinguer chaque taxon (cela serait particulièrement intéressant pour ce qui concerne la distinction *C. angulata*, *C. gigas*).

Tableau 9 : Bilan des premiers résultats par taxon

Espèce	Nombre d'individus étudiés	Nombre d'haplotypes observés
<i>C. angulata</i>	5	3
<i>C. gigas</i>	4	1
<i>C. rivularis</i>	4	2 (ou 3 ?)
<i>C. sikamea</i>	4	2 (ou 3 ?)
<i>C. virginica</i>	5	1
Tous taxons confondus	22	9 (à 11)

5.4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les premiers résultats nous semblent encourageant et nous espérons pouvoir continuer de travail dans les directions suivantes:

En prolongement direct des premières données obtenues:

- Compléter cette première recherche de polymorphisme en élargissant la gamme des enzymes de restriction utilisées (cette première phase ayant précisément pour but de déterminer les enzymes donnant du polymorphisme).
- Elargir l'échantillonnage des individus testés et l'étendre à d'autres taxons.
- Tenter d'amplifier d'autres fragments du génome mitochondrial afin d'étendre notre "couverture" de ce génome, notamment à des régions plus variable (région de contrôle par exemple). L'utilisation des séquences complètes(ou presque complètes) du génome mitochondrial de différents mollusques (*Mytilus edulis*: Hoffmann *et al.*, 1992; *Katarina truncata* : Boore and Brown, 1992; *Albinia coerulea*: Hatzoglou *et al.*, 1995; *Cepaea nemoralis*: Terrett *et al.*, non publié mais disponible dans "GenBank") pourrait contribuer à la définition des amorces nécessaires.

Et dans un second temps:

- Séquencer des fragments tels que le 16S pour différents taxons afin de préciser leurs relations phylogénétiques. Ces données pouvant être comparées à celles obtenues sur l'ADN ribosomal nucléaire 28S par Littlewood *et al* (1994) et "confrontées" aux expériences d'hybridation inter-taxons réalisées en éclosérie dans le cadre du conservatoire de souches.
- Appliquer la même technique (amplification-digestion) à des fragments du génome nucléaire afin de disposer de marqueurs nucléaires diagnostiques de chaque taxon. Ce type de marqueur nucléaire permettra, par exemple, de vérifier de manière non destructive le statut hybride des individus issus de croisements inter-spécifiques. Ces hybrides pourront alors être très intéressants pour des expériences touchant à la génétique (rétro-croisements, transfert de caractères intéressants...), à la pathologie ou à la physiologie (études comparatives).

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Banks MA, Hedgecock D, Waters C (1993).** Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 2(3): 129-136.
- Beckmann J.S. and Weber J.L., 1992.** Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12:627-631.
- Boore JL, Brown WM (1994).** Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. *Genetics* 138: 423-443.
- Brown BL, Paynter KT (1991).** Mitochondrial DNA analysis of native and selectively inbred Chesapeake Bay oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* 110: 343-352.
- Estoup A., Presa P., Krieg F., Vaiman D. and Guyomard R., 1993.** (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71:488-496.
- Folmer O, Black WH, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994).** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Geller JB, Carlton JT, Powers DA (1993).** Interspecific and intrapopulation variation in mitochondrial ribosomal DNA sequences of *Mytilus* spp. (Bivalvia: mollusca). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 2(1): 44-50.
- Hatzoglou E, Rodakis G, Lecanidou R (1995).** Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinia coerulea*. *Genetics* 140: 1353-1366.
- Hoffmann RJ, Boore JL, Brown WM (1992).** A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics* 131: 397-412.
- Hinegardner R., 1974.** Cellular DNA contents of Mollusca. *Comp Biochem Physiol*, 47A:447-460.
- Martin A.G., Gérard A., Cochennec N. and Langlade A., 1993.** Selecting flat oyster, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae* : assessment of the resistance of a first selected generation. In: *Production, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture, '92*. Ghent, Belgium: European Aquaculture Society, Special Publication N°18.
- Mokady O, Rozenblatt S, Graur D, Loya Y (1994).** Coral-host specificity of Red Sea Lithophaga bivalves: interspecific and intraspecific variation in 12S mitochondrial ribosomal DNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(3): 158-164.
- Naciri Y., Vigouroux Y., Dallas J., Desmarais E., Delsert C. & Bonhomme F., (1995).** Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the flat oyster *Ostrea edulis*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 4(1) : 83-89.
- Raymond M. & Rousset. F. (1994).** GENEPOP logiciel pour PC. CNRS, F34000 Montpellier.

Rothuizen J., Wolfswinkel J., Lenstra J.A. and Frants R.R., 1994. the incidence of mini- and micro-satellite repetitive DNA in the canine genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 89:403-406.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (eds.), 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 77:5463-5467.

Singer-Sam et al. (1989). Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* : 3, 11.

Thiriot-Quévieux C., Noël T., Bougrier S. & Dallot S. (1988). relationships between aneuploidy and growth rate in pair mating of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 75 : 89-96.

Vigouroux Y. (1994). Relation hétérozygotie-croissance chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Marqueurs protéiques et microsattellites. DEA "Evolution et Ecologie", Université Montpellier II.

Weber J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7:524-530.

Wintero A.K., Fredholm M. and Thomsen P.D., 1992. Variable (dG-dT).(dC-dA) sequences in the porcine genome. *Genomics*, 12:281-288.

Wu K.-S. and Tanksley S.D., 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping in rice. *Molecular and General Genetics*, 241:225-235.

**10. ANNEXE 2 :
RAPPORT D'ACTIVITE DE L'ANNEE 1996**

Sommaire

1. INTRODUCTION.....	67
2. BILAN MORAL ET FINANCIER.....	67
2.1. BILAN MORAL	67
2.2. BILAN FINANCIER.....	69
3. DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS MICROSATELLITES.....	70
3.1. HUÎTRE PLATE	71
3.1.1. <i>Matériel et méthodes</i>	71
3.1.2. <i>Résultats</i>	73
3.2. HUÎTRE CREUSE	76
3.2.1. <i>Clonage</i>	76
3.2.2. <i>Résultats</i>	77
3.2.3. <i>Définition d'amorces</i>	79
3.3. CREVETTES	79
3.3.1. <i>Méthodes</i>	79
3.3.2. <i>Résultats</i>	80
3.3.3. <i>Testage des amorces</i>	84
3.4. BAR	84
4. UTILISATION DES MARQUEURS MICROSATELLITES.....	84
4.1. HUÎTRE PLATE	84
4.1.1. <i>Aide à la sélection</i>	84
4.1.2. <i>Sélection précoce en phase larvaire et fardeau génétique</i>	90
4.1.3. <i>Perspectives pour 1997</i>	92
4.2. HUÎTRE CREUSE.....	93
4.3. BAR (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	93
4.3.1. <i>Populations naturelles</i>	93
4.3.2. <i>Origine des stocks d'élevage</i>	93
4.4. CREVETTE	94
4.4.1. <i>P. monodon</i>	94
4.4.2. <i>P. stylirostris</i>	94
5. DÉVELOPPEMENT ET UTILISATION D'AUTRES MARQUEURS	95
5.1. MARQUEURS MITOCHONDRIAUX DANS LE GENRE CRASSOSTREA.....	95
5.1.1. <i>Introduction</i>	95
5.1.2. <i>Matériel et Méthodes</i>	95
5.1.3. <i>Résultats</i>	99
5.2. MARQUEUR INTRONIQUE CHEZ <i>MYTILUS</i>	104
6. CONCLUSION.....	105
7. BIBLIOGRAPHIE CITÉE	106
8. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS RESULTANT (EN TOUT OU PARTIE) DE L'ACTIVITE DE L'URM.....	108
8.1. PUBLICATIONS.....	108
8.2. COMMUNICATIONS	108

1. INTRODUCTION

L'URM16 a pour but le développement et l'utilisation de marqueurs hypervariables chez les espèces marines. Elle a été instituée pour permettre le développement des compétences dans le domaine de l'utilisation de ces marqueurs, que ne possédait pas l'IFREMER. Parallèlement, elle officialisait la coopération débutée dès 1994 dans le cadre de l'appel d'offre IFREMER-Biotechnologie entre le laboratoire (GAP) de La Tremblade dirigé par André Gérard, et le Laboratoire Génome et Populations (LGP) de l'Université de Montpellier II dirigé par François Bonhomme.

Lors de sa première année de fonctionnement, en 1995, les travaux de l'URM 16 avaient surtout été axés sur le développement et l'utilisation des marqueurs moléculaires chez les bivalves, l'huître plate *Ostrea edulis* et l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ces recherches ont été étendues en 1996 à d'autres espèces aquacoles marines intéressant différents laboratoires de l'IFREMER : le bar *Dicentrarchus labrax* (Palavas) et les crevettes péneïdes *Penaeus stylirostris* (Tahiti).

2. BILAN MORAL ET FINANCIER

2.1. BILAN MORAL

A l'issue de sa deuxième année de fonctionnement, l'URM s'est réunie le 16 janvier 97 à l'IFREMER-Nantes pour une réunion de bilan et de discussion à laquelle participaient également des membres extérieurs à l'URM : Alain Michel (DRV IFREMER Nantes) et Bernard Chevassus (INRA).

Au cours de cette réunion, il a été rappelé que l'URM est un moyen institutionnel permettant à l'IFREMER et au Laboratoire CNRS/Université de Montpellier II Génome et Populations de développer des thématiques communes et d'échanger des personnels permanents ou temporaires, ainsi que des étudiants.

A ce titre, la station de Sète a accueilli plusieurs personnes pour des durées variables au cours de l'année 1996 :

- hébergement permanent de Claude Delsert (GAP) détaché de La Tremblade.
- Stefano Peruzzi (CDD) et Christophe Lemaire (stage de maîtrise de novembre 1995 à août 1996, dont trois mois à la Tremblade) ont réalisé un typage microsatellite des géniteurs de loup présents dans deux fermes françaises.
- Nicolas Bierne (stage DEA) a étudié la génétique de la phase larvaire de l'huître plate et a aussi effectué deux séjours de courte durée au GAP (La Tremblade). Depuis, il est VAT au COP (Tahiti) au sein du programme crevette, où il poursuit le transfert des marqueurs génétiques développés par l'URM.
- Vincent Vonau (technicien crevette au COP Tahiti) a été hébergé deux mois à Sète et a travaillé à la mise au point de marqueurs microsatellites pour l'espèce *Penaeus stylirostris*, prioritaire pour le programme crevette du COP.
- visite courte de Sophie Launey, Marc Barré et Yamama Naciri pour discuter avec François Bonhomme de l'avancement de la thèse de Sophie Launey.

- accueil à Sète d'une technicienne (CDD 6 mois) puis d'un post-doc (Marc Ohresser 6 mois) embauchés sur les crédits du programme CEE "Genephy" pour la mise au point de marqueurs microsatellites d'huître creuse.

D'autres personnes ont travaillé au LGP sur les thématiques de l'URM :

- 2 étudiantes du Maroc et de Tunisie ont travaillé à la caractérisation de populations naturelles de loup par marqueurs microsatellites.
- Marc Ohresser, post-doc au sein d'un projet CEE dirigé par Claude Delsert a travaillé à la caractérisation d'un intron de moule, ce qui vient appuyer la biologie moléculaire des mollusques en général.
- un DEA (sujet demandé par l'ORSTOM) a effectué un suivi des stocks halieutiques de 3 poissons pélagiques en mer de Chine, qui montre une structuration très marquée des populations, avec l'archipel indo-malais à la charnière entre les stocks de l'Océan Indien et de l'Océan Pacifique. Cette structuration reflète celle observée chez la crevette *P. monodon* dans la même zone par un thésard de Stirling (Ecosse) qui observe des haplotypes mitochondriaux spécifiques à l'Océan Indien ou à l'Océan Pacifique, et une zone de contact complexe.
- Le LGP accueille à Sète en 96-97 en année sabbatique D. Hedgecock, un des chercheurs des EUA les plus engagés dans le programme nord-américain d'amélioration de l'huître creuse.

Le GAP s'est équipé de façon à pouvoir mettre au point l'amplification PCR des marqueurs développés à Sète et et leur utilisation en routine. Dans ce cadre, au GAP :

- Sophie Launey a acquis une partie importante des résultats de sa thèse sur la diversité génétique de l'huître plate *Ostrea edulis*.
- Christophe Lemaire a fait un séjour de 3 mois pendant lequel il a acquis une partie de ses données sur les populations de géniteurs d'écloserie de bar *Dicentrarchus labrax*.
- Pierre Boudry et Serge Heurtebise ont étudié la diversité au sein du genre *Crassostrea* pour des marqueurs mitochondriaux développés en 1995.

Il est prévu 3 DEA sur des thématiques URM en 97, un à La Tremblade sur *C. gigas*, un à Sète sur *D. labrax*, et un à Sète sur *M. edulis*. Il est prévu également que Sophie Launey vienne travailler à Sète sur ses données en fin de thèse et vienne également interagir avec D. Hedgecock chez qui elle doit faire un post-doc.

On peut donc estimer que le bilan moral de l'URM16 depuis son début est très satisfaisant, car les contacts entre les parties ont été fréquents et utiles, et qu'ils ont permis la mise en place du laboratoire de marqueurs moléculaires du GAP (La Tremblade), qui est maintenant autonome pour la mise au point de l'amplification des marqueurs microsatellites et leur utilisation en routine. Outre ses thématiques propres (mollusques), le laboratoire de La Tremblade a ainsi pu apporter une aide au programme Bar de Palavas en recevant Christophe Lemaire qui y a obtenu une partie de ses résultats expérimentaux. En outre, la mise au point

de marqueurs moléculaires pour les espèces marines (poissons, crustacés et mollusques) peut être utile aux autres départements de l'IFREMER, en particulier aux départements RH et VP, notamment pour la traçabilité des produits et la répression des fraudes.

L'ensemble de ces actions de coopération entre les laboratoires se développe donc de manière très positive, et cela commence à se traduire par un certain nombre de publications soumises ou sous presses (cf. Liste donnée plus bas). Ces actions devraient se concrétiser pleinement dans les deux prochaines années.

2.2. BILAN FINANCIER.

Pour cette deuxième année de l'URM16, le budget a été augmenté à 200KF pour 150KF en 1995, en raison de l'ajout des thématiques poissons et crevettes. Toutefois cet argent a été disponible trop tard dans l'année en raison de la lourdeur des procédures mises en place par l'IFREMER (contrat type Universitaire) et l'absence de soutien administratif de la part de l'Université pour le laboratoire de François Bonhomme.

- bien que l'URM soit prévue pour une durée de quatre ans, l'accord doit être renégocié chaque année, selon un contrat de type universitaire. Ceci entraîne au niveau de l'Université l'ouverture d'un nouveau compte chaque année, l'impossibilité des reports d'une année à l'autre, etc.
- l'argent est versé en 3 fois, ce qui engendre beaucoup de documents administratifs, ainsi que la rédaction d'un rapport intermédiaire qui n'a aucune justification du point de vue scientifique.
- bien qu'il soit alloué à l'URM, l'argent n'est versé à l'Université par les services financiers de l'IFREMER qu'après une demande écrite supplémentaire.
- ces divers points, associés à la disponibilité tardive des sommes allouées, ont eu pour conséquence cette année de retarder les deux premiers versements de 1996 à décembre 1996 : les dossiers arrivés à l'université pendant les vacances estivales ont été oubliés, puis perdus, et ont dû être reconstitués en octobre.

Tout ceci conduit à une gestion et à une comptabilité malsaine, puisque le travail correspondant doit être fait avec d'autres sources d'argent dont dispose le LGP, et l'argent de l'URM est utilisé pour d'autres dépenses.

3. DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS MICROSATELLITES

En 1996, le travail commencé les années précédentes sur le clonage de microsatellites chez l'huître plate *Ostrea edulis* a été poursuivi et terminé. De plus, le développement de marqueurs microsatellites a été entrepris chez la crevette *Penaeus stylirostris* à la demande du COP Tahiti et chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* à la demande du laboratoire de La Tremblade. Le protocole suivi est rappelé dans la figure 1 ci-dessous.

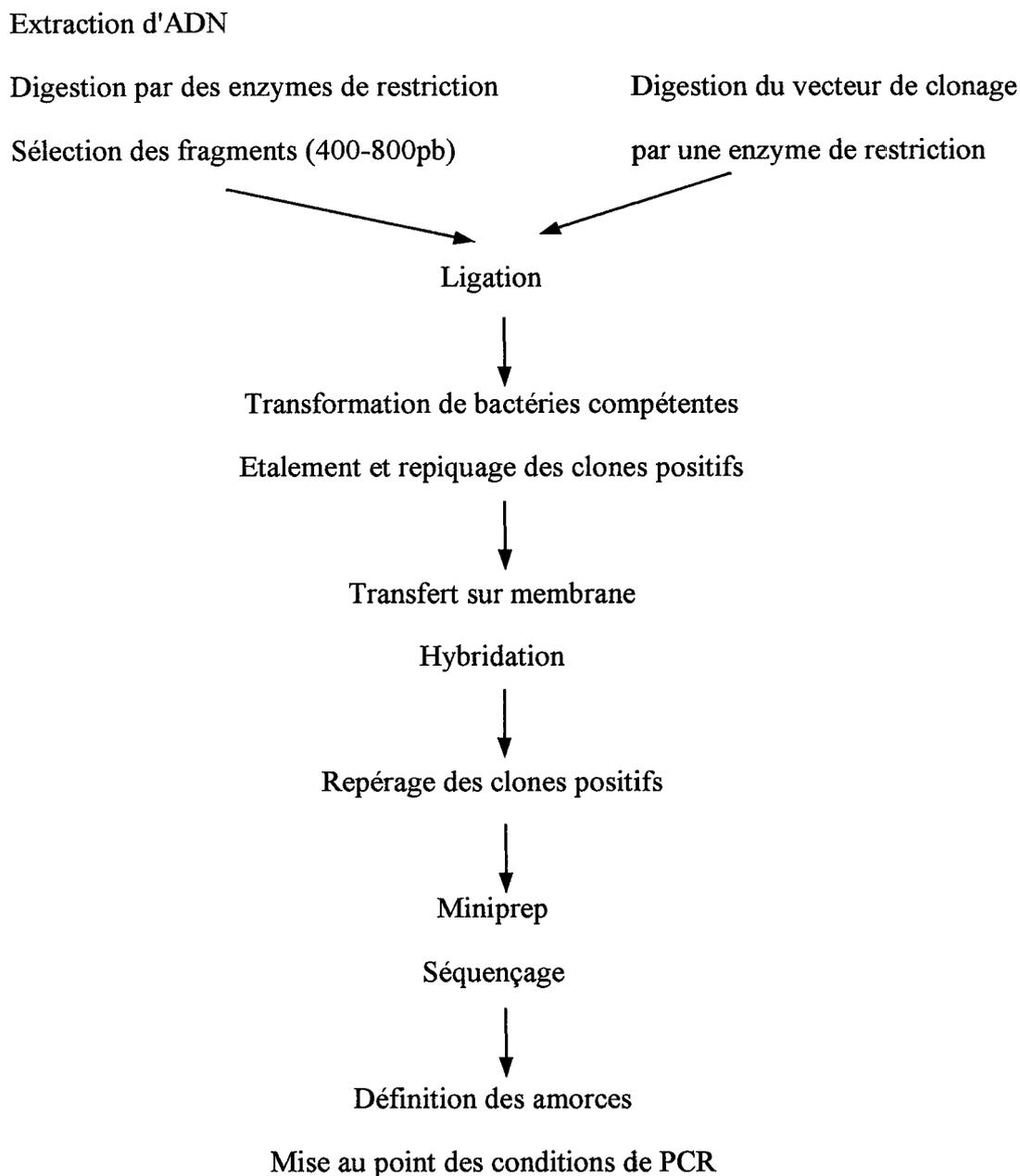


Figure 1. Protocole général de construction d'une banque génomique et de son criblage pour la recherche de marqueurs microsatellites

3.1. HUITRE PLATE

La technique de clonage utilisée a été présentée dans le rapport 1995. Elle a suivi le schéma général présenté dans la figure 1. Pour l'année 1996, les résultats portent sur la fin du séquençage des clones positifs et la mise au point des conditions de PCR pour l'amplification en routine. Les techniques utilisées dans ce cadre (séquençage et PCR) sont rappelées rapidement ci-dessous, et les résultats complets de l'étape de clonage ainsi que les possibilités d'utilisation en routine de certains marqueurs sont présentés.

3.1.1. Matériel et méthodes

3.1.1.1. Séquençage

La séquence des clones positifs a été déterminée par la technique du séquençage alcalin double brin (Sanger *et al.*, 1977, Sambrook *et al.*, 1989), à l'aide du Kit de séquençage T7 (Pharmacia), en utilisant le primer universel T7 et le primer M13 reverse.

3.1.1.2. Définition des amorces

Chaque fois que cela a été possible, des amorces ont été déterminées autour de la séquence microsatellite, à l'aide du logiciel Primer. En raison d'une taille un peu élevée des inserts, il a parfois été nécessaire de déterminer une amorce interne en amont du microsatellite et de refaire une réaction de séquence.

Les critères de sélection des amorces étaient: une longueur moyenne de 21 nucléotides, une composition équilibrée entre les nucléotides (GC) et les nucléotides (TA), la présence d'une base pyrimidique (G ou C) en position terminale, une absence d'auto-complémentarité, et une absence de complémentarité des 2 amorces entre elles.

3.1.1.3. Mise au point des conditions de PCR

La mise au point a été effectuée directement en conditions radioactives, en marquant une des 2 amorces à l'aide de ATP $\gamma^{33}\text{P}$.

Les conditions standard de marquage d'amorce et de PCR sont présentées dans les tableaux suivants:

Tableau 1. Marquage d'amorce

(pour 10 μl soit environ 80 réactions de PCR)

H ₂ O	1,5 μl
Amorce (10 μM)	2 μl
Tampon kinase	1 μl
T4 polynucléotide kinase	0,5 μl
ATP $\gamma^{33}\text{P}$	5 μl

Tableau 2. Composition du mélange réactionnel pour une réaction de PCR

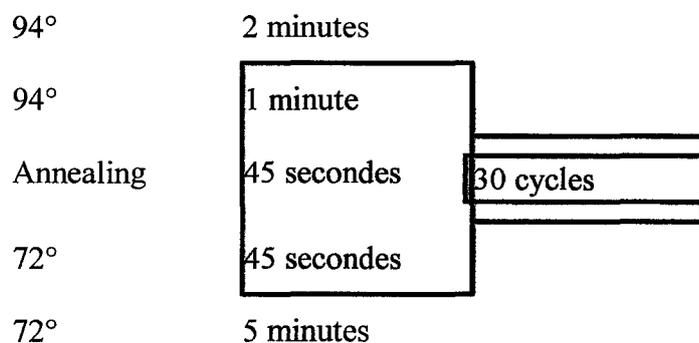
	Volume (μ l)	Concentration de la solution mère	Concentration finale
H ₂ O	5,3		
Tampon Taq	1	10 X	1 X
MgCl ₂	0,6	25 mM	1,5 mM
dNTP	0,37	2 mM (chaque)	0,075 mM (chaque)
Amorce 1 (marquée)	0,15	2 μ M	0,03 μ M
Amorce 2	0,4	10 μ M	0,4 μ M
Polymérase	0,07	5 unités/ μ l	0,35 unité
ADN	5		
Volume total	10		

La température d'annealing est spécifique a chaque couple d'amorces; elle dépend de la longueur et de la composition de l'amorce.

La mise au point a été effectuée essentiellement en faisant varier la température d'annealing et la concentration en MgCl₂, jusqu'à l'obtention d'un patron satisfaisant.

La visualisation s'effectue après migration sur un gel d'acrylamide dénaturant et autoradiographie du gel obtenu.

Programme d'amplification:



3.1.2. Résultats

3.1.2.1. Identification et caractéristiques des microsatellites

Les résultats sont présentés ci-dessous en séparant les deux types de clonage utilisés.

3.1.2.1.1. clonage I (en blunt)

Un nombre total de 3639 clones a été repiqué, d'une taille moyenne de 650 pb. En supposant que chaque insert est unique, la taille du génome ainsi criblée a été estimée à 2300 kb. En se basant sur une moyenne des tailles du génome chez deux autres espèces du genre *Ostrea* (Hinegardner, 1974), il est possible d'estimer la taille du génome haploïde d'*Ostrea edulis* à 1100 Mb; la librairie étudiée représente alors 0.2% du génome.

Le criblage à l'aide des sondes dinucléotidiques a permis l'identification de 24 clones positifs (soit 0,65 % des clones). Quatorze clones contenaient un microsatellite, et un clones en contenait deux.

Sur les 16 microsatellites mis en évidence, 5 sont constitués de motifs dinucléotidiques purs (type (AC/GT) n ou (AG/CT) n), deux sont constitués d'un motif dinucléotidique impur, 8 sont des motifs composés, et un est un tétranucléotide (dégradé).

3.1.2.1.2. clonage II (en bouts collants)

Un nombre total de 4259 clones a été repiqué, d'une taille moyenne de 650 pb. La taille de la portion de génome ainsi criblée est évaluée à 2700 kb, soit 0.25% du génome.

Le criblage par les sondes dinucléotidiques a permis de mettre en évidence 19 clones positifs (soit 0.45 % des clones). Onze clones contenaient un microsatellite, et un clone en contenait deux. Deux des microsatellites identifiés dans des clones différents se sont révélés identiques (même séquence sur plus de 250 pb séquencées).

Sur les 12 microsatellites différents mis en évidence, 5 sont des motifs dinucléotidiques purs, 2 sont des motifs dinucléotidiques impurs, 4 sont des motifs composés, et un est un motif trinuéclotide.

Les caractéristiques des différents microsatellites identifiés sont présentées dans le tableau 3.

Si l'on ajoute les microsatellites mis en évidence par Naciri *et al.* (1995), on dispose alors pour *Ostrea edulis* de 42 microsatellites identifiés.

3.1.2.2. Définition des amorces

A l'aide du logiciel Primer, nous avons défini des couples d'amorces pour 24 microsatellites. (voir Tableau 5). Pour trois autres microsatellites (Z44, I22 et O3), il n'a pas été possible de définir des amorces en raison de la trop grande proximité du site d'insertion. L'un des clones (contenant le microsatellite P8) n'a pu être séquencé entièrement et la définition d'amorces n'a pas été possible.

Tableau 3. Caractéristiques des microsatellites d'*Ostrea edulis* identifiés

Nom du locus	Motif	Clonage	Amorces
J12	(GT) ₁₄	II	O
I9	(CA) ₂₆	II	O
T5	(CA) ₁₅	II	O
B113	(GA) ₂₂	II	O
G11	(AT) ₂₀	II	O
B16	(CT) _n TTT(CT) ₉	II	O
W18	(GT) ₂₄ ..(GTGTGC) ₆ (GT) ₄₁	II	O
G9	(AT) ₄ (GT) ₃₅	II	O
Z44	(AT) ₆ (GT) ₁₄	II	N
M14	(TA) ₂₀ (CA) ₁₃	II	O
R9	(CT) ₂₇ C(CA) ₁₉	II	O
D1	(AGG) ₅	II	O
P7	(AC) ₂₀	I	O
K7	(CT) ₂₈	I	O
O9	(GA) ₃₆	I	O
T18	(CT) ₂₁	I	O
D8	(GA) ₂₄	I	O
I22	(CT) ₁₁ CCC(CT) ₆	I	N
R10	(CT) ₆ TTT(CT) ₂₂	I	O
E10	(GA) ₃₀ TT(TG) ₂₃	I	O
H10	(CA) ₁₈ (TA) ₃₀	I	O
G12	(CA) ₂₆ (TA) ₃	I	O
O3	(TA) ₈ (GA) ₂₆	I	N
N8	(AT) ₈ ..(AT) ₂₂ ..(CT) ₂₆ *	I	O
P8	(TA) ₇ (GA) ₂₂	I	N
E8	(AT) ₁₇ AC(AG) ₂₃	I	O
U2	(CA) ₂₁ (GA) ₁₇	I	O
H15	(ATCT) _n (dégradé) **	I	O

O: Amorces définies autour du microsatellite

N: site d'insertion trop près du microsatellite pour définir des amorces

* séquence complète du motif du locus N8:

(AT)₈AAATTTTT(AT)₂₂AACACGACCAATTGATTATT(CT)₂₆

** séquence complète du motif du locus H15:

(ATCT)₄ATGT(ATCT)₂ATGTATCTATATATCTATGT(ATCT)₅(TACC)₄AATTTTCT(ATCT)₃AAATATCTCTTACCTACTAACCTACCA(ATCT)₃

3.1.2.3. Mise au point des conditions de PCR

La mise au point des conditions d'amplification a conduit à des résultats différents selon les locus. On peut distinguer quatre types de locus:

- * utilisables en routine
- * utilisables ponctuellement pour des études du type suivi de ségrégation allélique
- * monomorphe
- * non utilisables

3.1.2.3.1. Locus utilisables en routine

Six locus issus de la nouvelle banque sont utilisables en routine (J12, U2, H15, O9, G9, T5). Ils s'ajoutent aux trois locus (B0, B11 et C6) utilisés par Naciri *et al.* (1995). Le laboratoire dispose donc de 9 locus utilisables en routine, ce qui est un nombre tout à fait satisfaisant pour les études aussi bien sur les populations sélectionnées que pour des études de populations naturelles.

Les principales caractéristiques de ces microsatellites sont résumées dans le tableau ci-dessous:

Tableau 4. Caractéristiques des microsatellites d'*O. edulis* utilisables en routine

Locus	Motif	Tm	Nombre d'allèle *	Taille du plus petit allèle	Taille du plus grand allèle
J12	(GT) ₁₄	50°C	24	216	272
U2	(CA) ₂₁ (GA) ₁₇	50°C	27	146	220
H15	(ATCT) _n	50°C	15	165	225
O9	(GA) ₃₆	53°C	18	140	180
G9	(AT) ₄ (GT) ₃₅	50°C	14	197	251
T5	(CA) ₁₅	48°C	13	118	168
B0	(GTT) ₇ GGG(GC) ₉	55°C	5	90	102
B11	(TC) ₉ (AC) ₂₂	51°C	48	155	217
C6	(TC) ₂₆	53°C	17	131	175

* Le nombre d'allèle a été déterminé par le génotypage de 80 individus d'une population de captage naturel de la Baie de Quiberon pour les locus J12, U2, H15, et O9, un échantillon de 50 individus de cette même population pour le locus G9, et 40 individus d'une population de captage naturel de l'Etang de Thau pour le locus T5. Pour les locus B0, B11 et C6, voir Naciri *et al.* (1995).

3.1.2.3.2. Locus utilisables ponctuellement

Ces locus ne donnent pas un patron suffisamment clair pour être utilisés dans des études de populations, mais peuvent par contre être utilisés dans l'étude de famille, car on connaît alors les allèles attendus. En particulier, ces locus peuvent être intégrés dans une analyse des liaisons génétiques entre marqueurs. Il s'agit des locus suivants: B16, B113, T18, N8, E8 et C1, ce dernier locus étant issu de Naciri *et al.* (1995).

On peut espérer qu'un peu d'effort supplémentaire dans la mise au point permettra d'obtenir des patrons alléliques mieux lisibles et donc une utilisation en routine de ces locus.

3.1.2.3.3.Locus monomorphes

Un locus a été trouvé monomorphe, il s'agit du locus D1 dont le motif séquencé est (AGG)₅.

3.1.2.3.4.Locus non utilisables.

Certains locus sont à l'heure actuelle encore inutilisables, pour diverses raisons.

L'un d'entre eux donne des patrons à trois bandes (I9). Certains donnent des patrons complexes et illisibles (G11, M14, R9, P7, K7, R10, E10 et H10). Pour les autres, aucune amplification n'a été obtenue. Il s'agit des locus W18, D8 et G12, ainsi que les locus issus de Naciri *et al.*(1995) non encore mentionnés.

Pour tous ces locus non utilisables, si le besoin de marqueurs supplémentaires se fait sentir, il est possible de redessiner de nouvelles amorces et de les retester. Cette opération est en cours pour quelques uns de ces locus.

3.2. HUTRE CREUSE

L'obtention de marqueurs moléculaires pour *C. gigas* n'était pas explicitement dans le programme initial de l'URM. Cependant, les deux partenaires de l'URM participent au projet GENEPHYS, financé par l'UE et coordonné par La Tremblade, qui impliquait qu'on obtînt de tels marqueurs. C'est ce qui a été fait au LGP, et nous donnons ci-dessous quelques extraits du rapport d'activité correspondant sur le travail réalisé (mais financé par le programme GENEPHYS).

3.2.1. Clonage

First we cloned genomic C. gigas restriction fragments by classical techniques in a plasmid vector and screened the clones after tedious manual replication of colonies. A limited number of clones was then tested for the presence of dinucleotide microsatellites. Six positive clones were sequenced and PCR primers were ultimately designed for these dinucleotide-repeat loci.

During our work other di-nucleotides microsatellite markers have become available from other laboratory. So, in a new approach, we initiated the isolation of microsatellites of tri- and tetra-nucleotide repeats, the variants of which should be more easily resolved by electrophoresis. As such sequences are potentially more rare in the genome, screening of a greater number of clones is necessary.. So, we changed of cloning and screening techniques to other procedures more adapted to large scale selection.

Cloning of *C. gigas* DNA fragments in plasmids

Total genomic DNA was purified from a entire animal ground in liquefied nitrogen. Purity of DNA was electrophoretically controlled and then the DNA was digested by 3 blunt cutting restriction enzymes (Alu I, Rsa I Hae III). The selected enzymes recognize 4 bp-long sequences, each occurring every 256 bp in random sequence. Digested DNA comprising fragments ranging in size from 250 to 500 bp was then purified by agarose

electrophoresis. Selected restriction fragments were then inserted by ligation into blunt-end, *Sma I* linearised, Phosphatase-treated pBKS2+ plasmid (Stratagene). Resulting bacterial clones, selected by « blue or white » enzymatic in vivo screening, were checked for plasmid inserts of expected size.

Screening and sequencing of plasmidic clones containing polydinucleotides sequences

11500 white, insert-containing colonies were replicated on hybridising membrane and screened for sequences with dinucleotides repeats. Double-stranded poly(dAdC), poly(dAdG), poly(dAdT) (Pharmacia) were mixed at equimolar ratio and radiolabelled by alpha P32 dATP and dCTP with random priming kit (Life technologies). The DNA probe mix used allowed us to select by hybridisation (65°C and 5X SSC for both hybridisation and washes) 52 clones potentially containing dinucleotide microsatellites. Plasmid DNA of these colonies was prepared and sequenced from flanking primers present on each side of cloning site. Characterised sequences have high A+T content, on the order of 70%. Only 6 clones with a microsatellite were found (Fig. 1), 5 AG and 1 AC repeats. To date, the entire insert sequence was obtained for all clones but clone 12, the largest one. Note that the quality of the colony-hybridisation data was not good enough to quantify the screening yield."

3.2.2. Résultats

clone 8 (330 bp-long insert)

sequence from universal primer:

CCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGACCTCGCTAACGGATTCCAGTTCATCGTCCAGTAT
GACGTAGAGAGGTTCAATGACGCTGGTGAAATATTGGTGAGTA (AG)₂₂AATA...

sequence from reverse primer:

...TGAAATATTGGTGAGTA (AG)₂₂AATACGCNNAATATCCTAATTAAAAAGAGACATATT
TATTTTTTACTTTAATGGACCAAAGCAATAATTTATAAAGTAACACCAGAAAACCTGTTTAT
CATTCAAATACATGTGCAACTATACTCTCAATTATAAATCCCGTTTTTGTTCATTTTTTCCCT
AACAAAGGAATCTGTTACATTAATAAATAAAGG

expected size of PCR fragment : 181 bp

clone 10 (330 bp-long insert)

sequence from universal primer:

ACTTATGAATTGGTCAATTCAAAGTCAATTTCCCTTCAAATTCACATAATG (AG)₂₆AATAATG
GATCAGACCCATATTAGGATCAGTCAAGGGAAAACATGCTGTTCTT...

sequence from reverse primer:

... (AG)_{n>25}AATAATGGATCAGACCCATATTAGGATCAGTCAAGGGAAAACATGCTGTTCTT
AAAAACCACCCAAAGTAACTGTTTGATCTTTTACTTATTAATGGAGAGCNATAAATCTGACC
AGATAATCTTAATCTACTAACTCTTAAGAATGTGACAATTGATAGCCACAGTCGGGGGATCA
AGTTTTACATAGGTATATAGAGAAAATCCTTAAACTTTCTTCTCGAAACTTTGACGCCAGGA
GAG

expected size of PCR fragment : 136 bp

clone 12 (530 bp-long insert)

sequence from universal primer:

ACAAATATTATGGATGTGGCAAAAATCTGTAGACCGAATATAAATCGATTGCATATTAATTA
TGATATAAGTTGATTTCGAACAGAATAAGCACATAGTGGTTGTTT **(TG)**_{n>27}...

sequence from reverse primer:

300 bp was sequenced without any microsatellite was found

expected size of PCR fragment > 120 bp

clone 16 (280 bp-long insert)

sequence from universal primer:

CTATTTGTTTCGGACGAATAAGGATTTGTTTCAGACTAATAAGTTATTTGTTTCGGACGAATAAG
ATATTTGGTCTGAATAAGTTAATCATTTTAACAGTAAA **(AG)**₂₄TTTCAAATCATGGATACG
CAGATGTGAAAAGTCTAAATCAGTTTACGAGATCATGCGCAG...

sequence from reverse primer:

...ACGAATAAGATATTTGGTCTGAATAAGTTAATCATTTTAACAGTAAA **(AG)**₂₄TTTCAA
ATCATGGATACGCAGATGTGAAAAGTCTAAATCAGTTTACGAGATCATGCGCAGATCCAGGA
ATATATCAAAG

expected size of PCR fragment : 164 bp

clone 32 (180 bp-long insert)

sequence from universal primer:

CTGAAGGATTTCTCAGAACAGTTTATTTCCCCCAATATTATTCATTCAAAATCGACTATCC
CGTATGTTTAAATTCTGTGCTAAACTCTCTCTAA **(CT)**₂₃GTGTAAACGGGCGTTAAACCATA
GCCTCAAG

sequence from reverse primer:

... **(CT)**_{n>22}GTGTAAACGGGCGTTAAACCATAGCCTCAAG

expected size of PCR fragment : 133 bp

clone 48 (330 bp-long insert)

sequence from universal primer:

CCCTAGTAACGGGAAATCTTGGCAGATAGTTCCAGCATATTGTGGTCATCTAATCTCGTGCA
AATCTCGCAGACAAGAGTTTTGCAAGATGTCAAACCATCTGCTCGTCTACGAATTTATATT **(GA)**_{n>30}...

sequence from reverse primer:

...AATTTATATT (GA)₄₃GTTTCCAAAAAAAAAACCCCNCCGGTATTCCTGGATTTTCGGAA
CTACTACTCTCTCAGTTGCATTTGGAAG

expected size of PCR fragment : 161 bp

3.2.3. Définition d'amorces

Un certain nombre d'amorces ont été définies, qui sont en cours de testage et d'utilisation à La Tremblade :

Tableau 5. Définition d'amorces pour l'amplification de locus microsatellites chez *Crassostrea gigas*

name ^a	G+C ratio ^b	sequence
Di8cgS	10/21	AGAGGTTCAATGACGCTGGTG
Di8cgAS	8/23	GATAAACAGTTTTCTGGTGTTAC
Di10cgS	9/23	GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC
Di10cgAS	10/22	CATGTTTTCCCTTGACTGATCC
Di12cgS	9/23	GTTGATTCGAACAGAATAAGCAC
Di12cgAS	ND ^c	ND
Di16cgS	9/22	CGGACGAATAAGATATTTGGTC
Di16cgAS	11/20	TGGATCTGCGCATCATCTCG
Di32cgS	9/24	ATTCATTCAAATCGACTATCCCG
Di32cgAS	11/22	CTTGAGGCTATGGTTTAACGCC
Di48cgS	11/22	TCAAACCATCTGCTCGTCTACG
Di48cgAS	11/22	TCCGAAAATCCAGGAATACCGG

^a *di8cgS* and *di8cgAS* are respective names of sense (S) and antisense (AS) primers designed at *di8cg* locus. *di8cg* locus corresponds to dinucleotidic (di) microsatellites isolated in clone 8 from *C. gigas* (cg) DNA and so one for other clones.

^b number of G and C residues divided by total nucleotide number

^c not determined "

3.3. CREVETTES

Suite à la réorientation du programme depuis *P. monodon* (espèce retenue initialement pour des raisons historiques) vers *P. stylirostris*, plusieurs séries de clonage ont été entreprises sur cette dernière espèce. Des contacts ont été pris avec différentes équipes internationales ayant abordé le clonage de microsatellites chez les Pénéides, et toutes ont éprouvé des difficultés du même ordre que les nôtres. Il semblerait que cela soit dû à une taille en général très importante des répétitions présentes dans le génome de ces espèces. Nous avons néanmoins pu obtenir satisfaction chez *stylirostris*.

3.3.1. Méthodes

Elles sont analogues à celle employées pour les huîtres plates et creuses.

3.3.1.1. Clonage

De L'ADN génomique total de *P. stylirostris* a été préparé à partir d'un fragment d'abdomen broyé dans de l'azote liquide. La qualité de cet ADN a été contrôlé par électrophorèse en gel d'agarose. 3 enzymes de restriction (RsaI:GT/AC, AluI: AG/CT et Hae III : GG/CC) ont été choisies. Chacune de ces enzymes coupe en moyenne tout les 256 pb dans une séquence aléatoire. Les fragments d'ADN mesurant après digestion une taille de 200 à 500 pb ont été purifiés sur gel d'électrophorèse. Ces fragments à bouts francs ont été alors introduits dans le plasmide pBKS2- linéarisé par Sma I. Les colonies résultant de ces clonages ont été sélectionnées par la méthode enzymatique in vivo « blanc-bleu) ». L'insertion d'un fragment d'ADN de taille voulue a été contrôlé sur quelques clones blancs pris au hasard. Pour cela, l'ADN plasmidique a été préparé, digéré par des enzymes de restriction flanquant le site d'insertion et analysé par électrophorèse.

3.3.1.2. Criblage par hybridation des clones contenant une séquence microsatellite

670 colonies blanches ont été repiquées sur des membranes d'hybridation puis criblées pour des répétitions de dinucléotides. Un mélange d'ADN double brin poly(dAdC) et poly(dAdG) a été radiomarké par incorporation de dCTP alpha P32 suivant les méthodes de « nick translation » ou de « random priming ». Après hybridation (65°C en 5x SSC) des membranes en présence de la sonde, différentes conditions de lavages ont été suivies. Lorsque les conditions de lavage sont peu « stringentes » (1 x SSC à température ambiante) toutes les colonies présentent des signaux équivalents en intensité. On n'a pas observé de différence notable avec une première augmentation de la « stringence » (0,1 x SSC à température ambiante), mais seuls 23 clones (3,4% des clones totaux) donnent des signaux détectables et un rapport signal / bruit acceptable après rinçage 0,1 x SSC à 55°C. Des résultats similaires ont été observés sur des répliques identiques hybridées avec des sondes marquées par chacune des 2 méthodes. Toutefois l'intensité des signaux est plus importante avec le marquage par « random priming ».

3.3.1.3. Séquençage des clones sélectionnés par hybridation

L'ADN plasmidique de chaque clone sélectionné a été préparé et, pour 17 clones, séquencés par la méthode de Sanger à partir des amorces flanquant le site de clonage. Par ailleurs la taille de l'insert de ces plasmides a été déterminée comme décrit plus haut.

3.3.2. Résultats

Nous ne disposons aujourd'hui que de résultats partiels. Des migrations plus longues des réactions de séquences devraient nous permettre de compléter les séquences. 14 des clones partiellement séquencés présentent des répétitions de dinucléotides, les 3 autres clones n'ont pas été complètement séquencés. Parmi les clones partiellement séquencés 7 sont associés à d'autres types de microsatellites:

- trinuécléotides (clone 2)
- tétranuécléotides (clone 1, 5, 6 et 22)
- pentanucléotides (clone 21)
- hexanucléotides (clone 2, 21)

SEQUENCES DES CLONES DE *PENAEUS STYLIROSTRIS*

sélectionnés par hybridation avec des sondes dinucléotides : caractères minuscules = séquences déduites de site de coupure.

Clone 1 (insert d'environ 400 pb)

- amorce universelle :

agCTGAGAGGAAGTTTTTTTCGT(TA)₃₅(TG)_{n>25}TA(TG)₁₅GGTA(TCTG)₇(TC)_{n>11}...

- amorce reverse :

...(TA)_{n>30}(TG)_{30<n<40}TA(TG)₁₅GGTA(TCTG)₇(TC)₁₂(GTCTC)TT(CT)₆(GTCTC)TCTT(TC)₆(GTCTC)₂(TC)₈G(GTCTC)TCTTTCTTT(CT)₅ATTTTTTTTAACTTTATTATTCCAAATGGTac

Clone 2 (insert d'environ 450 pb)

- amorce universelle :

agCTGAAATTTGGTCAAGTGTCATTGGGTTAGGTCAGGAGTTCACACTGCAAATTTGGTNNNNNNNCTTCAATTTCCCTGGAAGTTGGTG(AGGTT)₆AGGATTGATTTTAGGAGTTGAGAGCCATCGGAACGAATGCGAAGAGGGGACGCACTCGTGGAAGACCTTGCTAATACTGTCGTCTTG(TGTGCG)₂(TG)_{n>80}...

- amorce reverse :

...(TG)_{n>60}(TGTGCG)₂(TG)₃₅(TGTGCG)₉(TG)₆AGGGTGAGTATGCGTGTCTTGTGTac

Clone 3 (insert d'environ 500 pb)

- amorce universelle :

pas de microsatellite lisible sur 300 pb minimum

- amorce reverse :

...(TC)_{n>20}(TG)_{n>15}N₂₇TTTCTTTTTCTTTCTAATCACTGACAGGcc

Clone 5 (insert d'environ 200 pb)

- amorce universelle :

agC(TATC)TATTT(TATC)CC(TATC)(TATC)(TG)_{>33}...

- amorce reverse :

...CCC(TATC)₂(TG)₄₉(AT)₃AATACTGGGGTTATCAAGGGAACATAATCGATGTTACTAAATTTTACACTAAGGAAGAAAAGACCTTAAAGCTAATTCTTTTCTTCTAGACATTTTCTGTCACTCAGTCCATTGCAACATAGTGAATAAAGTAATAAATATTCTGTGAT

- remarque : L'amorce sens est sur une répétition tetra

Clone 6 (insert d'envirion 300 pb)

- amorce universelle :

gtACG(TATG)AATATAGAAATATACA(TATG)₂(TG)₂₂(TA)₃₄GGCG(TG)₃ATNAGTAA
TACATT????????ATATACTATGATACAGAAGGTAGATAC(AG)_{n>16}...

- amorce reverse :

...GGTAGATAC(AG)₄₃AAAGAGAAAAAGAAAAAGA(GACA)₃(GA)₃AAAAAAAAAAC
A?AGGNGNGAGTGCCCCACGCCCATCACTCACC GG

Clone 7 (insert d'envirion 600 pb)

- amorce universelle :

CTCGGCGATAGGAAATGGTTTATAGAAACAAATCTACATAAATGGAAATAGGTA
AA(CA)₇TATA(TCTA)₁₀(TA)₁₂TTTTTTTTTTTA(TG)₃₅(Tcta)ttt gatattt(AT)₃GGAGGC(
AT)₁₈GCCCCCACCCTGCACAGACTGGGGGGGGCTT...

- amorce reverse :

...TGTGTGAGGTCTCGGGGGCACCTTTCAGTCAATTGGNGGAGGTCGTGCTCCCAG
CGCCAGGTACCAAGAGGCTGTATGGAAGAGGCAGGGAAGGTATATGAATAAAAA
GGATATTTCCACGATGCAAGAGAGGGG/CCATTTGGCTGGTTTCGAC

Clone 8 (insert d'envirion 200 pb)

- amorce universelle :

CCGAGGAAACACGGCGATGGCACCTGTCGAACGTCGCCAGGCGGAATNNNNCCA
TGACGAGTAAACAACACTGTAATGGCACCATGAATCCTGTAACACACATTTATG
CATGC(GT)₆CT(GT)_{n>45}...

- amorce reverse :

...CAACACTGTAATGCACCATGAATCCTGTAAACACACATTTATGCATC(GT)₆CT(G
T)₅₀CTGAAT(GT)₄(GTGT)CTGATGT(ATCTCT)(ATCTCT)

- remarque : l'amorce sens est sur une répétition hexa et est à cheval sur une répétition di

Clone 9 (insert d'envirion 250 pb)

- amorce universelle :

ACTTTGACTGGGTTAATAATTAGCAGTTACTAAACCCTAAACGGTTATTGTTATTA
TT(GT)_{>45}...

- amorce reverse :

...(GT)_{n>30}(GTGC)(GC)₂(GTGC)ATGC(GTGC)₃TTATGTGTGTTTGTTTTTGTGTGTTT
TGATGTTTATACATATACATAAAGATATATTTGTATATGCATACAGATTATCAG

AGAACTTGGTAGATATGTAGATACCGGGTGTTCGATAATAATTACATATTTCTTACCCTAG

Clone 10 (insert d'environ 250 pb)

- amorce universelle :

CTAG(CCTAACCAA)ATTTGCAGTGTGAACTCTAA(CCTAACCAA)TGATATTTGACCANNNNAG(AC)⁷GC(AC)⁶AT(AC)^{>30} ...

Clone 14 (insert d'environ 200 pb)

- amorce universelle :

NCCTGGAGGGN₁₂CGAAAAGAAACATATAA(AT)₄AATAACATGTAATAAATCTTTTATTATCTCAACATCTTAAATTCNNTTT(CT)₄ATTGTGTT(GT)_{>30}...

Clone 15 (taille de l'insert pas évaluée)

- amorce universelle :

ACAAATAAGGAANTTNGTGATGATATGATATTACTCACCTTTGATGTCCTTTNCCTTT(GA)²⁷...

Clone 17 (insert d'environ 500 pb)

- amorce universelle :

CCAAAGACATCAACTAGAACTATAAAA(TC)⁵AC(TC)⁵⁵T...

Clone 20 (insert d'environ 700 pb)

- amorce universelle :

CAACTATGTGTTNNNTCANNNNN(TA)^{>20}...

- amorce reverse :

pas de microsatellite lisible

Clone 21 (insert d'environ 500 pb) **locus abandonné**

- amorce universelle : migration 2H30

CTA(AACCT)₇CTA(AACCT)₂ATA(TATGTG)TG(TATGTG)₂TTT(GT)_{>50} ...

- amorce reverse :

...(TG)₂₇AG(TG)₄AG(TG)₃TAGAG(TG)₁₀TA(TG)₃AG(TG)₂AG(TG)₆(CGTGTG)₆GCG(TG)₅TATTTG(TATATG)₂TAATGCAGCCACATTAGAGTCCGCATTAGTCACTCGCAATCCAAGAATTTTGGGACTTTTCCAATACCGAAACAATCGCCTCTTCAAAAAATCATTTATATGTATGAATGTAAATAAACTATAACCCGGTGG

Clone 22 (insert d'environ 200 pb) locus abandonné

- amorce universelle :

CCAGATCTATAGAACAATATAGCGGGAAGTAAGTA(TAAA)5(TA)_{n>30} ...

- amorce reverse :

...(TA)₃₅ACTTCAAC(AG)₆TGTGTCTGCGTA(TG)₃CTTGTGAGTTTGCAGTA(TG)₃₃C
TTGCGT

Clone 23 (insert d'environ 500 pb) locus abandonné

- amorce universelle :

CC(TG)₅TTT(GT)₄GAGNNA(TG)_{n>40} ...

- amorce reverse :

...(GA)₉GGTATGNGNATACACGNGNGTCTGTGAGAGTATGTGCATGCATGAGTCCG
GCTGGACACAGCACAACCTCCTGCCAGGATGAATAAACTGGTGTGAAAGAAGTAT
GTCACAGAGAATTCTGG

3.3.3. Testage des amorces

Ce travail est actuellement en cours à Sète et Tahiti.

3.4. BAR

Aucune mise au point de marqueurs supplémentaire n'a été envisagée pour cette espèce dans le cadre de l'URM, dans la mesure où les 6 locus clonés précédemment (Garcia de Léon et al. 95) donnent toute satisfaction. Dans le cadre d'un projet européen en cours de discussion cependant, il serait envisagé que d'autres laboratoires (notamment à Padova, Italie) entreprenne la carte génétique de cette espèce et fournissent d'autres marqueurs.

4. UTILISATION DES MARQUEURS MICROSATELLITES

4.1. HUITRE PLATE

4.1.1. Aide à la sélection

Afin de remédier aux mortalités importantes survenant au cours du second été de grossissement dues à la bonamiose, et qui compromettent la stabilité et la rentabilité de la culture de l'huître plate en France, l'IFREMER a lancé en 1985 un programme de sélection récurrente pour la survie en milieu bonamiosé (Tableau 6). Trois populations ont été créées à partir d'individus spontanés de la Baie de Quiberon, et ont ensuite subi une ou deux générations de sélection massale pour la survie pendant 5 ans en milieu bonamiosé (Baie de Quiberon). En 1995, une centaine de familles de pleins-frères ont été produites à partir d'individus de ces trois populations, et à partir d'individus sauvages.

En 1996, un échantillon d'individus des populations de sélection massale incluant les parents des familles de pleins-frères a été génotypé pour 5 locus microsatellites, ainsi que des

individus sauvages originaires de la Baie de Quiberon. Cette analyse donne des informations importantes sur structuration et la quantité de diversité génétique présente au sein des populations en sélection. Les résultats présentés ici constituent une première analyse, qui sera poursuivie plus en profondeur dans le courant de l'année 1997 dans le cadre de la troisième année de thèse de Sophie Launey, dont la soutenance est prévue fin 1997.

Tableau 6. Principales caractéristiques des trois populations en sélection

	Pop 85	Pop 89 non-inoc	Pop 89 inoc	Population sauvage Quiberon 93
historique de la sélection				
cycles de sélection massale	2 cycles sans inoculation* 1985-1990 1990-1995	1 cycle sans inoculation 1989-1995	1 cycle avec inoculation (fondateurs) + 1 cycle sans inoculation 1988 1989-1995	-
cycles de sélection familiale	1 cycle avec inoculation 1995-1998	1 cycle avec inoculation 1995-1998	1 cycle avec inoculation 1995-1998	-
nombre de géniteurs des familles biparentales produites en 1995	58 géniteurs	32 géniteurs	24 géniteurs	40 géniteurs
diversité génétique				
nombre d'individus génotypés (marqueurs microsatellites)	67	51	38	49

**sauf un lot inoculé en 1988 dont est issue une seule des familles biparentales produites en 1995.*

4.1.1.1. Appui à la gestion des populations en sélection.

Les analyses microsatellites des géniteurs des familles produites en 1995 et des populations et sous-populations dont ils sont issus a apporté des informations importantes pour la gestion de la diversité. Le premier type d'information concerne l'identification de lots d'origine incertaine.

4.1.1.1.1. Détermination de lots à l'origine incertaine.

Au cours des générations de sélection massale, les huîtres ont été placées en poches sur de nombreux sites pendant 5 ans. Certaines étiquettes ont été perdues, et deux lots différents ont été renommés X et Y. Comme ces deux lots ont fourni plusieurs géniteurs pour la création des familles de pleins-frères de 1995, il était important de retrouver leur origine exacte. L'étude des archives a permis de restreindre les possibilités à deux des quatre lots G2 issus de la population L85-G1. La diversité allélique de X et de Y a été comparée à celle de ces deux lots, qui ne présentent pas la même diversité (diversité allélique et fréquence des allèles) puisqu'ils sont issus des pontes de bacs de géniteurs différents. Les distances de Nei (1978) entre ces lots montrent que X correspond au lot Quiberon non-inoc, et Y au lot Paimpol (Tableau 7).

Tableau 7. Matrice des distances de Nei (1978) entre lots

(Le nombre d'individus analysé est indiqué entre parenthèses.)

Nei 1978	Paimpol	Y	Quiberon non-inoc	X
Paimpol (15)	0.000			
Y (13)	0.058	0.000		
Quiberon non-inoc (21)	0.252	0.452	0.000	
X (12)	0.176	0.285	0.000	0.000

4.1.1.1.2. Estimation du nombre de fondateurs des populations issues de pontes en masse d'un groupe de géniteurs.

Les trois populations en sélection ont été obtenues en recueillant un petit nombre de pontes spontanées d'un unique bac contenant d'une cinquantaine à une centaine d'individus sauvages, donc supposés non apparentés. On sait que les huîtres creuses ont un comportement de ponte groupée, l'expulsion des gamètes d'un individu déclenchant celle des gamètes de tous les individus matures du bac. La ponte obtenue constitue alors une bonne représentation de la diversité génétique du groupe de géniteurs. Ce n'est pas le cas de l'huître plate. En ne recueillant que quelques pontes, on n'a pas la certitude que tous les géniteurs ont contribué génétiquement à la génération suivante. Il s'ensuit que nos populations en sélection pourraient être issues d'un nombre réduit de géniteurs, et ne pas être porteuses d'une quantité de diversité génétique compatible avec la poursuite d'un programme de sélection.

4.1.1.1.2.1. Par Bootstrap.

Cette méthode consiste à évaluer la diversité allélique en fonction du nombre d'individus inclus dans un échantillon, en moyennant sur un grand nombre de sous-échantillonnages à partir de l'échantillon total étudié. La courbe obtenue permet d'estimer la diversité allélique (nombre d'allèles) qu'on aurait observé si on avait analysé un nombre infini d'individus, c'est à dire celle de la population totale. Cette asymptote n'a pu être déterminée par modélisation et a dû être estimée « à l'oeil » pour les populations sélectionnées. Le nombre de fondateurs nécessaires pour engendrer cette diversité allélique peut alors être estimé grâce à une courbe

similaire obtenue à partir d'un échantillon issu de la population sauvage dont sont originaires les fondateurs. Dans notre analyse, cette population est représentée par des animaux de la Baie de Quiberon capturés en 1993.

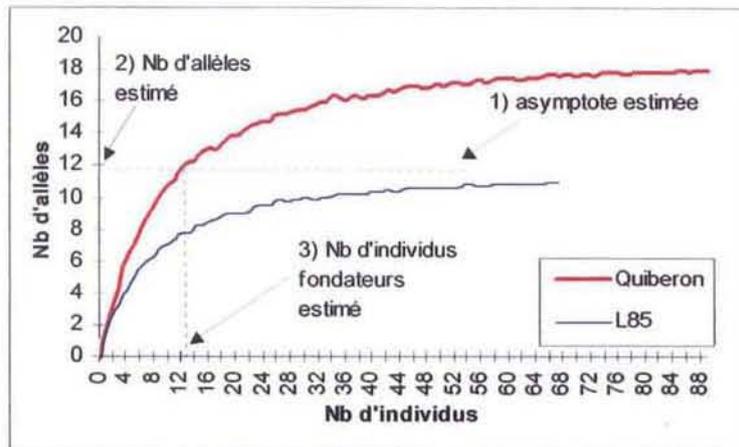


Figure 2. Exemple d'évaluation du nombre de géniteurs fondateurs dans une lignée sélectionnée par bootstrap en comparaison avec une population naturelle (ici : 12 géniteurs)

	J12		U2		H15		O9		T5	
Pop 85	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.
nombre de géniteurs fondateurs estimé par bootstrap	13.57	15.55	10.60	nd	12.11	15.09	10.02	11.82	17.1	nd
Pop 89 inoc	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.
nombre de géniteurs fondateurs estimé par bootstrap	6.82	nd	8.32	10.60	9.87	12.11	7.22	nd	6.76	9.06
Pop 89 non-inoc	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.	obs.	est.
nombre de géniteurs fondateurs estimé par bootstrap	3	3	3	3	4	4	3	3	4	4

Tableau 8. Estimation par bootstrap du nombre de géniteurs à l'origine des lignées sélectionnées en utilisant le nb d'allèle observés dans la population (obs) et le nb total d'allèle estimé dans cette population (est.). (nd: non déterminé)

4.1.1.1.2.2. Par détermination directe des génotypes fondateurs.

Pour les populations créées en 1989, ce sont les individus directement issus du croisement des fondateurs sauvages qui ont été analysés. Chaque fondateur apportant une combinaison

d'allèles aux différents locus qui lui est spécifique, il est possible de retrouver cette combinaison au sein de ses descendants. En pratique, plus il y a de fondateurs et plus ils portent d'allèles communs, plus il faut disposer des locus pour reconnaître leurs contributions dans le génome de leurs descendants. Avec nos 5 locus, et vu le nombre d'individus analysés, nous avons pu déterminer que la population 89 non-inoc provient d'une ponte unique à laquelle ont contribué seulement 3 géniteurs fondateurs (un d'un sexe, et deux de l'autre sexe). Les familles de 89 non-inoc produites en 1995 proviennent donc de parents pleins-frères ou demi-frères. Dans l'échantillon analysé de la population 89 inoc, deux familles multiparentales ont pu être distinguées : l'une provient d'un parent unique d'un sexe et de 4 géniteurs de l'autre sexe, l'autre provient d'un parent unique d'un sexe, et de 3 géniteurs de l'autre sexe, 4 individus n'ayant pu être attribués à l'une de ces deux familles. Il y aurait donc dans cette population un minimum de 9 géniteurs fondateurs, ce qui est en accord avec les estimations par bootstrap.

En conclusion, les populations sélectionnées sont issues d'un nombre réduit de géniteurs: autour de 15 pour la population P85, autour de 10 pour la P89i et exactement 3 pour la population P89ni. Ce nombre est assez faible et il pourra être envisagé dans la suite du programme de sélection d'incorporer des animaux issus d'autres populations afin d'augmenter la diversité génétique présente dans les populations en sélection.

4.1.1.1.3. Les deux lots issus de géniteurs sauvages en 1989 constituent-ils deux populations ou seulement deux sous-populations.

Les deux populations 89 inoc et 89 non-inoc sont issues de deux groupes différents de géniteurs provenant d'un même lot de captage naturel de la Baie de Quiberon, donc de la même population. Elles pourraient donc être considérées comme deux sous-populations de la même population de captage naturel. Si chaque sous-population avait été créée à partir d'un nombre suffisant de géniteurs, la diversité génétique de la population y aurait été représentée de façon comparable. En fait, chacune des sous-populations est issue d'un petit nombre de géniteurs, ce qui permet un niveau important de différenciation génétique entre elles, par effet de fondation. C'est en effet le cas, puisque chacune contient des allèles "spécifiques" (Figure 3).

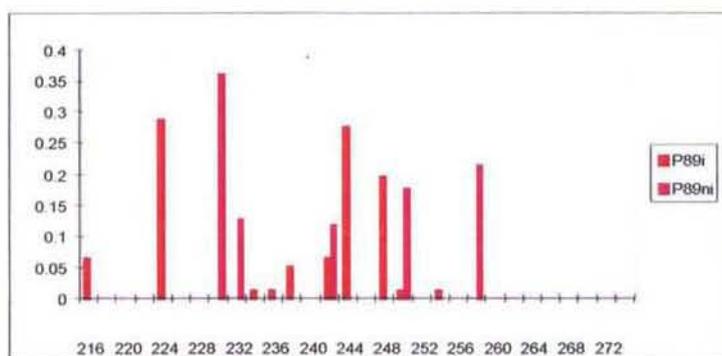


Figure 3. Distribution des allèles au locus J12 pour les populations P89i et P89ni

Il faut donc les considérer comme deux populations à part entière, ce qui est d'une importance certaine pour la gestion du programme de sélection.

4.1.1.2. Diversité génétique des populations sélectionnées.

La variabilité génétique des populations sélectionnées (richesse allélique, déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg...) a été estimée et comparée avec celle d'une population naturelle, issue de captage naturel en Baie de Quiberon en 1993. Les géniteurs à l'origine des populations sélectionnées sont également issus de la Baie de Quiberon. En les comparant avec une population naturelle récente mais provenant de la même origine géographique, on peut évaluer l'effet de la sélection sur la variabilité génétique.

4.1.1.2.1. Richesse allélique

Tableau 9. Richesse allélique dans les populations du programme de sélection

	Quib93	P85	P89i	P89ni
Effectif	49	67	38	51
J12	22	14	9	5
U2	26	13	11	5
H15	14	10	9	5
O9	18	11	9	5
T5	20	15	9	6
Moy.	21	13.17	9.2	5.17

Le nombre d'allèles dans les populations sélectionnées est plus faible que dans la population naturelle. Cela est dû notamment à l'absence dans les populations sélectionnées d'allèles présents en proportions très faibles dans la population témoin. (voir par exemple Figure 4)

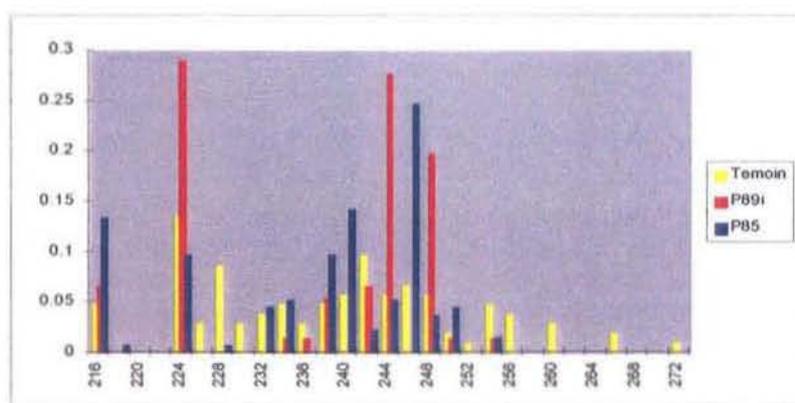


Figure 4. Fréquence allélique dans la population Témoin (Quiberon93) et dans 2 populations sélectionnées (P85 et P89i).

4.1.1.2.2. Déficit en hétérozygotes

Tableau 10. Déficit en hétérozygote dans les familles en sélection

Fis	Multilocus	J12	U2	H15	O9	T5
Quib. 93	0.084 **	0,0085 (ns)	0,0458 (ns)	0,2132 ***	0,0482 (ns)	0,1024 (ns)
P85	0.147 ***	0.3381 ***	-0.0378 (ns)	0.1831 ***	0.0410 (ns)	0.0830 (ns)
P89i	-0.236 ***	0.181 *	-0.183 ***	ns	-0.172 *	-0.171 ***

Tout d'abord, on note un déficit global en hétérozygotes qui semble surtout lié à un locus (H15). Ce locus présente d'ailleurs des déficits en hétérozygotes quasi-systématiques dans des études de populations naturelles (données non présentées ici) ainsi qu'un nombre important de non-amplifications, qui conduisent à penser que ce locus présente des allèles nuls. Ces allèles nuls (non amplifiés) conduisent à une sous-estimation de la fréquence des hétérozygotes, puisqu'un seul de leurs deux allèles est mis en évidence, et donc à l'apparition d'un déficit en hétérozygotes. Dans la population naturelle témoin, la fréquence des allèles nuls a été estimée entre 0.1 (Brookfield, 1996) et 0.12 (Chakraborty *et al.*, 1992).

La population P85 ne présente pas des différences majeures en terme d'hétérozygotie par rapport à la population naturelle sauf pour le locus J12 (déficit en hétérozygote significatif). La population P89i présente globalement un excès en hétérozygotes que l'on retrouve au niveau monocus. Il ne semble donc pas y avoir eu de perte d'hétérozygotie majeure au cours de la sélection.

4.1.1.2.3. Distances génétiques

Tableau 11. Distance de Nei (1978) entre les populations sélectionnées et une pop. naturelle

	Quib93	P85	P89i	P89ni
Quib93	0.000			
P85	0.242	0.000		
P89i	0.431	0.801	0.000	
P89ni	0.602	1.033	1.137	0.000

Les populations sélectionnées sont éloignées du témoin et sont très éloignées entre elles.

4.1.2. Sélection précoce en phase larvaire et fardeau génétique

En 96 s'est déroulé à Sète et à La Tremblade le DEA de Nicolas Bierne, DEA qui a permis d'analyser l'évolution génotypique de cohortes de larves prises à différentes périodes entre l'éclosion et la métamorphose. Des résultats très nets ont été obtenus qui montrent une relation significative entre l'hétérozygotie et la croissance (voir figure 5) ainsi qu'une mortalité différentielle en faveur des hétérozygotes. Ceci est la preuve d'un fardeau génétique important dont il faut tenir compte dans les programmes d'amélioration génétique.

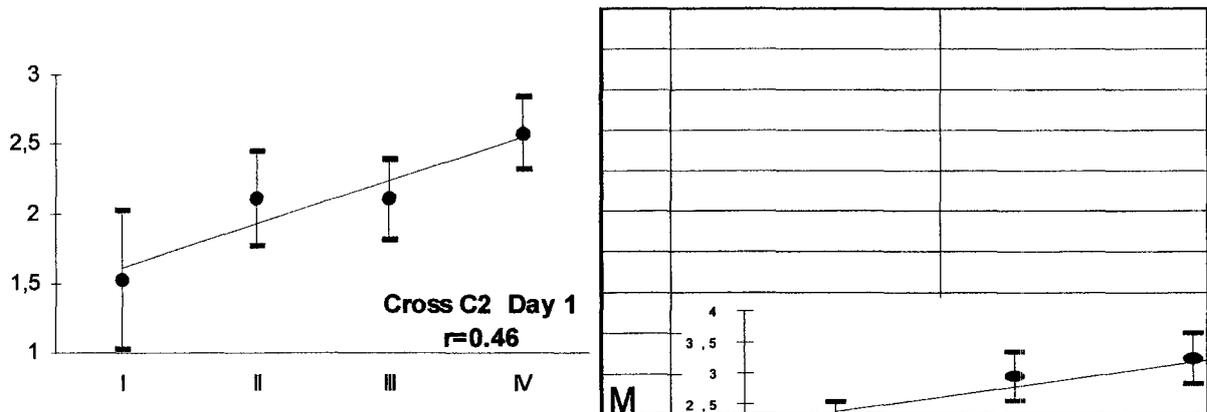


Figure 5. Corrélation entre l'hétérozygotie multilocus (microsatellites) et la taille dans la descendance d'un croisement de plein-frère chez *O. edulis* au début de la phase larvaire libre, et au stade juvénile.

(I à IV: quartile de taille croissante sur l'échantillon)

Ces données sont très importantes aussi du point de vue de leurs implications théoriques pour les explications de la superdominance chez les bivalves, et on fait l'objet d'un article soumis récemment à Genetics, dont nous reproduisons l'abstract ci-dessous.

"Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on Ostrea edulis larvae

This paper reports new experimental evidence on the effect of inbreeding on growth and survival in the early developmental phase of a marine bivalve, the flat oyster Ostrea edulis. Two crosses between full-sibs were analyzed using four microsatellite markers. Samples of 96 individuals were taken just after spawning (Day 1), at the end of the larval stage prior to metamorphosis (Day 10) and at the post-larval stage (Day 70). Whereas no departure from Mendelian expectation was observed at the youngest stage for both crosses, a genotypic selection was detected afterwards, which resulted in significant heterozygote excesses. The selection took place either at the end of the larvae stage or during metamorphosis, depending on the cross. Across the four markers, there were similar excess of multilocus heterozygosity (MLH), and significant MLH-growth correlations were recorded for both crosses at all stages. These results suggest that microsatellite markers often assumed to be neutral cosegregated with fitness associated genes (FAGs), the number of which is estimated to be between 15 and 38 in the whole genome, and that there is a potentially high genetic load in O. edulis genome. This load provides a genetic basis for heterosis in marine bivalves."

4.1.3. Perspectives pour 1997

4.1.3.1. Etude de la relation entre génotypes parentaux et performances de croissance des familles biparentales créées en 1995.

Cinquante familles créées en 1995 ont été placées en mars 1996 dans une infrastructure de test en quatre blocs complets avec 400 individus par famille et par bloc, et dédoublées à 200 individus par famille et par bloc en juin. Dans chaque bloc, 10 individus de chaque famille ont été numérotés et pesés individuellement une fois par mois jusqu'en janvier 1997. Ces données permettent d'évaluer les performances de croissance individuelles et familiales dans un milieu très homogène correspondant à des conditions intensives : apports trophiques élevés (*Skeletonema costatum* cultivé sur eau de forage) et absence d'exondation.

Les analyses qui seront menées en 1997 mettront en relation les performances individuelles et familiales, et différents paramètres pouvant être calculés à partir des génotypes des parents de ces familles : niveau moyen d'hétérozygotie attendue au sein des familles, coefficient d'apparentement entre les parents lorsqu'il est connu (populations 89 inoc et 89 non-inoc), distance génétique entre les parents, etc.

4.1.3.2. Structuration géographique de la diversité génétique de l'espèce Ostrea edulis sur l'ensemble de son aire de répartition.

Les marqueurs microsatellites constituent une alternative intéressante aux marqueurs isoenzymatiques pour l'étude de la structuration géographique de la diversité génétique des populations sauvages d'huîtres plates. Ces derniers ont déjà permis de mettre en évidence un cline de distribution des allèles à plusieurs locus (Saavedra *et al.* 1993, 1995), mais leur neutralité est remise en question par la forte relation hétérozygotie-croissance observée pour ces marqueurs (Zouros & Mallet 1989, Pogson & Zouros 1994), et ils présentent un niveau de

polymorphisme faible. Nous avons entrepris pour cinq locus microsatellites l'étude d'une quinzaine de populations (50 individus par population) donnant une représentation la plus complète possible de l'aire de répartition de l'huître plate, depuis le Nord de l'Irlande et la Norvège à la mer Adriatique en passant par côtes atlantiques et méditerranéennes françaises.

4.2. HUITRE CREUSE

Les marqueurs microsatellites développés pour l'huître creuse en 1996 sont actuellement en cours d'utilisation par les programmes "GENEPHYS", pour l'étude de la différenciation génétique entre les huîtres creuses portugaise *C. angulata* et japonaise *C. gigas*, ainsi que pour l'étude de la diversité génétique sur un échantillon de populations françaises "sauvages" et d'écloserie. Les résultats correspondants seront disponibles à la fin de l'année 1997.

4.3. BAR (*Dicentrarchus labrax*).

4.3.1. Populations naturelles

Après la publication des résultats initiaux sur le Golfe du Lion (Garcia et al. 96), nous avons étendu nos analyses d'une part en direction de Gibraltar, d'autre part en Méditerranée orientale. Des signaux génétiques forts ont été enregistrés, qui nous permettent de proposer que cette espèce est structurée en trois grandes populations : une population atlantique homogène d'Europe du Nord au Maroc, une population de Méditerranée orientale de pleine mer, et une population intermédiaire occupant la Méditerranée occidentale, qui n'est pas structurée en populations Nord (France, Italie) et population Sud (Tunisie). Cette population de Méditerranée occidentale se trouve en pleine mer et dans les lagunes côtières, mais a aussi été retrouvée dans les lagunes côtières tout autour de la Méditerranée orientale, sans apparemment se mélanger aux populations de pleine mer locales. Nous travaillons donc actuellement sur l'hypothèse que les populations de loup adaptées aux conditions particulières des lagunes côtières avaient disparu de Méditerranée au cours de la dernière glaciation, et que la population de Méditerranée occidentale serait un colonisateur récent, ayant envahi de proche en proche les lagunes de Méditerranée orientale, ne pouvant s'y établir en pleine mer à cause de la concurrence des populations marines autochtones.

Si cette structuration très originale est vérifiée, cela aura des conséquences certaines sur la gestion des ressources génétiques de cette espèce.

4.3.2. Origine des stocks d'élevage

Un travail est en cours (DEA de Christophe Lemaire) de caractérisation génétique de stocks d'élevage, pour d'une part les resituer dans le contexte phylogéographique décrit ci-dessus, et d'autre part mesurer la variabilité génétique des stocks d'élevage. Des résultats prometteurs sont d'ores et déjà obtenus, qui montrent que certains stocks d'élevage sont nettement moins polymorphes que les populations naturelles. Le graphique de la figure 6 a été obtenu par une méthode de rééchantillonnage avec remise (bootstrap). Un logiciel créé à la station IFREMER de Ronces-les-Bains par Marc Barré, compte la moyenne et la variance de la diversité allélique d'échantillons de taille croissante. Ceci permet de comparer les diversités alléliques des populations d'élevage et des populations naturelles dont leurs géniteurs fondateurs sont issus. Un compte rendu détaillé de ce travail sera fourni en septembre dans le rapport mi-parcours.

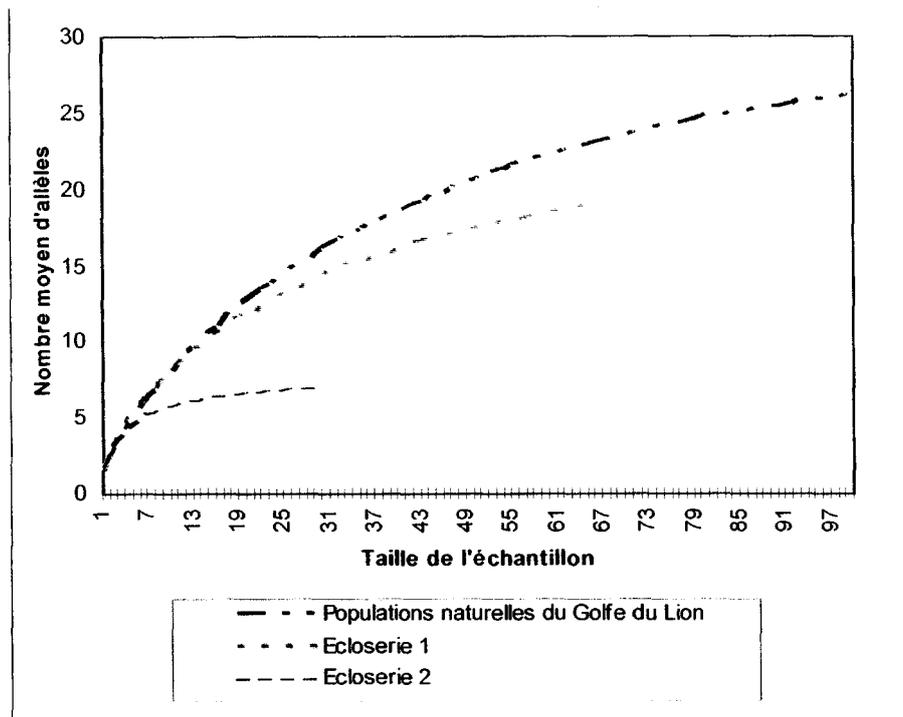


Figure 6. Estimation du nombre moyen d'allèle à un locus en fonction de la taille de l'échantillon (Bootstrap)

4.4. CREVETTE

4.4.1. *P. monodon*

Bien que le travail sur cette espèce ait été abandonné dans le cadre direct de l'URM 16, une valorisation des amorces microsatellites précédemment obtenues a été entreprise sous deux formes :

- un petit travail de caractérisation de 4 populations de l'archipel indonésien fournies par B. McAndrew à Stirling. L'enjeu est de préciser l'existence éventuelle, pour cette espèce à très vaste répartition, de populations de type "océan indien" ou "pacifique".
- la mise à disposition des amorces aux chercheurs australiens de l'AIMS à Townsville, chercheurs qui ont un programme sur *P. monodon*, et qui ont par ailleurs établi des collaborations avec le COP à Tahiti. Les locus que nous leur avons procurés se sont avérés polymorphes et informatifs pour leurs problématiques.

4.4.2. *P. stylirostris*

Les amorces définies au LGP sont en cours de testage "grandeur nature" au COP, sur les différentes souches de *P. stylirostris* disponibles (Tahiti, Guam, Mexique). Les 5 premiers locus testés ont montré très peu de polymorphisme dans les souches du COP et de Guam (1 à 2 allèles par locus) et beaucoup plus dans la population sauvage du Mexique, supposée non-consanguine. Ces premiers résultats ont été obtenus avec une technique grossière de révélation (bromure d'éthidium sur gel d'agarose), et sont actuellement en train d'être précisés par marquage radioactif (travail en cours de N. Bierne et V. Vonau). Un compte rendu détaillé sera fourni au mi-parcours.

5. DEVELOPPEMENT ET UTILISATION D'AUTRES MARQUEURS

5.1. MARQUEURS MITOCHONDRIAUX DANS LE GENRE *CRASSOSTREA*

5.1.1. Introduction

La recherche de marqueurs moléculaires du génome mitochondrial chez les huîtres creuses du genre *Crassostrea* est en lien direct avec le programme "conservatoire de souches d'huîtres creuses", cofinancé par la Région Poitou-Charentes et implanté au GAP. Celui-ci a pour principaux objectifs les points suivants :

- 1 - L'étude des potentialités d'acclimatation dans les eaux françaises d'huîtres de différentes espèces, afin de pouvoir identifier celle qui pourrait se substituer à *Crassostrea gigas* en cas d'épizootie majeure ou pour une diversification des productions.
- 2 - L'étude des possibilités d'hybridations inter-spécifiques au sein de genre *Crassostrea*, et l'étude des performances (croissance, fertilité) des hybrides obtenus.
- 3 - L'étude de la différenciation génétique (intra- et inter-spécifique) au sein du genre *Crassostrea*, à l'aide marqueurs génétiques (marqueurs de l'ADN nucléaire et mitochondrial). Ces travaux servent de base à la mise au point de marqueurs diagnostiques d'espèces ou de populations. Ces marqueurs sont souhaités par la profession ostréicole afin de venir en appui en cas d'importations frauduleuses (en lien avec le programme "Qualité" DRV/RA).

La technique qui a été privilégiée jusqu'à présent repose sur la recherche de polymorphisme de fragments de restriction dans des fragments amplifiés par PCR. Cette méthode a été notamment choisie pour les raisons suivantes:

- La technique est "relativement légère" comparativement aux RFLP sur ADN mitochondrial purifié, donc applicable à de grands échantillons (études "en population", contrôles d'importations...),
- La possibilité de mise en oeuvre au sein du laboratoire de biologie moléculaire de La Tremblade,
- La "compatibilité" avec les marqueurs microsatellites (collections d'ADN génomique).
- La possibilité de séquencer ces fragments (séquençage direct des produits des PCR) afin d'obtenir des informations sur les relations phylogénétiques entre les espèces (en lien avec le programme d'hybridations inter-spécifiques).

5.1.2. Matériel et Méthodes

5.1.2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique analysé est de 2 types:

- Des individus vivants, présents au sein du conservatoire de souche (les prélèvements de tissus sont réalisés par biopsie). Le tableau 12 présente les animaux actuellement en élevage.
- Des échantillons conservés en alcool ou au congélateur. Le tableau 13 ci-dessous présente l'état des collections.

Tableau 12. Animaux actuellement en élevage dans la salle quarantaine (conservatoire de souche).

Espèce	Origine	Génération/année d'arrivée ou de production	Effectif
<i>C. virginica</i>	Canada	G0/1994	44
<i>C. virginica</i>	Conservatoire souche	de G1/1996	≈ 3000
<i>C. rivularis</i>	U.S.A	G0/1996	72
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	G0/1995	105
<i>C. sikamea</i>	Conservatoire souche	de G1/1995	100
<i>C. sikamea</i>	x Conservatoire souche	de hybrides G1/1995	75
<i>C. angulata</i>	Espagne	G0/1995	48
<i>C. angulata</i>	Portugal	G0/1996	35
<i>C. gigas</i>	Espagne	G0/1996	36
<i>C. rhizophorae</i>	Guyane	G0/1997	34
<i>C. gasar</i>	Sénégal	G0/1996	25
<i>S. commercialis</i>	Australie	G0/1996	100

Tableau 13. Echantillons de tissus d'huîtres creuses pour extraction d'ADN

Espèce	Population	Origine/Descriptif	Effectif
<i>C. gigas</i>	TAS	Tasmanie- Huîtres d'écloserie - nombre de parents inconnu	50
<i>C. echinata</i>	ROC	Nouvelle Calédonie- Huîtres de rocher - population naturelle	30
<i>S. commercialis</i>	STE	Port Stephens, New South Wales, Australie, captage naturel; Lot vivant au Conservatoire	18
<i>C. gasar</i>	ZIG	Ziguinchor, Sénégal; huîtres de palétuvier, population naturelle	50
<i>C. gigas</i>	ARC	Arcachon, captage Naturel 1993 - (parents Genephy)	20
<i>C. gigas</i>	ROZ	Anse du Roz, Rade de Brest, pop. naturelle	50
<i>C. gigas</i>	GRA	Gravelines Avant Port, prox centrale nucléaire, pop. Nat.	50
<i>C. gigas</i>	KEE	Keelung, Taiwan, population naturelle	30
<i>C. angulata</i>	MUS	Muséum de La Rochelle, échantillon datée de 1914	1
<i>C. angulata</i>	PIE	Canio Sancti Pietri; Chiclana de la Frontera, Espagne; population naturelle	50
<i>C. gigas</i>	ZEL	Nouvelle Zélande via Nouvelle Calédonie (commerciales)	50
<i>C. gasar</i>	PAG	Ile Blay, Ebrié Lagoon, Côte d'Ivoire - population naturelle	50
<i>C. gigas</i>	HUB	Huîtres élevées en Irlande - origine présumée Guernesey	20
<i>C. gigas</i>	COR	Chungmu, Corée du Sud - population naturelle	150
<i>C. gasar</i>	NOB	Kafountine, Casamance, Sénégal huîtres de palétuvier - population naturelle	30
<i>C. rhyzophorae</i>	SIN	Huîtres de palétuviers, Guyane. Monsinery	40
<i>C. gasar</i>	PIC	Sénégal	30
<i>C. gigas</i>	SEA	Angleterre - Ecloserie SeaSalter	20
<i>C. gigas</i>	OUA	Lagune de Oualidia - Maroc -175 Km au sud de Casablanca	48
<i>C. angulata ?</i>	TAH	Tahadart - 340 Km au nord de Casablanca - Maroc	16

5.1.2.2.Extraction de l'ADN total

L'ADN de chaque individu est extrait suivant le protocole décrit dans Naciri *et al.* 1995 : digestion d'un fragment de branchies ou de manteau par de la Proteinase K (55°C toute la nuit) puis extraction "classique" au phénol-chlorophorme. Cette méthode semble donner toute satisfaction pour l'amplification par PCR de l'ADN nucléaire et mitochondrial. Des extractions au Chelex® sont également réalisées, mais donnent des résultats plus irréguliers (en terme d'amplification PCR).

5.1.2.3.Amplification PCR

L'obtention d'amorces permettant l'amplification de fragments de l'ADN mitochondrial d'huîtres a été menées à partir des données disponibles dans la littérature (Tableau 14)

Suite à une récente publication de Hare & Avise (1996), nous testerons prochainement une nouvelle paire d'amorces (OY73a et OY73b) décrite comme amplifiant un segment de 800 bp chez *C. virginica*.

Tableau 14. Amorces utilisées et fragments mitochondriaux correspondants

Fragment mitochondrial amplifié et taille du fragment	Références et espèces concernées	Amorces
12S : 450 bp	Mokady <i>et al.</i> (1994): <i>Litophaga</i> spp., <i>Mytilus edulis</i>	12SBR : 5'-TTTCCC GCGAGCGACGGGCG 12SAR : 5'-GAAACCAGGATTAGATACCC
16S : 570 bp	Banks <i>et al.</i> (1993) : <i>Crassostrea</i> spp. Geller <i>et al.</i> (1993) : <i>Mytilus</i> spp	16SBR : GTCTGAACTCAGATCAGATCACGT 16SAR : 5'-CTGTTTATCAAAAATA
COI : 710 bp	Folmer <i>et al.</i> (1994): 80 espèces d'invertébrés	LCO1490 : GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG HCO2198 : TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA

5.1.2.4. Digestions par des enzymes de restriction

Les produits d'amplification sont directement digérés par les différentes enzymes de restriction. Un essai a été réalisé pour comparer les profils de restriction après précipitation des produits d'amplification (afin d'éliminer les divers autres composants de la réaction de PCR) à une digestion directe. La digestion directe donne des résultats équivalents ou meilleurs. Le choix des enzymes de restriction testées c'est porté principalement sur des enzymes à 4 paires de bases afin de maximiser la probabilité de sites de coupure.

Tableau 15. Caractéristiques des 9 enzymes de restriction utilisées.

Nom de l'enzyme	Site de reconnaissance (5' - 3')	Température optimale d'activité
TaqI	TCGA	60°C
Sau3A	GATC	37°C
AciI	CCGC	37°C
MseI	TTAA	37°C
HhaI	GCGC	37°C
HaeIII	GGCC	37°C
RsaI	GTAC	37°C
HindIII	AAGCTT	37°C
SacI	GAGCTC	37°C

5.1.2.5. Electrophorèse

Le contrôle des amplifications PCR ainsi que les fragments digérés sont migrés sur gel d'agarose à 1% et visualisé sur table U.V. par coloration au bromure d'ethidium.

5.1.3. Résultats

5.1.3.1. Amplifications

La mise au point des amplifications PCR a été réalisée dans un premier temps sur 6 individus "test", à raison d'un individu par espèce d'huître. De nouvelles espèces ont ensuite été testées en fonction des arrivages de nouveaux échantillons.

L'amplification du fragment 16S a pu être réalisée sur l'ensemble des échantillons (voir Tableau 13). Nous obtenons des fragments du poids moléculaire attendu : 570 pb. Une légère augmentation de la température d'appariement par rapport aux protocoles initiaux a permis de se débarrasser du bruit de fond.

L'amplification du fragment COI a pu être réalisée sur certaines espèces (*C. gigas*, *C. sikamea*, *C. rivularis*, *C. virginica*, *C. belecheria*, *C. iredalei*) mais pas sur d'autres (*C. gasar*, *C. margaritacea*, *C. echinata*). Cette absence de produit d'amplification est surprenant car les amorces en questions ont été décrites comme amplifiant ce gène avec succès chez un très grand nombre d'espèce d'invertébrés (Folmer *et al.*, 1994). Les tentatives de modification des conditions de la réaction de PCR (température d'appariement) n'ont pas donné de résultats positifs pour l'instant.

Le fragment 12S n'a pas pu être amplifié correctement avec les amorces utilisées malgré les multiples tentatives faisant varier température d'appariement et concentration en MgCl₂. Afin de vérifier la qualité de ces amorces, nous les avons testées sur la moule *Mytilus edulis*, espèce à partir de laquelle elles avaient été définies par Mokady *et al.* (1994). L'amplification ayant été réalisée avec succès (obtention d'un fragment de la taille attendue: 450 bp), on en conclut que l'impossibilité d'amplifier le fragment 12S chez les huîtres creuses est sans doute due à un manque d'homologie entre nos amorces et les régions correspondantes du gène 12S chez les huîtres. Il faudra donc sans doute faire appel à d'autres amorces si l'on souhaite amplifier cette région chez les huîtres.

5.1.3.2. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction

5.1.3.2.1. Fragment 16S

Les profils de restriction observés pour les différents taxons ou populations analysés sont présentés dans les tableaux 16 et 17. Ils permettent de différencier 8 haplotypes. Les relations entre haplotypes, en terme de présence/absence de sites de restriction, ont été analysées à l'aide du logiciel REAP (McElroy *et al.* 1991). La matrice de distances (divergence nucléotidique) ainsi obtenue a servi de base à la construction de l'arbre présenté en figure 6, construit avec NEIGHBOR and DRAWTREE du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993).

Nous disposons ainsi de **marqueurs d'espèces (non destructifs)**, permettant de distinguer facilement des espèces d'huîtres pour lesquelles les caractères morphologiques diagnostiques sont souvent difficiles à observer (voir inexistantes). La situation intermédiaire des huîtres ouest-africaines (*C. gasar*) entre les huîtres asiatiques (*C. gigas*, *C. sikamea* et *C. rivularis*) est intéressante et devra être confirmée par le séquençage du fragment 16S.

En effet, l'impossibilité d'intercroisement entre *C. gigas* et *C. virginica* mène à rechercher des "espèces ponts" afin de transférer des caractères de résistances à des maladies d'une espèce

à l'autre. Cette approche a été menée par S.K. Allen avec *C. rivularis* apparemment sans succès. *C. gasar* pourrait être meilleur candidat.

5.1.3.2.2. Fragment COI

Ce fragment n'a pu être amplifié chez *C. margaritacea*, *C. echinata*, et *C. gasar*. Pour les autres taxons Les tableaux 18 et 19 résument les résultats observés. Neuf haplotypes peuvent être distingués. Le réseau en figure 7 montre les relations phylogénétiques entre haplotypes. Les résultats observés au sein du groupe "*C. angulata* - *C. gigas*" (taxons considérés comme conspécifiques) sont présentés en détail dans un article actuellement soumis pour publication à *Journal of Marine Biology and Ecology*.

Tableau 16. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction des produits d'amplification du fragment 16S. Les profils sont désignés arbitrairement par des lettres minuscules pour chaque couple fragment/enzyme.

Taxons/populations	COI								Haplo- types
	<i>TaqI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>HhaI</i>	<i>MseI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HindIII</i>	<i>HaeIII</i>	<i>SacI</i>	
<i>Crassostrea angulata</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>Crassostrea gigas</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>Crassostrea rivularis</i>	a	a	a	a	a	a	a	b	II
<i>Crassostrea sikamea</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>Crassostrea virginica</i>	a	a	a	b	b	a	b	a	III
<i>Crassostrea iradalei</i>	a	a	a	b	b	a	a	b	IV
<i>Crassostrea belcheria</i>	a	a	a	b	b	a	a	b	IV
<i>Crassostrea echinata</i>	b	a	a	e	b	b	a	b	V
<i>Crassostrea margaritacea</i>	b	a	b	e	a	b	a	b	VI
<i>Crassostrea gasar</i> (Côte d'Ivoire)	a	b	a	e	b	a	b	a	VII
<i>Crassostrea sp.</i> (huîtres de palétuvier, Guyane)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
<i>Crassostrea gasar</i> (Sénégal)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
<i>Crassostrea gasar</i> (Casamance)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
Nb. de profils observés	2	2	2	3	2	2	2	2	

Tableau 17. Bilan des haplotypes observés par restriction du fragment 16S sur les différents taxon et populations étudiées.

Taxon	Populations/Origine	Nombre d'individus étudiés	Haplotypes observés
<i>C. angulata</i>	Espagne, Portugal	5	I
<i>C. gigas</i>	France, Grande-Bretagne...	4	I
<i>C. rivularis</i>	New-Jersey (U.S.A.)	4	II
<i>C. sikamea</i>	Californie (U.S.A.)	4	I
<i>C. virginica</i>	Canada	5	III
<i>C. iredalei</i>	Thaïlande	1	IV
<i>C. belcheria</i>	Thaïlande	1	IV
<i>C. echinata</i>	Nouvelle Calédonie	3	V
<i>C. margaritacea</i>	Madagascar	3	VI
<i>C. sp.</i>	Guyane	8	VIII
<i>C. gasar</i>	Cote d'Ivoire, Sénégal	20	VII, VIII
Tous taxons confondus		58	8

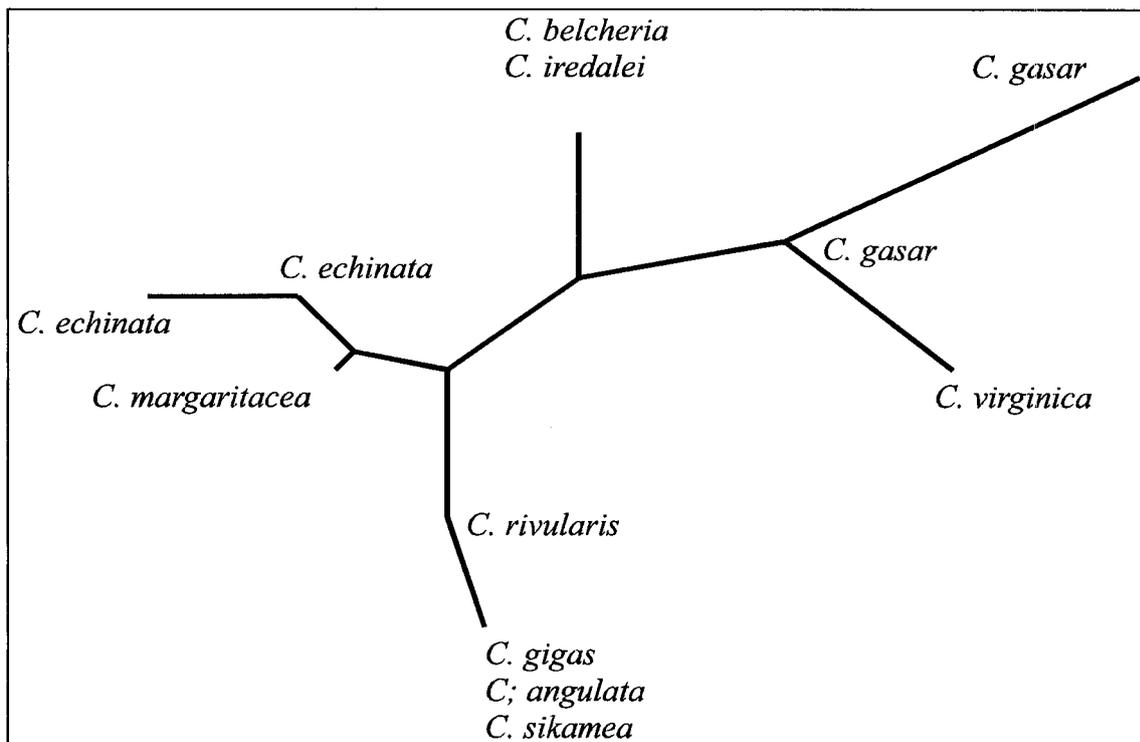


Figure 3. Arbre construit par "neighbor-joining", illustrant les relations génétiques entre les taxons à partir de données obtenues en PCR-RFLP sur le fragment mitochondrial 16S.

Tableau 18. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction des produits d'amplification du fragment COI. Les profils sont désignés arbitrairement par des lettres minuscules pour chaque couple fragment/enzyme.

Taxons/populations	16S									Haplo- type
	<i>Taq</i> I	<i>Sau</i> 3A	<i>Hha</i> I	<i>Mse</i> I	<i>Aci</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hae</i> III	<i>Sac</i> I	
<i>Crassostrea angulata</i>	c	c	a	b	b	c	a	c	a	A
	c	d	a	b	b	c	a	c	a	B
<i>Crassostrea gigas</i>	d	c	a	d	b	c	a	c	a	C
	d	c	a	d	b	c	a	c	a	D
	d	c	b	d	b	c	a	c	a	E
	a	c	a	b	b	c	a	c	a	J
<i>Crassostrea rivularis</i>	a	a	b	a	a	a	a	a	a	H
<i>Crassostrea sikamea</i>	b	b	b	a	b	c	a	b	a	S
<i>Crassostrea virginica</i>	f	c	a	c	c	c	a	a	a	I
Nb. de profils observés	5	4	2	4	3	2	1	3	1	

Tableau 19. Bilan des haplotypes observés par restriction du fragment COI sur les différents taxon et populations étudiées.

Taxon	Populations/Origine	Nombre d'individus étudiés	Haplotypes observés
<i>C. angulata</i>	Espagne, Portugal	50	A, B, C
<i>C. gigas</i>	France, Grande-Bretagne...	203	A, B, C, D, E, J
<i>C. rivularis</i>	New-Jersey (U.S.A.)	4	H
<i>C. sikamea</i>	Californie (U.S.A.)	4	S
<i>C. virginica</i>	Canada	5	I
Tous taxons confondus		266	9

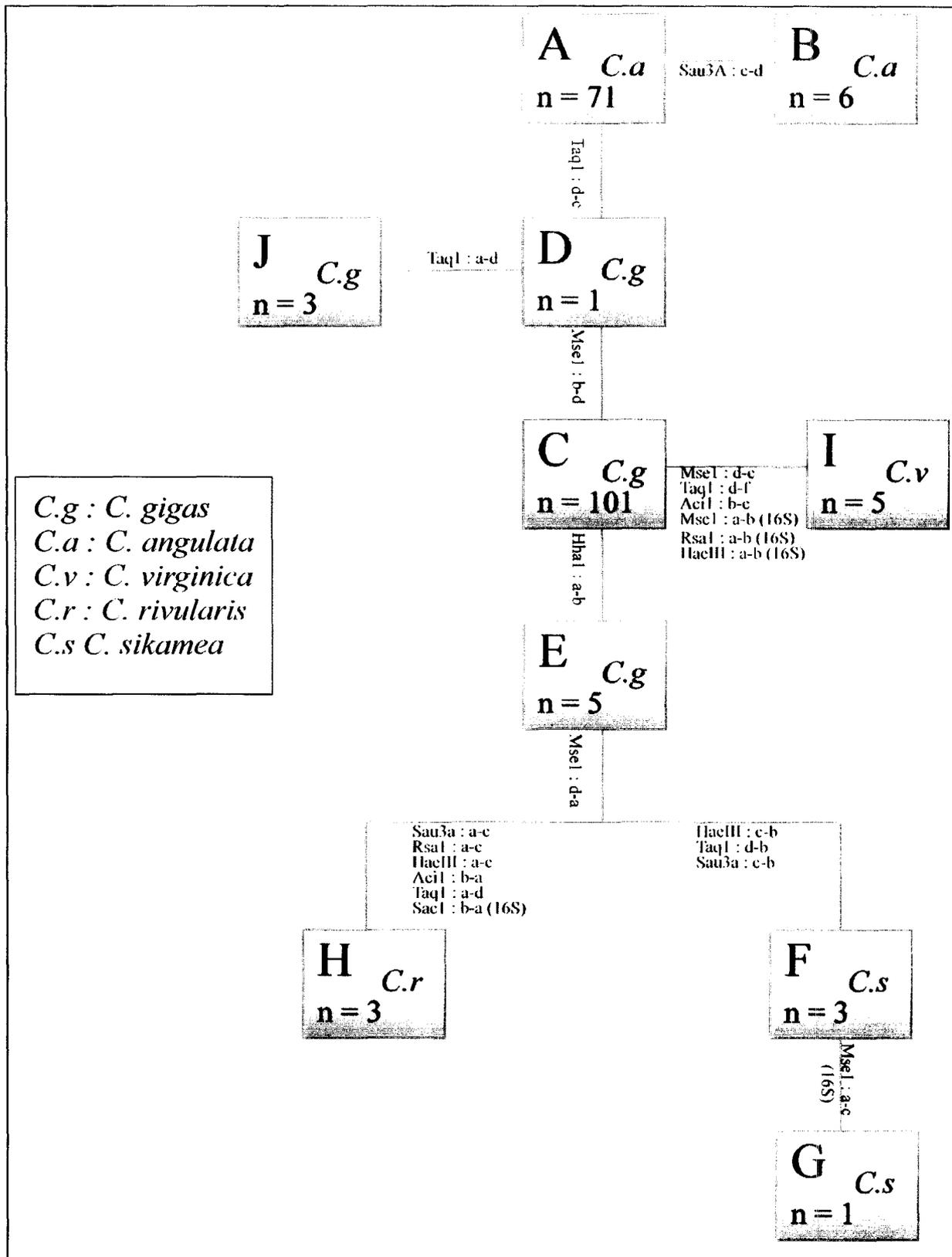


Figure 4. Réseau illustrant les relations phylogénétiques entre les haplotypes obtenues en PCR-RFLP sur le fragment mitochondrial COI.

5.1.3.3. Perspectives pour 1997

Les résultats obtenus en 1996 concernant la différenciation entre *C. angulata* et *C. gigas* par marqueurs mitochondriaux sont actuellement soumis pour publication. La mise au point de marqueurs microsatellites (3 loci identifiées par l'équipe du Prof. Zouros, Université de Crète; et 5 loci développés au sein de l'URM16, dans le cadre du programme européen GENEPHYS) nous a permis d'initier une étude des populations de *C. gigas* et *C. angulata* à l'aide de ces marqueurs (DEA d'Arnaud Huvet). Ces données pourront être comparées aux résultats obtenus avec les marqueurs mitochondriaux.

Les travaux concernant la différenciation entre espèce au sein du genre *Crassostrea* nous permettent désormais de distinguer chaque espèce (ou taxon) par comparaison des profils de restriction des fragments 16S et COI. Cette approche devra être complétée par le séquençage de ces fragments afin de pouvoir quantifier les niveaux de divergence entre espèces.

5.2. MARQUEUR INTRONIQUE CHEZ *MYTILUS*

A l'occasion d'un travail fondamental sur l'expression des gènes d'actines chez les bivalves, M. Ohresser a identifié un polymorphisme intéressant dans un des introns du gène Mac-1. Nous avons profité de l'opportunité pour valider l'emploi d'un tel type de marqueur génétique pour les études populationnelles chez les bivalves. Il s'est avéré que certains haplotypes sont diagnostiques dans le complexe *M. edulis/M. galloprovincialis*, et que leur analyse permet une typologie fine des populations prenant en compte les phénomènes de migration et d'introgression. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Marine Molecular Biology and Biotechnology* (Ohresser *et al.*, 1997). Un DEA (C. Daguin) est en cours à Sète.

6. CONCLUSION

Deux ans après son initiation, on peut dès maintenant dire que l'URM16 remplit ses objectifs, puisqu'elle a permis à l'IFREMER d'acquérir des compétences en matière de mise au point et d'utilisation de marqueurs moléculaires qui lui faisaient défaut auparavant. Pour l'IFREMER, ceci s'est traduit par l'équipement du laboratoire de biologie moléculaire pour l'utilisation des marqueurs mitochondriaux et microsattellites, et par la formation des personnes, statutaires ou étudiants, y travaillant. Après un an de fonctionnement, ce laboratoire est devenu autonome pour l'utilisation des marqueurs, sinon pour leur mise au point qui demande des équipements plus lourds. Il devient un interlocuteur scientifique valable pour le laboratoire LGP de Montpellier, ce qui est concrétisé par le nombre de thématiques communes et l'encadrement commun de plusieurs étudiants, qui valorisent la mise au point de marqueurs pour répondre à des questions de génétique des populations ou de gestion de stocks de géniteurs.

Au sein du département Ressources Aquacoles de l'IFREMER, les marqueurs microsattellites apportent des informations cruciales pour tous les programmes nécessitant la gestion d'un stock de géniteurs, que celui-ci soit associé ou non à un programme de sélection. L'impact de ces marqueurs sur les programmes huître plate, bar et crevette est significatif. Chez l'huître plate et le bar, ils permettent déjà d'évaluer la quantité de diversité génétique disponible par comparaison avec des populations sauvages, d'estimer le nombre d'individus fondateurs et d'éviter l'apparition de consanguinité dans les populations d'élevage. Ils donnent également une vision différente de la variabilité interspécifique qui, lorsqu'elle était considérée, ne pouvait auparavant l'être que de façon statistique. L'étude de la structuration géographique de la diversité génétique de l'huître plate et du bar avec les mêmes marqueurs a déjà débuté et elle est prévue pour *Penaeus stylirostris*. Elle va permettre un choix raisonné des géniteurs des populations d'élevage au sein de l'ensemble des ressources génétiques.

La réunion interne IFREMER du 11 septembre 1996 "Utilisation de la biologie moléculaire au sein de la DRV et de la DEL" a souligné l'intérêt des marqueurs moléculaires pour les autres départements de la DRV : Ressources Halieutiques(RH) et Valorisation des Produits(VP). Le département RH a besoin de marqueurs génétiques pour étudier la structuration géographique des stocks halieutiques, ainsi que pour étudier l'effet de l'effort de pêche sur la structure génétique des populations. Le département VP a quant à lui besoin de marqueurs d'espèces ou d'origine géographique pour compléter l'analyse des protéines pour la traçabilité des produits. Le rôle central et pionnier de l'URM16 sur ces thématiques à l'IFREMER a été souligné.

7. BIBLIOGRAPHIE CITEE

- Banks Ma, Hedgecock D, Waters C (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 2(3): 129-136.
- Beckmann J.S. and Weber J.L., 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12:627-631.
- Brookfield, J.F.Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5:453-455.
- Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S.P. and Budowle B., 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing and their implications in forensic applications. *Human Genetics*, 56:45-57.
- Estoup A., Presa P., Krieg F., Vaiman D. and Guyomard R., 1993. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71:488-496.
- Folmer O, Black WH, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- Hare MP, Avise JC (1996). Molecular genetic analysis of a stepped multilocus cline in the american oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution* 50(6):2305-2315.
- Hinegardner R., 1974. Cellular DNA contents of Mollusca. *Comp Biochem Physiol*, 47A:447-460.
- Mokady O, Rozenblatt S, Graur D, Loya Y (1994). Coral-host specificity of Red Sea *Lithophaga* bivalves: interspecific and intraspecific variation in 12S mitochondrial ribosomal DNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(3): 158-164.
- Martin A.G., Gérard A., Cochennec N. and Langlade A., 1993. Selecting flat oyster, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae* : assessment of the resistance of a first selected generation. In: *Production, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture, '92*. Ghent, Belgium: European Aquaculture Society, Special Publication N°18.
- Naciri Y., Vigouroux Y., Dallas J., Desmarais E., Delsert C. and Bonhomme F., 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4(1):83-89.
- Pogson G.H. & Zouros E., 1994. Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus* : a test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics* 137 : 221-231.
- Saavedra C., Zapata C., Guerra A. and Alvarez G., 1993. Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 115:85-95.

- Saavedra C., Zapata C., Guerra A. and Alvarez G., 1995. Geographical patterns of variability at allozyme loci in the european oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 122:95-104.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (eds.), 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 77:5463-5467.
- Rothuizen J., Wolfswinkel J., Lenstra J.A. and Frants R.R., 1994. the incidence of mini- and micro-satellite repetitive DNA in the canine genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 89:403-406.
- Weber J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)n.(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics*, 7:524-530.
- Wintero A.K., Fredholm M. and Thomsen P.D., 1992. Variable (dG-dT).(dC-dA) sequences in the porcine genome. *Genomics*, 12:281-288.
- Wu K.-S. and Tanksley S.D., 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping in rice. *Molecular and General Genetics*, 241:225-235.
- Zouros E. & Mallet A.L., 1989. Genetic explanations of the growth/heterozygosity correlation in marine molluscs. *In* : reproduction, genetics and Distributions of Marine Organisms. Eds. Ryland J.S. & Tyler P.A., pp317-323.

8. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS RESULTANT (EN TOUT OU PARTIE) DE L'ACTIVITE DE L'URM

8.1. PUBLICATIONS

Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y. and Bonhomme F. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analysis on *Ostrea edulis* larvae. Soumis à Genetics.

Boudry P. Genetic differentiation between Portuguese [*Crassostrea angulata* (Lamarck)] and Pacific [*Crassostrea gigas* (Thunberg)] oyster populations, as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. (soumis à JEMBE).

Garcia de Leon, F. J., Chatain, B., Quillet, E., and Bonhomme, F. The application of microsatellite markers to breeding programs in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Soumis à Aquaculture.

Ohresser M., Borsa P. and Delsert C., 1997. Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1* : a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk and *M. edulis* L. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 6(2) 123-130.

8.2. COMMUNICATIONS

Boudry P., Heutebise S., Cornette F., Collet B., Gérard A. (1996). . Where does the portuguese oyster really come from ?. Poster présenté au 30th annual meeting of the Population Genetics Group. Edinburg, United-Kingdom, 17-20 Décembre 1996.

Boudry P., Chatain B., Naciri Y., Lemaire C., Gérard A., (1996). . Genetical improvement of marine fish and shellfish: a french perspective. Proceedings of the 5th international Conference for productivity Enhancement of the Coastal Waters. Pusan, Korea, May 23-24 1996.

Bierne N., Bonhomme F. and Naciri-Graven Y. La génétique en phase larvaire peut-elle expliquer le déficit en hétérozygotes chez les bivalves marins? Etude de la ségrégation de locus microsatellites chez *Ostrea edulis*. Poster, XVIIIème Colloque du Groupe de Biologie et Génétique des Populations, Grenoble, Aout 1996.

Launey S., Naciri-Graven Y., Delsert C., Bonhomme F. & Gérard A. (1996). Variabilité génétique de deux populations d'huîtres plates (*Ostrea edulis* L.) sélectionnées pour une résistance à *Bonamia ostreae*. 18ème Congrès du Groupe de Génétique des Populations - 27 août-30 août 1996. Grenoble.

Launey S., Vigouroux Y., Naciri-Graven Y. et Bonhomme F. Relation hétérozygotie-croissance chez l'huître plate : apport des locus microsatellites. Communication orale, 2ème Colloque Microsatellites et Génétique des populations, Paris, Juin 1997.

**11. ANNEXE 3 :
RAPPORT D'ACTIVITE DE L'ANNEE 1997**

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	110
2. HUITRE CREUSE (<i>CRASSOSTREA GIGAS</i>).....	110
2.1. CONTRIBUTIONS PARENTALES ET SUCCÈS REPRODUCTEUR	110
3. LOUP (<i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>).....	111
3.1. ÉTUDE DE LA STRUCTURATION DES POPULATIONS NATURELLES	111
3.2. COMPARAISON DES STOCKS DOMESTIQUES AVEC LES POPULATIONS NATURELLES	111
4. CREVETTE (<i>PENAEUS MONODON</i> ET <i>PENAEUS STYLIROSTRIS</i>).....	113
4.1. VARIABILITÉ DANS LES POPULATIONS SAUVAGES DE <i>PENAEUS MONODON</i>	113
4.2. VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DANS LES POPULATIONS D'ÉLEVAGE DE TAHITI	113
4.3. ÉTUDE DES CORRÉLATIONS HÉTÉROZYGOTIE-CROISSANCE DANS LES STOCKS D'ÉLEVAGE.....	114
5. MOULES <i>MYTILUS</i> SPP.	115
5.1. POLYMORPHISME D'INTRON, ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE ET BIOGÉOGRAPHIE CHEZ LES MOULES DU COMPLEXE D'ESPÈCES <i>MYTILUS EDULIS</i>	115
6. RÉFÉRENCES.....	117

1. INTRODUCTION

L'URM16 a été instituée pour permettre le développement des compétences dans le domaine de l'utilisation de marqueurs génétiques moléculaires. Lors de sa première année de fonctionnement en 1995, les travaux de l'URM 16 avaient surtout été axés sur le développement et l'utilisation des marqueurs moléculaires chez les bivalves, l'huître plate *Ostrea edulis* et l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Conformément au plan d'opérations prévu pour la troisième année de l'URM, ces recherches ont été étendues en 1996 à la structure géographique des populations de ces espèces et d'autres espèces aquacoles marines intéressant différents laboratoires de l'IFREMER : le bar *Dicentrarchus labrax* (Palavas) et les crevettes pénéides *Penaeus stylirostris* (Tahiti), ainsi qu'aux moules *Mytilus* spp., espèces-modèles pour la génétique des populations d'organismes marins .

2. HUITRE CREUSE (*CRASSOSTREA GIGAS*)

2.1. Contributions parentales et succès reproducteur

Plusieurs expériences ont été réalisées en utilisant des marqueurs microsatellites pour l'analyse des contributions parentales dans des croisements in vitro chez *Crassostrea gigas*. En effet, il s'agissait de savoir si tous les parents contribuent de manière homogène aux descendance produites en élevage et si non, de déterminer l'origine gamétique ou zygotique des différences observées entre familles. Le travail décrit ci-dessous a fait l'objet du stage de Véronique Hervouet. L'analyse de parenté a été facilitée par le grand polymorphisme (plus de 50 allèles/locus) observé aux 4 locus étudiés. Ainsi, dans un croisement entre 20 mâles et 20 femelles, le père ou la mère d'un quart des descendants ont pu être déterminés en utilisant un seul locus microsatellite. Dans plusieurs croisements entre 5 mâles et 5 femelles, tous les descendants ont pu être assignés à une famille en utilisant 3 locus. Malgré des contributions gamétiques équilibrées entre parents à la fécondation, des contributions parentales déséquilibrées sont observées dans les descendants, aux stades larvaires et juvéniles. Afin d'identifier les causes de ces déséquilibres, les effets de la compétition gamétique et zygotique ont été étudiés en comparant différents types de croisements (permettant ou non une compétition gamétique à la fécondation) à différents stades de développement (larvaire et post-larvaire). Les effets parentaux (mâles et femelles) sur la survie des descendants se sont avérés significatifs. Nous montrons donc que la variance du succès reproducteur individuel est dû à la fois à des phénomènes de compétition spermatique et à des phénomènes sélectifs (mortalités différentielles entre descendants).

Ces résultats expérimentaux ouvrent de nouvelles perspectives en terme de sélection, et éclairent d'un jour nouveau les phénomènes de variance du succès reproducteur observé dans les populations naturelles.

3. LOUP (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

3.1. Etude de la structuration des populations naturelles

En 1997, l'analyse des derniers échantillons de populations naturelles de *Dicentrarchus labrax* a été effectuée par Mariam NACIRI à l'aide des six marqueurs microsatellites développés au laboratoire Génome et Populations (García de León et al. 1995). Le réseau d'échantillonnage couvre une aire allant de la mer du Nord jusqu'à la Sicile. L'étude porte sur la variation génétique des populations de loup le long de la transition entre les eaux Atlantiques et celles de la Méditerranée. Ce travail a fait l'objet d'un article sous presse dans le Journal of Heredity (NACIRI et al. 1999 ; Encadré 1). Les résultats de cette étude confirment en partie les hypothèses avancées au cours du précédent rapport. En effet, il semble que cette espèce soit structurée en deux grandes populations : océan Atlantique et mer d'Alboran, et Méditerranée occidentale (Figure 1). La transition entre les populations ouest-méditerranéenne et atlantique du loup se situerait a priori à l'est de la mer d'Alboran. La Figure 1 montre une divergence génétique robuste (valeur de bootstrap de 100%) entre les deux groupes d'échantillons. La structuration à l'intérieur de chaque groupe semble, en revanche, plus difficilement explicable par la géographie.

3.2. Comparaison des stocks domestiques avec les populations naturelles

Cette étude, réalisée par Christophe LEMAIRE dans le cadre de son DEA porte sur la comparaison des stocks domestiques provenant de cinq écloseries françaises avec un ensemble d'échantillons de populations naturelles choisis au sein de la collection disponible au laboratoire. A l'aide des six marqueurs microsatellites utilisés dans les travaux précédemment cités, cette analyse indique une tendance vers la réduction de polymorphisme (mesuré par le nombre d'allèles par locus avec correction pour la taille de l'échantillon) chez les populations d'élevage. Le nombre d'allèles standardisé pour la taille de l'échantillon a été estimé par une méthode de ré-échantillonnage aléatoire avec remise (bootstrap). La Figure 2 illustre cette baisse de variabilité à un locus. Cependant, aucune différence n'est observée sur la diversité génique (mesurée par le H de Nei (1978)) ni sur la mesure du Fis (mesurant l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg) indiquant que cette réduction de variabilité n'est sans doute pas imputable à de la consanguinité. Un autre aspect de ce travail concerne la possibilité d'assignation d'un individu à la population dont il est originaire. Un des objectifs de cette méthode est la reconnaissance de l'origine géographique des fondateurs du stock au sein de l'écloserie. Malgré des résultats préliminaires prometteurs, cette méthode doit cependant subir quelques améliorations.

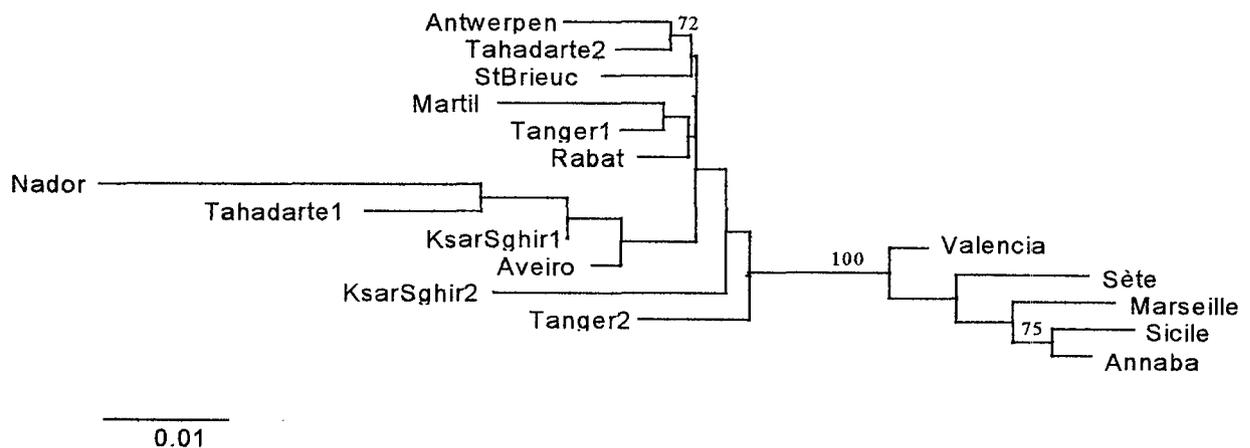


Figure 1 *Dicentrarchus labrax*. Représentation de la divergence génétique entre les populations d'Atlantique + mer d'Alboran et celles de mer Méditerranée (NACIRI *et al.*, 1999)

Encadré 1 Résumé de l'article de NACIRI *et al.*, sous-presse dans *Journal of Heredity*

We report on the genetic differentiation among populations of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* from the North Sea, the Gulf of Biscay, the coasts of southern Portugal to northwestern Morocco, the Alboran Sea and the western Mediterranean. Using variation at six microsatellite loci, a phylogenetic tree inferred from Reynold's coancestry distance showed that sea bass populations clustered into two homogeneous groups, an Atlantic group which includes the Alboran Sea east of Gibraltar Strait, and a western Mediterranean group. While no clear geographical patterns emerged within these two entities, the sharp transition led us to postulate that the Almeria - Oran oceanographic front may play a role in the position of the divide. This divide was evidenced by a small but highly significant F_{st} value (0.018 ; $p < 0.001$), corresponding at equilibrium to an average effective number of migrants N_m of about of 14 individuals per generation only. We propose that passive mechanisms cannot explain alone the persistence of this divide.

4. CREVETTE (*PENAEUS MONODON* ET *PENAEUS STYLIROSTRIS*)

4.1. Variabilité dans les populations sauvages de *Penaeus monodon*

Trois locus microsatellites de *Penaeus monodon* (*Pmo9*, *Pmo25* et *Pmo27*) ont été utilisés pour analyser le polymorphisme de populations sauvages australiennes. Ce travail a fait l'objet d'une note sous presse dans la revue *Marine Biology* (BROOKER, et al. 1999). Ces locus se sont révélés très polymorphes avec un nombre d'allèles allant de 34 à 84 et une diversité génétique supérieure à 92%.

4.2. Variabilité génétique dans les populations d'élevage de Tahiti

La variabilité génétique à trois locus microsatellites (*Pstyli.05*, *Pstyli.09*, *Pstyli.19*) est maintenant analysée en routine sur *Penaeus stylirostris*. Les analyses ont permis de caractériser les stocks du Centre Océanologique du Pacifique (COP) et de l'Écloserie Polyvalente Territoriale (EPT). Les fréquences alléliques, les diversités génétiques et les *Fis* sont détaillés dans le Tableau 1.

La mise au point de ces trois marqueurs microsatellites a fait l'objet d'une *Primer Note* sous presse dans la revue *Animal Genetics* (VONAU et al. 1999). Les microsatellites se sont donc révélés être, comme prévu, des marqueurs de choix pour l'analyse des stocks d'élevage de Tahiti. En effet, bien que ces derniers aient été maintenus à des effectifs faibles pendant plus de 15 ans, ils présentent encore de la variabilité à ces locus hyper-variables. L'optimisation des amplifications par PCR pour les autres locus est en cours.

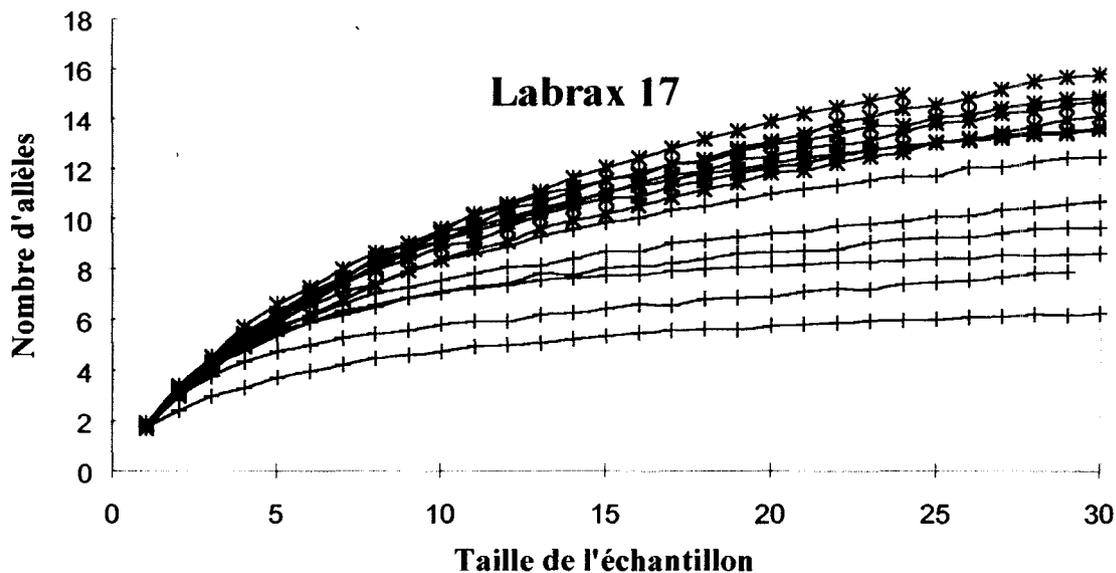


Figure 2 *Dicentrarchus labrax*. Courbe de simulation d'échantillonnage du nombre d'allèle au locus *Labrax-17* en fonction de la taille de l'échantillon. Rouge : stocks d'élevage ; bleu : échantillons de populations naturelles

Tableau 1 Fréquences alléliques, hétérozygoties observée et attendue et F_{is} à trois locus microsatellites dans deux échantillons temporels de la même génération de la population COP de la crevette *Penaeus stylirostris* (t_1 : poids moyen = 26.8g , t_2 poids moyen = 43.1g) et dans les échantillons de deux générations de la population EPT (EPT- g_2 deux générations après EPT- g_0). Tests réalisés par permutation à l'aide du logiciel GENETIX (BELKHIR *et al.*, 1996).

Populations (n)	COP - t_1 30	COP - t_2 30	COP - t_1+t_2 60	EPT - g_0 29	EPT - g_2 48
Locus <i>Pstyli.05</i>					
180	0.68	0.75	0.72	0.8	1
210	0.32	0.25	0.28	0.2	0
$H_{exp.}$	0.44	0.38	0.41	0.33	-
$H_{obs.}$	0.57	0.43	0.5	0.07	-
F_{is}	-0.29 ^{ns}	-0.14 ^{ns}	-0.22 ^{ns}	0.79 ^{***a}	-
Locus <i>Pstyli.19</i>					
210	0.83	0.77	0.8	0.55	0.44
214	0.17	0.23	0.2	0.45	0.56
$H_{exp.}$	0.28	0.36	0.32	0.5	0.5
$H_{obs.}$	0.27	0.33	0.3	0.37	0.46
F_{is}	0.06 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.28 ^{ns}	0.08 ^{ns}
Locus <i>Pstyli.09</i>					
210	0	0.02	0.01	0.11	0.19
218	0.27	0.25	0.26	0.48	0.4
220	0.28	0.35	0.315	0.24	0.24
222	0.45	0.38	0.415	0.17	0.17
$H_{exp.}$	0.66	0.68	0.66	0.68	0.72
$H_{obs.}$	0.6	0.5	0.55	0.52	0.17
F_{is}	0.09 ^{ns}	0.27 [*]	0.17 ^{ns}	0.24 [*]	0.4 ^{***a}
F_{is} (Σ locus)	-0.04 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.37 ^{***a}	0.27 ^{***a}

ns, not significant; * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, ^a significant after Bonferroni adjustment.

4.3. Etude des corrélations hétérozygotie-croissance dans les stocks d'élevage

L'analyse des corrélations entre l'hétérozygotie et un paramètre phénotypique (comme la croissance) dans les populations de démographie connue a été effectuée afin de déterminer l'importance du fardeau génétique pour le paramètre en question. Les résultats ont été à la hauteur des espérances puisque malgré le petit nombre de locus et le faible nombre d'individus analysés (les expériences ont été réalisées à Tahiti), une corrélation significative a été trouvée (exemple en Figure 3). Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise à la revue *Aquaculture* (BIERNE *et al.* 1998 ; voir résumé Encadré 2)

5. MOULES *MYTILUS* SPP.

5.1. Polymorphisme d'intron, évolution moléculaire et biogéographie chez les moules du complexe d'espèces *Mytilus edulis*

Suite à la mise en évidence au laboratoire d'un polymorphisme de longueur dans l'intron n°1 du gène *mac-1* de l'actine (OHRESSER *et al.* 1997), un marqueur polymorphe a été développé et utilisé pour l'analyse génétique de populations naturelles de moules des espèces *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* échantillonnées le long des côtes européennes et nord-ouest africaines, ainsi qu'en Tasmanie. Un important polymorphisme de longueur (20 allèles de taille, répartis en 4 classes) a été révélé après amplification par PCR et séparation des produits d'amplification sur gel de polyacrylamide dénaturant. L'analyse des données génétiques a permis d'assigner à chacune des populations étudiées son statut taxinomique en utilisant des populations *M. edulis* et *M. galloprovincialis* de référence. L'analyse de la structure génotypique a montré une tendance significative au déficit en hétérozygotes, ainsi qu'une homogénéité génétique forte des populations sur de grandes distances en dehors de la zone d'hybridation européenne entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Les 20 allèles au locus *mac-1* se répartissent en 4 classes de structure suivant les insertions-délétions qu'ils contiennent. Un arbre de parcimonie a été inféré à partir des séquences et a montré un regroupement fort des allèles de *M. edulis* d'une part et de *M. galloprovincialis* d'autre part. Des caractéristiques génétiques particulières ont été trouvées pour la population échantillonnée en Tasmanie. En effet, cette population présumée *M. galloprovincialis* à partir de données allozymiques est quasiment monomorphe au locus *mac-1* pour un allèle fréquent chez *M. edulis*. Ces résultats, ainsi que des données moléculaires récentes sur les ADN mitochondriaux nous ont amenés à remettre en cause la systématique du complexe *M. edulis* - *M. galloprovincialis*. Ils permettent désormais d'envisager l'espèce *M. edulis* comme une espèce dérivée de *M. galloprovincialis*, remettant en cause l'hypothèse prévalant actuellement, d'une différenciation de *M. galloprovincialis* à partir de *M. edulis* en Méditerranée au Pléistocène (- 2 millions d'années). Ces travaux nous ouvrent de nouvelles voies d'investigation pouvant conduire à une révision complète des relations génétiques entre les espèces du complexe *M. edulis* - *M. galloprovincialis* ainsi qu'à l'élaboration d'un scénario phylogéographique à l'échelle mondiale. Ils démontrent aussi la qualité du marqueur *mac-1* pour la caractérisation des espèces et des populations. Nous envisageons d'étendre l'étude à d'autres marqueurs nucléaires, et d'analyser les relations génétiques entre populations de moules sur la totalité de leur aire de répartition mondiale.

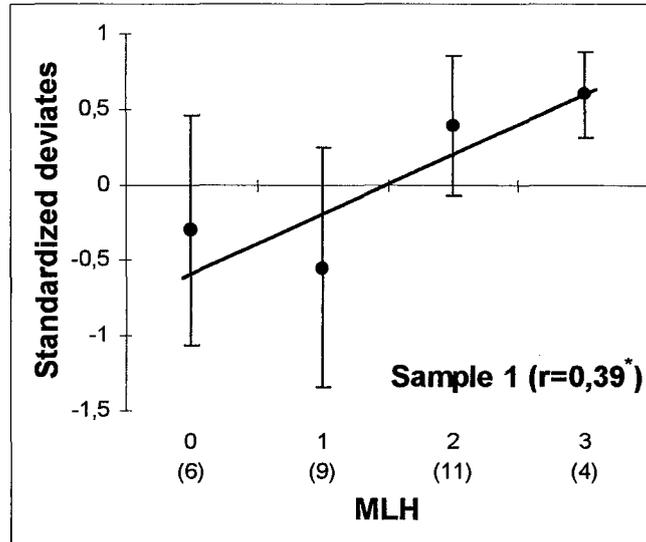


Figure 3 *Penaeus stylirostris*. Poids standardisé moyens (intervalle de confiance à 95%) en fonction de l'hétérozygotie multilocus (MLH, nombre de locus hétérozygotes par individu), pour un échantillon de la population COP. La courbe de tendance linéaire est représentée et r est le coefficient de corrélation. Le nombre d'individus par classe de MLH est indiqué entre parenthèses.

Encadré 2 Résumé de l'article "Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*" soumis à *Aquaculture*

Correlation between microsatellite heterozygosity and growth was investigated in two Tahitian hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*, maintained at a small effective size for more than 15 years. Despite a small sample size and a small number of loci screened, a significant correlation was detected between microsatellite tri-locus heterozygosity and growth in one of both stocks ($r = 0.3$, $p = 0.02$). In the other stock, the positive correlation was not significant but the combined test of single locus heterozygote advantage over the three loci was significant ($p = 0.005$). DNA markers, whose neutral status is hardly questionable, allowed us to reject the hypothesis of direct overdominance at marker loci. The magnitude of associative overdominance may provide an index of the genetic health of a hatchery-propagated stock (for the phenotypic parameter under study) through the evaluation of inbred load. The depression associated with each locus in our case is above or equivalent to the amount observed for a 10 % increase of inbreeding in other species. These results suggest that there is a high genetic load for growth in Tahitian *P. stylirostris* stocks and that the slow increase of inbreeding during hatchery propagation was inefficient to purge the ancestral load.

6. REFERENCES

- BELKHIR K., BORSA P., GOUDET J., CHIKHI L., BONHOMME F. 1996. *GENETIX, Logiciel sous WINDOWS TM pour la génétique des populations, version 3.3*. Université Montpellier 2, Montpellier.
- BIERNE N., BEUZART I., VONAU V., BONHOMME F., BEDIER E., AQUACOP, 1998. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, soumis
- BROOKER A., BENZIE J.A.H., BLAIR D., VERSINI J.-J. 1999. Population structure of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, in Australian waters, using microsatellite markers. *Marine Biology*, sous presse.
- GARCIA DE LEON F.J., DALLAS J.F., CHATAIN B., CANNONE M., VERSINI, J., BONHOMME, F. 1995. Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Perciformes, Serranidae). *Molecular marine Biology and Biotechnology* 4, 62-68.
- NACIRI M., LEMAIRE C., BORSA P., BONHOMME F. 1999. Genetic studio of the Atlantic / Méditerranéen transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Heredity*, sous presse.
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- OHRESSER M., BORSA P., DELSERT C. 1997. Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1*: a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk and *M. edulis* L. *Molecular marine Biology and Biotechnology* 6, 123-130.
- VONAU V., OHRESSER M., BIERNE N., DELSERT C., BEUZART I., BEDIER E., BONHOMME F. 1999. Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Animal Genetics*, 30, sous presse.

**12. ANNEXE 4 :
RAPPORT D'ACTIVITE DE L'ANNEE 1998**

SOMMAIRE

1. PRÉAMBULE	120
2. HUITRES (CRASSOSTREA GIGAS, C. ANGULATA, OSTREA EDULIS)	120
2.1. DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX MARQUEURS MICROSATELLITES CHEZ CRASSOSTREA GIGAS 120	
2.2. ÉTUDE DE LA STRUCTURATION DES POPULATIONS NATURELLES D'OSTREA EDULIS PAR ANALYSE DU POLYMORPHISME MICROSATELLITAIRE	121
3. LOUP (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	126
3.1. TYPAGE MICROSATELLITE DE LOUP - ANALYSE DE PARENTÉ	126
3.1.1. <i>Génotypes des géniteurs</i>	126
3.1.2. <i>Assignment de parenté</i>	127
3.1.3. <i>Conclusion</i>	127
3.2. DÉLIMITATION GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS NATURELLES DE LOUP DICENTRARCHUS LABRAX EN MÉDITERRANÉE OCCIDENTALE	127
4. MOULE (<i>MYTILUS SPP.</i>)	129
4.1. CARACTÉRISATION DE POPULATIONS <i>M. GALLOPROVINCIALIS</i> SUR LES CÔTES NORD OUEST AFRICAINES	129
4.2. MISE EN ÉVIDENCE DE GÈNES DE <i>M. EDULIS</i> CHEZ LES <i>M. TROSSULUS</i> EN MER BALTIQUE .	130
4.3. CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DE POPULATIONS ÉCHANTILLONNÉES DANS LA ZONE DE SYMPATRIE ENTRE <i>M. EDULIS</i> ET <i>M. GALLOPROVINCIALIS</i>	130
5. RECHERCHE DE MARQUEURS INTRONNIQUES CHEZ LES CREVETTES PÉNÉIDES (<i>Penaeus monodon</i> et <i>P. stylirostris</i>)	131
5.1. LOCALISATION DES INTRONS ET DESSIN DES AMORCES PCR.	132
5.2. 1- RECHERCHE DE POLYMORPHISME DE LONGUEUR.	133
6. NACRES (<i>Pinctada margaritifera</i>)	135
7. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	137
8. RÉCAPITULATIF DES PUBLICATIONS ACCEPTÉES OU SOUMISES PENDANT LA DURÉE DU PRÉSENT CONTRAT	138

1. PREAMBULE

Le présent rapport couvre la 4ème année d'existence de l'URM 16. Il fait suite à 4 autres rapports et précède de quelques semaines le bilan global des 4 années d'existence qui sera délivré en septembre 99. Aussi nous ne reprendrons pas encore une fois la liste des objectifs assignés à l'URM et qui se sont d'ailleurs étoffés au cours du temps. Nous rappellerons simplement l'objectif général, qui était de contribuer au développement et à l'utilisation de marqueurs génétiques sur différentes espèces d'intérêt aquacole et halieutique (bivalves : huîtres, nacrés, moules ; crustacés : crevettes pénéides ; poissons : loup ou bar). Les applications envisagées touchaient aussi bien les programmes d'amélioration génétique que la gestion des stocks naturels. Pour des raisons contractuelles, le présent rapport ne fait mention que de ce qui a été réalisé au laboratoire LGPI à Sète, mais il est bien clair que l'ensemble de ces recherches s'est développé en interaction forte avec les laboratoires IFREMER correspondants (La Tremblade, Tahiti, Palavas)

2. HUITRES (CRASSOSTREA GIGAS, C. ANGULATA, OSTREA EDULIS)

2.1. Développement de nouveaux marqueurs microsatellites chez *Crassostrea gigas*

Dans le cadre du programme Genephyt et de la thèse en cours d'Arnaud Huvet, il a été décidé de développer à Sète de nouveaux marqueurs microsatellites chez l'huître creuse où ceux-ci étaient déficitaires.

Un clonage a donc été entrepris, après digestion de l'ADN total par un mélange des trois enzymes de restriction Alu I, Rsa I, Hae III. Après criblage par des sondes oligonucléotidiques appropriées, 4 locus dinucléotides polymorphes ont finalement été retenus, dont certains montraient un fort niveau de variabilité. L'un d'entre eux (L10) a été typé subséquentement sur 468 individus appartenant aux espèces *C. gigas* et *C. angulata* d'origines géographiques différentes sur lesquels 56 allèles ont pu être dénombrés.

Tableau 1. Caractérisation de quatre locus microsatellites polymorphes chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. AT est la température optimale de réassociation, He l'hétérozygotie attendue et Ho l'hétérozygotie observée. 468 individus ont été typés au locus L10 et 17 pour les trois autres.

Locus	Repeat array	Primer sequences (5'→3')	TA (°C)	[MgCl ₂] (mM)	Allele number	Ho	He	Mean size range of PCR product (bp)
L8	(AG) ₂₂	AGAGGTTCAATGACGCTGGTG GATAAACAGTTTTCTGGTGTAC	57	1	14	0.54	0.85	181
L10	(AG) ₂₆	GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC CATGTTTTCCCTTGACTGATCC	55	1	20	0.83	0.90	136
L16	(AG) ₂₄	CGGACGAATAAGATATTTGGTC TGGATCTGCGCATCATCTCG	57	1	15	0.64	0.83	164
L48	(GA) _{n>30}	TCAAACCATCTGCTCGTCTACG TCCGAAAATCCAGGAATACCGG	60	1.5	13	0.73	0.87	161

(tiré de Huvet *et al.* soumis)

Par ailleurs, nous avons également examiné la conservation de ces locus (c. à d. leur amplifiabilité) chez 10 espèces du genre *Crassostrea* et 2 du genre *Saccostrea*, comme présenté dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Amplifiabilité de quatre locus microsatellites à travers 12 espèces

Species	N	Locus			
		L8	L10	L16	L48
<i>Crassostrea angulata</i>	10	+	+	+	+
<i>Crassostrea ariakensis</i>	5	-	1 + of 5 tested	+	+
<i>Crassostrea sikamea</i>	5	-	+	+	+
<i>Crassostrea virginica</i>	5	-	-	1 + of 5 tested	+
<i>Crassostrea iredalei</i>	1	-	-	-	-
<i>Crassostrea belcheria</i>	1	-	-	-	-
<i>Crassostrea margaritacea</i>	3	-	-	-	-
<i>Crassostrea echinata</i>	5	-	-	-	-
<i>Crassostrea gasar</i>	5	-	-	-	?
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	4	-	-	-	?
<i>Sassostrea cucullata</i>	5	-	-	-	?
<i>Sassostrea commercialis</i>	4	-	-	-	?

+ amplification, - pas d'amplification, ? légère amplification mais génotypes illisibles
(tiré de Huvet *et al.* soumis)

Ces résultats ont fait l'objet d'une note technique soumise à la revue *Animal Genetics* (Huvet *et al.*, soumis).

2.2. Étude de la structuration des populations naturelles d'*Ostrea edulis* par analyse du polymorphisme microsatellitaire

Les études génétiques préexistantes, reposant uniquement sur l'étude des polymorphismes enzymatiques, ont montré une certaine différenciation génétique entre Atlantique et Méditerranée (Jaziri, 1990; Saavedra *et al.*, 1993, 1995). Au sein de chaque mer, de très faibles différenciations apparaissent entre la Scandinavie et le reste de l'Atlantique (Johanesson *et al.*, 1989), et en Méditerranée entre ouest et est (Saavedra *et al.*, 1993, 1995), mais globalement la différenciation entre populations semble faible. Ces résultats suggèrent l'existence d'un fort flux génique, conduisant à l'homogénéisation de la variabilité génétique, puis d'un contact secondaire entre deux stocks, atlantique et méditerranéen, peut-être après séparation et évolution indépendante pendant les glaciations du Quaternaire ou bien à cause d'un flux résiduel très limité à travers Gibraltar.

Dans le cadre de la thèse de Sophie Launey, nous avons donc entrepris une comparaison des différenciations déjà connues au niveau des protéines isozymiques avec celle que pouvaient présenter des marqueurs réputés neutres. La comparaison des deux types de résultats devrait être riche d'enseignement au vu de la controverse suscitée par une étude analogue sur

Crassostrea virginica, fortement médiatisée (Karl & Avise, 1992, McDonald *et al.*, 1996).

Tableau 3. Treize populations naturelles d'*Ostrea edulis* ont été échantillonnées sur les côtes atlantique (de la Norvège au Portugal) et méditerranéenne (Nord Méditerranée) :

Origine géographique	Code	Effectif
Atlantique Nord		
Norvège	OSL	48
Pays-Bas	PBA	27
Irlande-Nord	IRN	50
Irlande-Sud	IRS	50
Normandie	NOR	34
Atlantique Sud		
Quiberon	QUI	49
La Rochelle	ROC	44
Espagne (Galice)	GAL	35
Portugal	POR	14
Méditerranée Ouest		
Etang de Thau	THA	50
Port Saint Louis du Rhône	RHO	50
Méditerranée Est		
Venise	VEN	23
Croatie	CRO	50

Cinq locus microsatellites précédemment isolés au laboratoire (Naciri *et al.* 1995, Launey *et al.*, soumis) ont été analysés sur l'ensemble des individus : *OeduJ12*, *OeduH15*, *OeduU2*, *OeduO9* et *OeduT5*. Les résultats obtenus ont été soumis à une série d'analyses classiques en génétique des populations. Nous relèverons un certain nombre d'entre eux :

Tableau 4. Nombre total d'allèles par locus et nombre moyen d'allèles par région géographique (N_{am}).

Région	N	J12	U2	H15	O9	T5	N_{am}
Atlantique N	154	25	31	16	21	28	24.2 (5.3)
Atlantique S	181	23	32	18	22	27	24.4 (4.8)
Méditerranée O	99	25	30	16	24	27	24.4 (4.7)
Méditerranée E	73	24	31	17	25	25	24.4 (4.5)

Ces chiffres apparaissent comme très similaires, mais les tailles d'échantillons sont très différentes. Quand on corrige ceux-ci par des méthodes de ré-échantillonnage, on obtient ceci : pour trois locus (*OeduT5*, *OeduO9*, *OeduU2*), *MedE* et *MedO* ont plus d'allèles que *AtIN* et *AtIS*. Pour les deux autres locus,

MedE a la richesse allélique la plus élevée, suivi de MedO/AtIS, et enfin AtIN est l'échantillon le moins polymorphe.

Les valeurs des index de fixation F_{st} entre populations à l'intérieur des zones géographiques et entre zones sont présentées ci-dessous (estimateur de Weir et Cockerham).

Tableau 5. Valeur de F_{st} à l'intérieur et entre régions géographiques

Régions	F_{st}
Atlantique	0,014 ***
Méditerranée	0,017 ***
Atlantique / Méditerranée	0,010 ***
Méditerranée E / le reste	0,019 ***

- Structuration géographique

Il existe une structuration faible entre les populations de l'Atlantique comme semble l'indiquer la valeur de $F_{st}=0.014$ significative. Les plus fortes différenciations sont observées entre la population de Norvège et les autres; toutes les valeurs de F_{st} entre cette population et les autres sont significatives, bien que faibles (entre 0.015 et 0.049).

En Méditerranée, la valeur de F_{st} de 0.017, significative, semble indiquer une différenciation faible entre les populations méditerranéennes, différenciation due essentiellement aux populations de la Méditerranée Est.

Entre Méditerranée et Atlantique nous observons une différenciation significative, mais qui est plus faible que la différenciation entre populations au sein de chacune des origines géographiques ($F_{st} = 0.010$, $p < 0.001$).

Ceci se traduit notamment dans la figure 1 suivante, qui illustre l'existence d'une relation entre distance géographique et différenciation génétique. Les tests de Mantel associés à ce graphe sont significatifs.

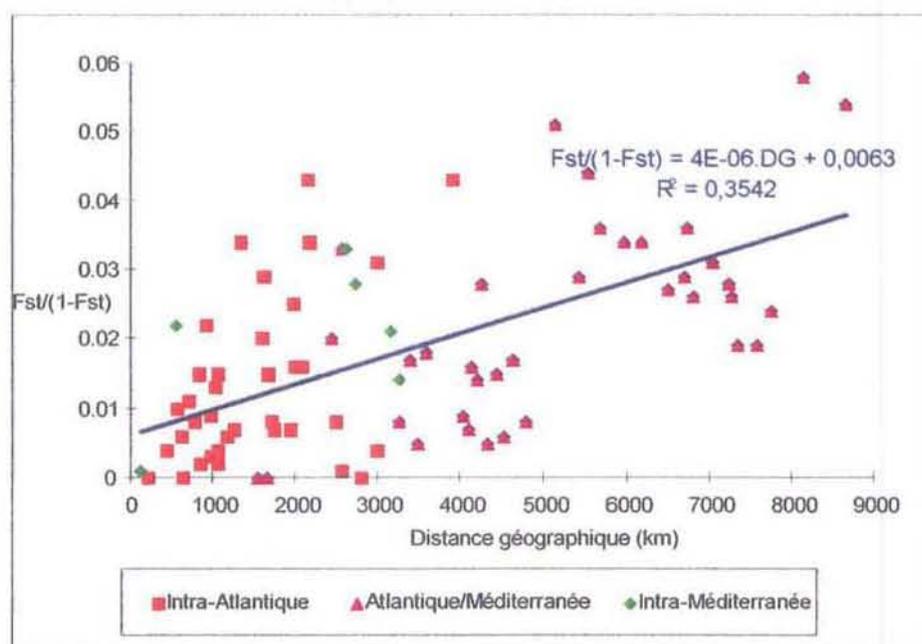


Figure 1 .Régression entre distance géographique (mesurée ici comme $F_{st}/1-F_{st}$) et distance géographique

Une autre façon de représenter les niveaux de différenciation génétique obtenus est d'établir un arbre à partir de la matrice des distances génétiques (figure 2):

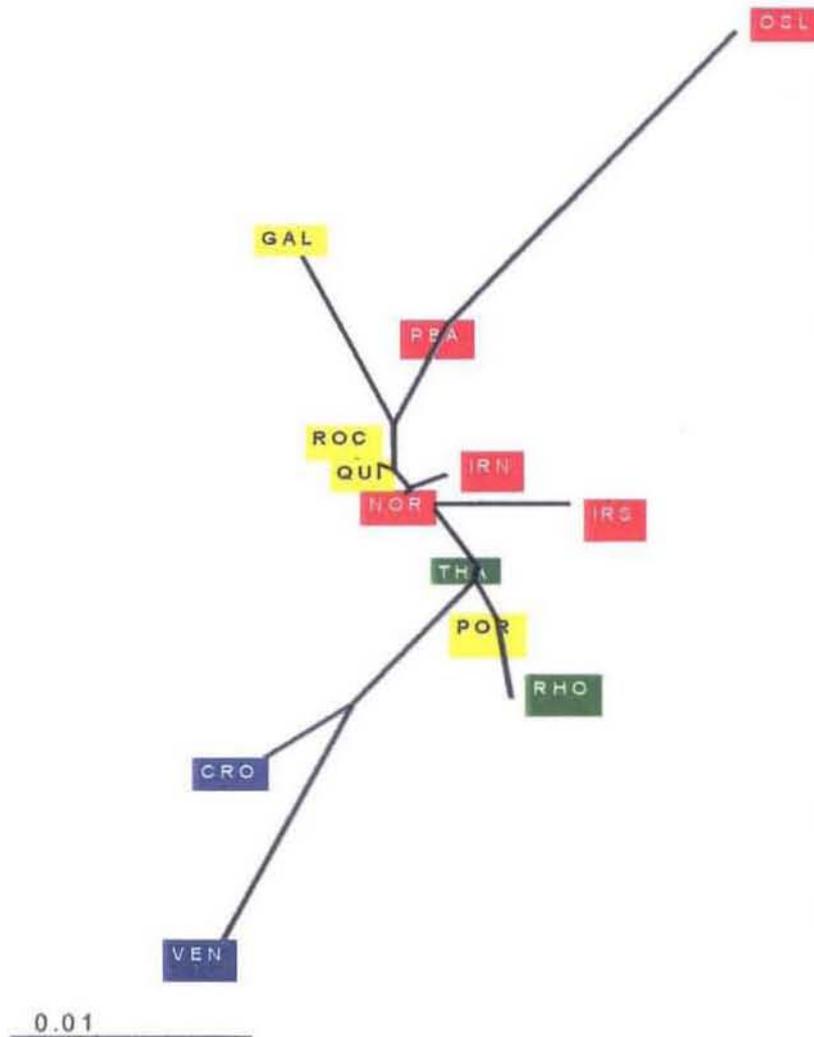


Figure 2 . Arbre obtenu par l'algorithme du Neighbor-joining à partir des distances de Reynolds entre populations d'huître plate.

On notera sur cet arbre la position intermédiaire de l'échantillon de l'Étang de Thau entre Atlantique et Méditerranée. Sur la base du calcul du F_{st} et des distances de Nei inférées à partir de 12 locus allozymiques, Jaziri (1990) avait déjà montré que la population de l'Étang de Thau est génétiquement plus proche des populations atlantiques que des populations méditerranéennes. Cela peut s'expliquer par l'importation massive d'huîtres atlantiques dans l'Étang de Thau pour grossissement et engraissement (Pichot, comm.pers.), bien que cette pratique touche essentiellement *C. gigas*. Ces géniteurs atlantiques auraient pu participer à la reproduction, ce qui expliquerait une introgression d'allèles atlantiques à Thau.

En conclusion, il apparaît que la structuration génétique révélée par les microsatellites est remarquablement congruente avec celle révélée par les marqueurs allozymes :

Tableau 6 . Valeurs de *Fst* global estimé sur l'ensemble de l'aire de répartition d'*Ostrea edulis*, à l'aide de locus allozymes (15 populations, de la Norvège à la Turquie, d'après Saavedra *et al*, 1993) et de marqueurs microsatellites (13 populations, de la Norvège à la Croatie, en gras)

Locus	<i>Fst</i>
OeduU2	0.009
OeduT5	0.013
MDH-1	0.017
ldh-2	0.018
PGI	0.020
OeduO9	0.020
OeduJ12	0.024
OeduH15	0.027
ALDH	0.029
ME-1	0.032
Est-3	0.045
PGM	0.046
Est-5	0.059
ARK	0.289

Les valeurs de *Fst* global sur l'ensemble de l'échantillonnage révélées par les microsatellites ne sont pas différentes de celles révélées par les allozymes, et même, le *Fst* moyen sur les locus allozymes (0.058) est plus élevé que le *Fst* moyen sur les locus microsatellites (0.018), même si les deux valeurs ne sont pas significativement différentes. Ces résultats tendraient à confirmer la nature essentiellement neutre des polymorphismes rencontrés.

L'ensemble de ces résultats est en cours de publication.

3. LOUP (*Dicentrarchus labrax*)

3.1. Typage microsatellite de Loup - Analyse de parenté

Le but de ce travail était de typer le plus rapidement et le plus efficacement possible la descendance d'un croisement 3 femelles x 9 mâles. Nous disposions pour ce faire de fragments de nageoires, conservés dans de l'alcool, des 12 géniteurs et de 600 descendants du croisement. La première partie du travail consistait à génotyper les géniteurs afin de choisir parmi les 6 locus microsatellites à notre disposition (Labrax 3, Labrax 6, Labrax 8, Labrax 13, Labrax 17 et Labrax 29) les locus qui permettaient la meilleure assignation. La deuxième partie consistait à génotyper les 600 descendants afin d'assigner la parenté du plus grand nombre possible d'individus. Sur les 600, l'ADN de 545 individus a été extrait convenablement par la méthode de chelex (Singer Sam et al., 1989) modifiée par Garcia De Leon (1995) (l'échec des 55 extractions peut être attribué à l'évaporation de l'alcool qui s'est produite dans certain tubes). Sur les 545 individus dont l'ADN a été convenablement extrait, l'assignation de parenté a été réalisée pour 502 d'entre eux.

3.1.1. Génotypes des géniteurs.

L'analyse des génotypes parentaux a révélé que les locus les plus informatifs étaient Labrax 13 et Labrax 29 (Labrax 3 était lui aussi intéressant mais des problèmes d'amplification ont été rencontrés sur ce locus en début d'étude).

Tableau 7

Locus :	Labrax 13	Labrax 29	Labrax 3	Labrax 17	Labrax 8	Labrax 6
femelle A	138144	120162	122182	138140	196232	170170
femelle B	140170	146182	182184	118118	210210	169172
femelle D	156160	144172	144144	118128	210210	169170
mâle 1	138160	144144	156176	118134	210212	169169
mâle 2	152154	144166	144166	134136	220224	169169
mâle 3	152158	136176	144178	136140	200210	168168
mâle 5	140158	162168	168180	118136	196220	168176
mâle 6	152170	138138	144162	118144	200220	169172
mâle 7	138162	144182	162178	128134	192220	169172
mâle 8	142156	172176	176178	118118	196224	168169
mâle 9	156182	138154	144180	118148	210210	168170
mâle 10	158166	144146		136138	210232	168169
mâle 11	156166	144168	142178	118134	230232	168168
mâle 12	152158	172172	144176	118136	210224	168170

3.1.2. Assignment de parenté.

Le premier locus utilisé, Labrax 13, a permis d'assigner la parenté de 161 individus sur 545 (soit 29,5%). Associés au locus Labrax 29, les génotypes dilocus ont permis d'assigner la parenté de 453 individus (soit 83%). Enfin, Labrax 3 a permis de compléter l'étude et d'assigner la parenté de 49 individus supplémentaires soit 502 individus (93%). Ceci s'est déroulé sur une période de neuf semaines(1 personne) pour exactement 1242 individus x locus.

3.1.3. Conclusion

Tableau 8. Nombre d'individus par famille :

	Femelle A	Femelle B	Femelle D	Total
Mâle 1	41	19	14	74
Mâle 9	30	22	14	66
Mâle 7	34	22	9	65
Mâle 12	34	24	4	62
Mâle 8	31	15	10	56
Mâle 10	25	13	15	53
Mâle 6	29	10	12	51
Mâle 2	29	8	12	49
Mâle 5	15	8	3	26
Total	268	141	93	502

Les résultats sur la survie montre un effet maternel significatif ($\chi^2 = 27.3$, $P = 6. 10^{-4}$) classiquement observé dans ce genre d'analyse (femelle A > femelle B > femelle D), mais également un effet paternel significatif ($\chi^2 = 97.7$, $P = 6. 10^{-22}$) plus rarement observé, avec peu d'interactions entre les deux effets. Les effectifs d'une bonne partie des 27 familles devraient permettre de comparer les croissances ou d'autres caractères phénotypiques variables entre familles, ce qui était un des objectifs poursuivis à Palavas. Ces résultats sont en accord avec l'expérience préliminaire rapportée par Garcia de Leon *et al.* (1998).

3.2. Délimitation génétique des populations naturelles de loup *Dicentrarchus labrax* en Méditerranée occidentale.

Grâce aux marqueurs microsatellites précédemment développés, et suite aux travaux précédemment menés de part et d'autre du détroit de Gibraltar qui avaient conduit à la mise en évidence de deux entités génétiquement différenciées chez le loup (ou bar) entre l'Atlantique (+ mer d'Alboran) et la Méditerranée occidentale (Naciri *et al.* sous presse), nous avons étendu notre échantillonnage vers l'est.

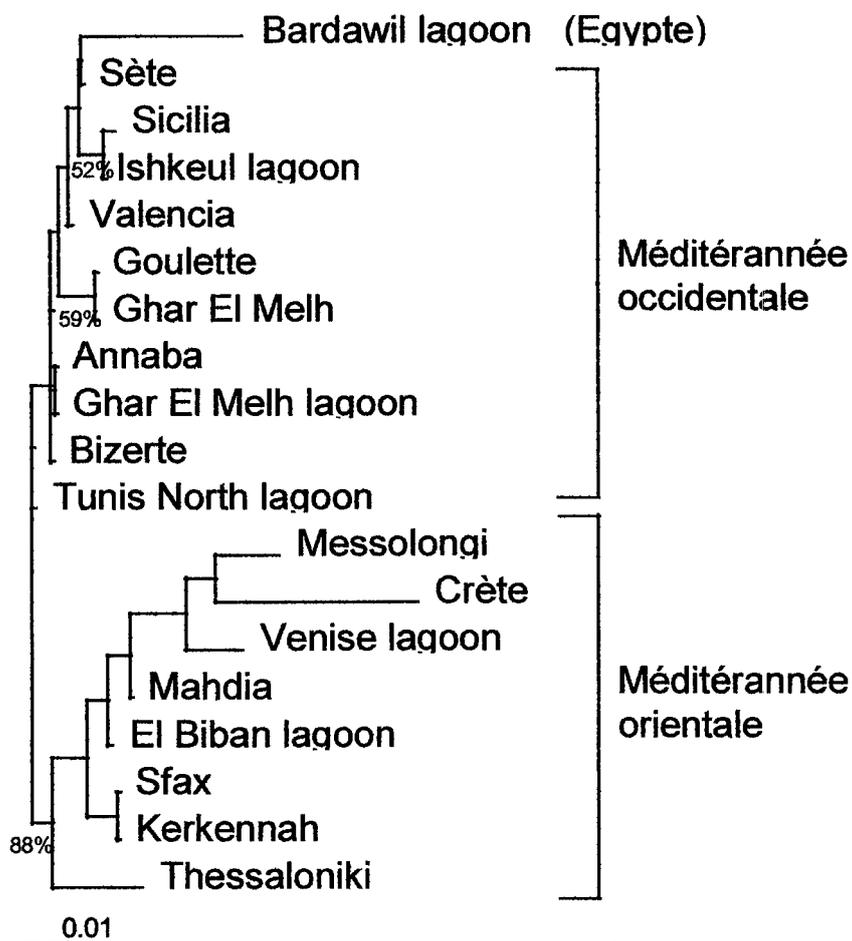
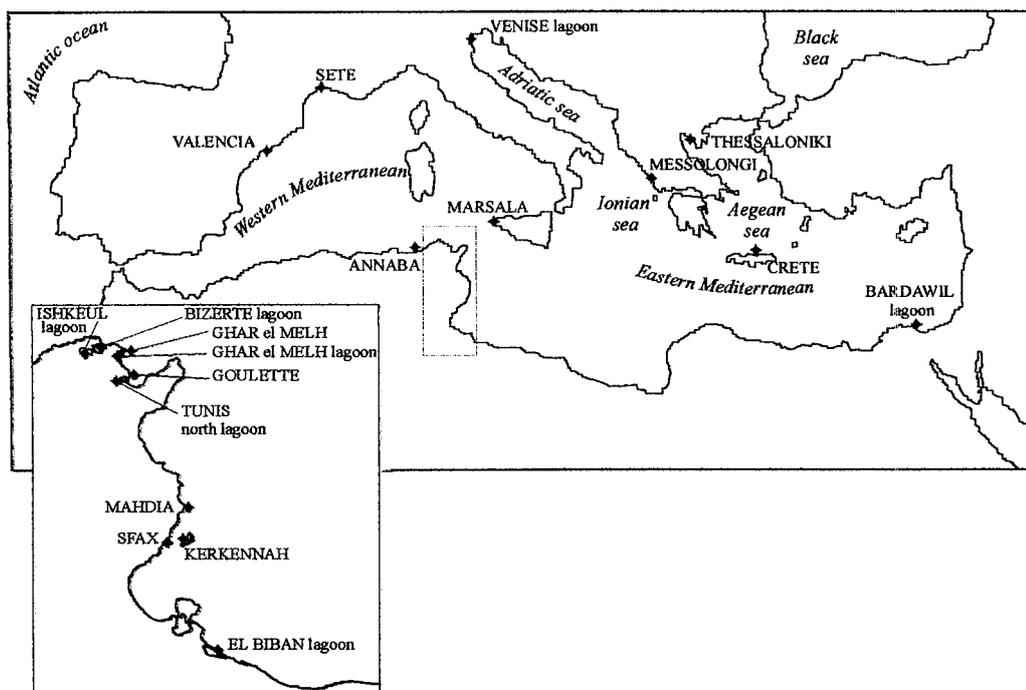


Figure 3: Provenances géographiques et arbre de distances génétiques de Reynolds montrant une séparation des populations de loups *D. labrax* de Méditerranée occidentale et orientale (d'après Bahri-Sfar *et al.*, soumis).

541 individus regroupés en 19 échantillons provenant des bassins occidental et oriental de la Méditerranée ont ainsi été typés à 6 locus. L'arbre obtenu à partir des distances génétiques de Reynolds (figure 3) montre deux groupes distincts bien séparés, avec des regroupements géographiques logiques à l'exception d'un échantillon en provenance de la lagune de Bardawil (Égypte) qui présentait des affinités claires avec les populations occidentales. Ce fait est à mettre en rapport avec l'introduction de stock d'élevage en provenance de l'Ouest dans cette lagune il y a une quinzaine d'année. Par ailleurs, le bassin occidental semble génétiquement très homogène ($F_{st} = 0,0014$, n.s.), alors que les échantillons situés plus à l'est étaient globalement beaucoup plus hétérogènes ($F_{st} = 0,026$, $p < 0,001$). Ceci est à mettre en rapport avec une fragmentation plus poussée de la Méditerranée orientale en mers plus ou moins indépendantes (Ionienne, Égée, Adriatique,...) et peut-être à une distribution plus fragmentée des populations de loup dans ce bassin.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis et seront poursuivis sous forme d'une exploration plus approfondie de l'impact des populations d'élevage sur les stocks naturels.

4. MOULE (*MYTILUS* SPP.)

4.1. Caractérisation de populations *M. galloprovincialis* sur les côtes nord ouest africaines.

Les relations génétiques entre des populations *M. galloprovincialis* échantillonnées sur les côtes atlantiques Nord-Est ont été étudiées grâce au locus de l'intron n°1 du gène nucléaire *mac-1* de l'actine. Pour cela, nous avons comparé des échantillons de *Mytilus* des côtes Nord-Ouest africaines (Maroc, Sahara occidental et Mauritanie) à des échantillons de référence pour chacune des deux espèces *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Nos résultats montrent que les moules nord-ouest africaines appartiennent à l'espèce *M. galloprovincialis* et confirment ce qu'on pouvait prédire d'après les données morphologiques et la localisation géographique. Ils mettent aussi en évidence une différence génétique significative entre ces populations *M. galloprovincialis* nord-ouest africaines, ainsi que des populations échantillonnées au Portugal et des populations *M. galloprovincialis* de Méditerranée.

Ce résultat est en accord avec les données allozymiques et mitochondriales qui mettaient en évidence une différenciation entre les populations de l'Atlantique Nord-Est et celles de la Méditerranée. Ces résultats font l'objet d'une publication parue dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (Daguin & Borsa, 1999).

4.2. Mise en évidence de gènes de *M. edulis* chez les *M. trossulus* en Mer Baltique.

M. edulis et *M. trossulus* présentent une zone de sympatrie dans la région de l'Éresund à l'entrée de la Mer Baltique. Des études allozymiques ont été menées dans cette région et ont montré que la transition entre les deux espèces se faisait de façon assez abrupte et clinale. Nous avons ici utilisé le marqueur Glu 5' qui est diagnostique de ces deux espèces pour caractériser un échantillon de moules provenant de Gdansk, simultanément à des échantillons de populations *M. edulis* et *M. trossulus* de référence (respectivement au Danemark et en Californie). Nous avons ainsi pu montrer que l'échantillon de Gdansk présentait bien des allèles identiques à ceux rencontrés dans les *M. trossulus* de Californie, mais qu'il contenait aussi des allèles caractéristiques de *M. edulis*. Ce résultat est assez surprenant étant donné l'éloignement de cette population vis à vis de la zone hybride. Pour expliquer cela, une hypothèse serait que *M. edulis* ait été introduite récemment de manière accidentelle dans la région de Gdansk, où elle aurait introgressé *M. trossulus*. Dans ce cas, il faudrait que les individus *M. edulis* puissent persister dans cet environnement particulier qu'est la Baltique. Une autre hypothèse serait que la zone hybride entre *M. edulis* et *M. trossulus* dans l'Éresund serait plus perméable aux allèles Glu 5' qu'aux allèles mitochondriaux et enzymatiques. Cela pourrait être expliqué par une contre-sélection faible voire nulle des allèles *M. edulis*. Ces résultats font l'objet d'un article sous presse dans *Journal of Molluscan Studies* (Borsa et al. 99, sous presse)

4.3. Caractérisation génétique de populations échantillonnées dans la zone de sympatrie entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

Le polymorphisme de longueur dans l'intron du gène *mac-1* a aussi été utilisé pour caractériser une vingtaine de populations échantillonnées dans la zone de sympatrie entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* sur les côtes françaises, ainsi que des populations pures de référence pour chacune des deux espèces. Une analyse factorielle des correspondances réalisée à partir des fréquences alléliques a permis de visualiser un gradient d'introgression *M. edulis* - *M. galloprovincialis* sur le premier axe factoriel. La position sur cet axe des populations géographiquement intermédiaires témoigne de l'ampleur variable de l'introgression suivant les sites. Ce gradient génétique *M. edulis* - *M. galloprovincialis* ne correspond pas au gradient géographique le long des côtes françaises, donnant l'image d'une zone hybride en mosaïque constituée de populations pures et de populations génétiquement intermédiaires (Figure 4).

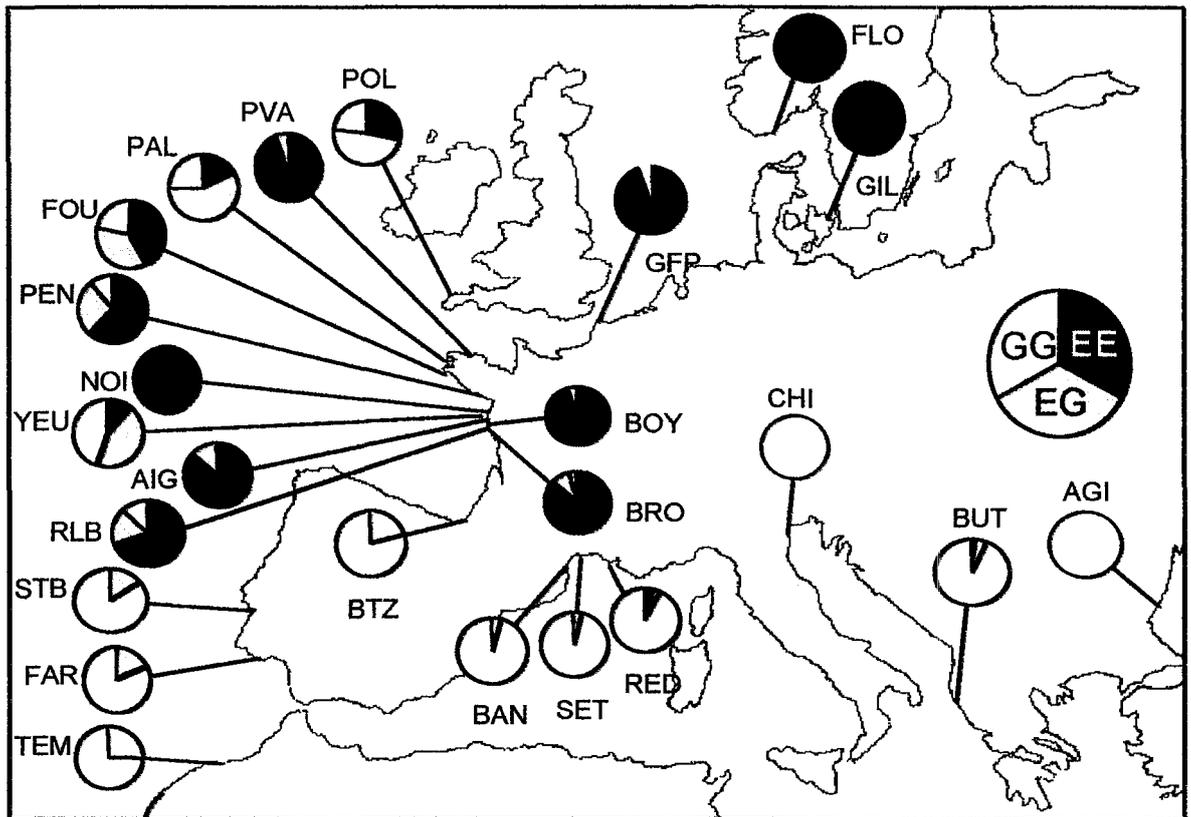


Figure 4. Fréquences génotypiques au locus *mac-1* obtenues après regroupement des différents allèles trouvés dans les populations en deux allèles synthétiques E (pour *M. edulis*) et G (pour *M. galloprovincialis*).

Une étude détaillée des génotypes dans ces populations intermédiaires nous a permis de conclure que certaines étaient constituées d'individus présentant des génotypes hybrides alors que certaines comprenaient plutôt un mélange d'individus parentaux. La complexité génétique de cette zone et son maintien malgré l'hybridation restent à expliquer, au regard des fortes capacités de dispersion de ces animaux grâce à leur phase larvaire et de sélection via des taux de mortalités importants pendant cette phase.

5. RECHERCHE DE MARQUEURS INTRONIQUES CHEZ LES CREVETTES PENEIDES (*Penaeus monodon* et *P. stylirostris*)

Les introns ont été décrits comme étant de bonnes cibles pour développer des marqueurs moléculaires (Lessa, 1992 ; Palumbi 1995). Pourtant, la plupart des études sur le polymorphisme intronique se sont focalisées sur peu de gènes et souvent le polymorphisme a été trouvé par chance. Aussi, aucune étude jusqu'à celle-ci n'a consistée en une recherche systématique de marqueurs dans les introns. Pour amplifier un intron, on peut dessiner les amorces de PCR de part et d'autre de l'intron, dans les exons. Cette approche appelée EPIC-PCR (Palumbi, 1995), pour exon-primed intron-crossing PCR, présente plusieurs avantages : (i) en dessinant les amorces PCR à partir de séquences de gènes hétérologues (dans d'autre espèce que l'espèce cible), le clonage et le séquençage peuvent être éliminés (Côte-Real et al., 1994), (ii) parce que les séquences exoniques sont mieux conservées entre espèces, le transfert des locus détectés sur d'autres espèces devrait être plus facile que pour des

amorces dessinées dans des séquences non codantes, (iii) pour la même raison, à l'intérieure de l'espèce, les artefacts de PCR, comme les allèles nuls, devraient être moins fréquents.

Le genre *Penaeus* comprend de nombreuses espèces d'intérêt commercial (Holthuis 1980). Au Centre Océanologique du Pacifique, 4 espèces de ce genre sont élevées et étudiées. Il est donc d'un grand intérêt de disposer de marqueurs facilement transférables d'une espèce à l'autre. Or, les similarités morphologiques entre les différentes espèces de Pénéides masquent d'importantes divergences phylogénétiques, et les différences génétiques entre espèces sont d'un même ordre de grandeur que les différences entre genre de Mammifères (Palumbi et Benzie, 1991 ; Baldwin et al., 1998). Il n'est donc pas étonnant que les locus microsatellites aient montré un faible taux de transfert entre espèces (Moore et al., 1999 ; Vonau et al., 1999). Une partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Steve Moore à Brisbane.

Le polymorphisme de longueur d'intron a révélé une variabilité importante et a été utilisé avec succès dans plusieurs études de génétique des populations, notamment au laboratoire sur les moules du genre *Mytilus* (Ohresser et al., 1997 ; Daguin et Borsa, 1999). Cette étude s'est donc focalisée sur ce type de polymorphisme mais d'autres polymorphismes de séquences sont désormais accessibles avec les amorces PCR décrites.

Deux espèces de Pénéides, *P. monodon* et *P. vannamei* ont été utilisées pour le criblage de la variabilité de longueur d'intron et les tests d'amplification hétérologue, et les introns polymorphes ont également été testés sur *P. japonicus*.

5.1. localisation des introns et dessin des amorces pcr.

Les amorces PCR ont été dessinées en utilisant des séquences d'ADN génomique (tableau 8b) ou des séquences partielles d'ADNc déterminées, *de novo*, d'une banque d'ADNc de *P. monodon* (Lehnert et al., sous presse). La méthode utilisée pour localiser les introns dans ce deuxième cas, a consisté à aligner, à l'aide du logiciel BLAST (Altschul et al., 1990), les séquences d'ADNc sur des séquences de la banque de données GenBank, afin de cartographier les introns à partir de gènes hétérologues. Les introns potentiels de 9 gènes ont été localisés avec cette méthode (tableau 9a). Les amorces ont été définies dans les exons flanquants, environ 20pb de chaque côté de la position de l'intron potentiel. Les EPIC-PCRs (voir les amorces dans le tableau 9) ont été testés pour l'amplification d'introns chez *P. monodon* et *P. vannamei* (toutes les PCR donnent un bon résultat pour une température d'hybridation de 54°C). Seules les deux paires d'amorces définies à partir de séquences d'Echinodermes n'ont pas amplifié d'intron.

Tableau 9 : Amorces PCR dessinées (a) à partir d'ADNc et (b) à partir d'ADN génomique.

Gene (intron number if known)	Species used for primer design (GenBank acc)	Species used for intron map	Primer names	Primer sequences (5'-3')	cDNA size (bp)	gDNA size (bp)	Length polymorp- hism
a- designed from cDNA sequences							
Amylase	<i>P.vannamei</i> (#X77318)	<i>D.melanogaster</i>	PvAmy-F PvAmy-R	TGGAAGTGGTCCGACATCGC CGGAGCGAGTGACGAGTTTATAGG	172	380	Pm : yes Pv : yes
Elongation Factor 2	<i>P.monodon</i>	Consensus from several species	PmE2-F PmE2-R PjEF2-R	GTCTTCGTGCAGGAGAACTCG GAGGGCGAGGTTCTCTGCTCACTCCAGC GAGGGCGAGGTTCTCTCACTCAGCA	122	300	Pm : yes Pv : yes Pj : yes
Tropomyosin I	<i>P.monodon</i>	<i>D.melanogaster</i>	PmTmI-F PmTmI-R	AATTCGGCACGAGGGCAGGC TGCATCTTCTTCTTGATGGCG	109	500	Pm : no Pv : no
Tropomyosin II	<i>P.monodon</i>	<i>D.melanogaster</i>	PmTmII-F PmTmII-R	GCTGCTCGAGGAGGACCTGG TCCTGTCCGGCTTCCCTCAGCC	203	800	Pm : no Pv : no
GTP Binding protein	<i>P.monodon</i>	<i>D.melanogaster</i>	PmGTPB-F PmGTPB-R	CCTATGGGTCACTGGGCTTG GTTGCTAAGCAGTGTGGACTTGC	180	300	Pm : no Pv : no
Myosin Light chain	<i>P.monodon</i>	<i>D.pseudoobscura</i>	PmMLC-F PmMLC-R	AATTCGGCACGAGGGCCCC GTTCAGGTTGAGGGCACCGC	178	500	Pm : no Pv : no
Opsin	<i>P.monodon</i>	<i>D.melanogaster</i>	PmOpsi-F PmOpsi-R	TTCGGCACGAGCAGCTCGC CATGTCCTCAGGCACCTGTGTCC	208	500	Pm : no Pv : no
Myosin Heavy chain	<i>P.monodon</i>	<i>S.purpuratus</i>	PmMHC-F PmMHC-R	CCAAGAAGTCTTGCTGGGTCC CATCTTCGCACCTTTCTCGTACTTGG	174	174	no intron
Actin	<i>P.monodon</i>	<i>S.purpuratus</i>	PmActi-F PmActi-R	CCATACCTTCTACAATGAGCTCCG GACCAGAGGGCTAGAGGAGAGC	178	178	no intron
b- designed from gDNA sequences							
Cathepsin L (intron 2)	<i>P.monodon</i>	<i>P.vannamei</i>	PmCatL-F PmCatL-R	GGTCACCTTCACGCTCCAGATG TTGAGGAAGCCGTTTCATGGTGG	-	-	Pm : no Pv : yes
Trypsin (intron 1)	<i>P.monodon</i>	<i>P.vannamei</i>	PmTryp-F PmTryp-R	TCGTGTTCTGTCTGTCTCCTCCG GGAAGGTGGGCTTCCCTTGAGGG	-	-	
Trypsin 3 (intron 1)	<i>P.monodon</i>	<i>P.vannamei</i>	PmTryp3-F PmTryp-R	GCCTTTGGTAAGTCAGATTACATTCC GGAAGGTGGGCTTCCCTTGAGGG	-	-	Pm : yes
Trypsin 3 (intron 1)	<i>P.vannamei</i> (#Y15040)	<i>P.vannamei</i>	PvTryp3-F PmTryp-R	CTTAAATAAGGGCTTGGGATAGAGGC GGAAGGTGGGCTTCCCTTGAGGG	-	-	Pv : yes
Chymotrypsin B (intron 6)	<i>P.vannamei</i> (#Y10665)	<i>P.vannamei</i>	PvChymB-F PvChymB-R	GCATTCGACTCCGAAGGAGGC CATGCCGTTGAGGTTGAGGG	71	160	Pm : yes Pv : no
Chymotrypsin A (intron 1)	<i>P.vannamei</i> (#Y10664)	<i>P.vannamei</i>	PvChymA-F PvChymA-R	GATGATCGGAAAGCTCTCACTCC GGGCTTCGGGGACTTCCAGTGCC	95	250	Pm : no Pv : no

5.2. 1- Recherche de polymorphisme de longueur.

Le polymorphisme de longueur a été recherché sur 40 *P.monodon*, 24 *P.vannamei* et 15 *P. japonicus*, sauvages. L'ADN a été extrait par la méthode de chelex (Singer Sam et al., 1989). Afin de détecter du polymorphisme de longueur d'intron, l'électrophorèse du produit de PCR marqué radioactivement au ³³P, a été réalisée sur gel de polyacrylamide 6%. Quatre gènes se sont ainsi révélés polymorphes chez *P. monodon* et *P. vannamei* (Tableau 9). Deux étaient polymorphes chez ces deux espèces (amylase et facteur d'élongation 2) et l'intron du gène du facteur d'élongation 2 l'était chez les trois espèces.

Les résultats du polymorphisme sont présentés tableau 10. Si le nombre d'allèle n'est pas très grand, les hétérozygoties sont souvent importantes. Comme le montre les tests de F_{is}, il n'y a pas de déviation significative à la panmixie.

Tableau 10: Détail du polymorphisme de longueur d'intron.

	Locus	No of H _{n,b}	F _{is}	Allele sizes (GenBank acc for the biggest allele or sequence and position of the deletion for shorter alleles)
P. monodon (n = 40)	PmAmy	2	0.49	0.2 ^{ns} 377 (#AF143514), 375 (TA, 200).
	PmEf2	3	0.1	- 0.03 ^{ns} 300 (#AF143516), 299 (A, 219), 296 (ATG, 197; A, 219).
	PmCB6	2	0.24	175, 160.
	PmTry3a	2	0.2	0.2 ^{ns} 340, 335.
	PmTry3b	2	0.44	0.13 ^{ns} 312, 313.
	PmTry3g	2	0.025	- 0.01 ^{ns} 300, 290 0 ^{ns}
P. vannamei (n = 24)	PvAmy	4	0.62	- 0.08 ^{ns} 356 (#AF143515), 354 (TC, 82), 353 (AAT, 133), 351 (TC, 82; -ATT, 133).
	PvEf2	4	0.6	- 312 (#AF143517), 310 (TC, 135), 309 (-), 299 (TGCTGAAGTAA, 219).
	PvTry3	6	0.68	0.04 ^{ns} 300 (-), 299 (#Y15041), 298 (C, 264), 296 (-), 295 (C, 240; TC, 258; C, 264),
	PvCatLa	3	0.53	0.21 ^{ns} 293 (-).
	PvCatLb	3	0.34	0.23 ^{ns} 228, 224, 218 182, 180, 178. - -0.21 ^{ns}
P. japonicus (n = 15)	PjEf2	4	0.68	0.12 ^{ns} 306 (#AF155240), 305 (T, 237), 302 (CA, 97; CC, 243), 301 (CA, 97; CCC, 243).

n : sample size ; H_{n,b} : unbiased expected heterozygosity ; ns : not significant ; - : allele not sequenced.

Departure of F_{is} from zero was tested using the permutation approach provided by the Genetix 3.3 software (Belkhir *et al.* 1996-1999).

Les paires d'amorces de l'intron du gène de la trypsine 2 et de l'intron du gène de la cathepsine L ont amplifié plusieurs fragments, puisque ces gènes font partie de familles multigéniques (Klein *et al.*, 1998 ; Le Boulay *et al.*, 1998). Les deux introns polymorphes des gènes de cathepsine L se sont révélés comme étant facilement distinguables par l'électrophorèse (voir la taille des allèles, tableau 9). Ce n'était pas le cas pour les gènes de trypsine 2. Une bande polymorphe a été excisée du gel, éludée dans de l'eau et amplifiée. Le produit de PCR a été séquencé directement et la séquence s'est avérée appartenir au gène de la trypsin 3. Des amorces spécifiques ont alors été définies à l'intérieur de l'intron pour *P. monodon* et *P. vannamei*. Chez *P. vannamei* la nouvelle paire d'amorces a amplifié un unique locus polymorphe. Chez *P.*

monodon trois locus facilement distinguables ont alors été amplifiés, suggérant soit une conservation des séquences introniques dans les autres gènes de trypsine soit la présence de pseudogènes, dans cette espèce.

Ce travail a fait l'objet de la soumission d'un article (Bierne, N. *et al.*, *Molecular Ecology*, soumis).

6. NACRES (*Pinctada margaritifera*)

Etude de la variabilité génétique et de la structure comparées de plusieurs populations de *Pinctada mazatlanica* des côtes pacifiques américaines et de *P. margaritifera* des côtes polynésiennes.

Dans le cadre de la thèse de Sophie Arnaud portant initialement sur la variabilité et la structure génétique de populations de *Pinctada mazatlanica* des côtes pacifiques, nous avons comparé les patrons de variabilité et de structure de cette espèce avec trois échantillons de populations de *P. margaritifera* de Polynésie, provenant des Marquises et des Tuamotu (Tableau 11). Cette étude a été faite par PCR-RFLP de deux gènes de l'ADN mitochondrial : la sous unité I de la Cytochrome oxydase (COXI) et le gène codant pour l'ARN 12S.

Tableau 11: Localités d'échantillonnage, nombre d'individus par échantillons, diversité haplotypiques et nucléotidiques estimées et répartition des haplotypes pour chacun des échantillons.

Sites de collecte (du Nord au Sud)	Nombre d'individus	Diversité haplotypique (±SE)	Diversité nucléotidique (%)	Haplotypes 'Maz' observés	Haplotypes "Marg" observés
<i>Mer de Cortez</i>					
Guaymas	48	0.859(±0.021)	0.014	1,2,3,4,6,7,9,11,13	
Mulégé	35	0.660(±0.062)	0.011	1,2,3,4,5,6	
Loreto	31	0.574(±0.080)	0.011	1,2,3,6	
Isla Espiritu Santo	34	0.747(±0.066)	0.008	1,2,3,6,7,8,9,10	
Bahia Merito	29	0.663(±0.068)	0.010	1,2,3,7,9	
<i>Côtes Pacifiques</i>					
Puerto Vallarta	39	0.657(±0.066)	0.010	1,2,3,6,11,12	
Manzanillo	14	0.275(±0.148)	0.006	2,3	
Puerto Angel	12	0.409(±0.133)	0.005	2,3	
Panama	21	0.000(±0.000)	0.000	3	
<i>Polynésie</i>					
Marquises	38	0.600(±0.078)	0.001		1,2,3,5,6,7
Takaroa	26	0.218(±0.103)	0.001		1,2,3
Takapoto	19	0.205(±0.119)	0.004		2,4,5

Aucun haplotype commun aux deux taxons n'a été observé, et l'arbre des haplotypes construit avec l'algorithme du Neighbor-Joining (Figure 5) montre que les coalescences des matrilineages sont différentes, ce qui corrobore l'hypothèse taxinomique selon laquelle on a affaire à deux espèces différentes (Ranson, 1951).

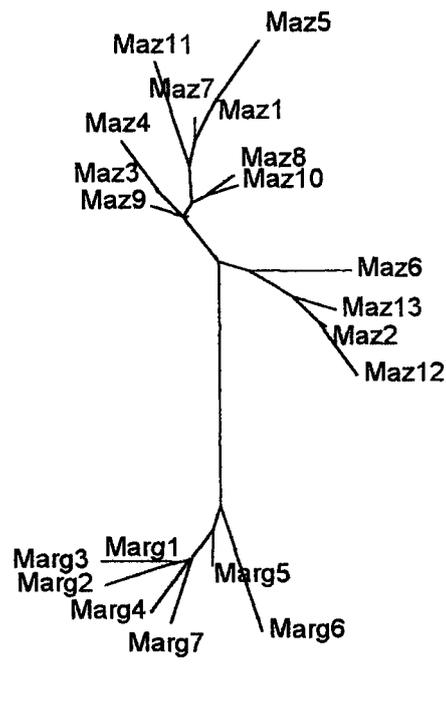


Figure 5: Arbre Neighbor-Joining des divergences nucléotidiques estimées entre haplotypes observés au Mexique (Maz 1-13) et en Polynésie (Marg 1-7).

Les nombres d'haplotypes observés sont sensiblement les mêmes dans les deux espèces (respectivement 11 et 13), mais l'organisation de leur répartition entre les populations est différente (Tableau 11). Il en résulte un fort polymorphisme en terme de diversité nucléotidique et une forte différenciation entre trois groupes de populations chez *Pinctada mazatlanica*, tandis que les populations de *P. margaritifera* de Polynésie se sont montrées moins variables, avec une légère différenciation des deux échantillons de populations Marquises/Tuamotu. Cette observation confirme les résultats obtenus lors de précédentes études allozymiques (Durand, 1987 ; Jabbour, 1988), selon lesquels la population des Marquises serait différenciée de tous les échantillons de populations des archipels Société/Tuamotu/Gambiers.

La différence entre les taux de variabilité nucléotidique estimés sur les échantillons des deux espèces amène à faire l'hypothèse d'une recolonisation récente de la Polynésie. Afin d'évaluer cette hypothèse et d'approfondir la comparaison entre les deux espèces, une étude plus complète de *P. margaritifera* est prévue dans le cadre de la thèse de Sophie Arnaud, incluant d'autres populations de Polynésie et des îles Cook et portant à la fois sur des marqueurs mitochondriaux et nucléaires.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- BELKHIR K., BORSA P., GOUDET J., CHIKHI L., BONHOMME F. 1996-1999. GENETIX, Logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations, version 3.3, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Université de Montpellier II, Montpellier France.
- CÔRTE-REAL H.B.S.M., DIXON D.R., HOLLAND P.W.H. 1994. Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Marine Biology*, 120, 407-413.
- DURAND P. 1987. Biologie et différenciation génétique chez la Nacre : *Pinctada margaritifera* (Linné 1758). *Doctorat de 3^{ème} cycle, Université Montpellier I* : 93pp.
- GARCIA DE LEON, F. J., DALLAS, J., CHATAIN, B., CANONE, M., VERSINI, J. & BONHOMME, f. 1995 Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Perciformes Serranidae). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 4, 62-68.
- HOLTHUIS L.B. 1980. *Shrimps and prawns of the world*. FAO Species Catalogue, FAO Fisheries Synopsis no. 125, vol. 1.
- KARL S.A., AVISE J.C. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science* 256: 100-102.
- KLEIN B., SELLOS D., VAN WORMHOUDT A.V. 1998. Genomic organisation and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. *Gene*, 216, 123-129.
- JABBOUR R. 1988. Etude de la variabilité génétique d'une espèce perlière de basse Californie Sud, Mexique : *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1855). *Diplôme d'études approfondies « Espaces et Société »*. Université Montpellier I.
- JAZIRI, H. 1990. Variations génétiques et structuration biogéographique chez un bivalve marin: l'huître plate *Ostrea edulis* (L.). Thèse de doctorat. Université de Montpellier II.
- JOHANNESSON K., RODSTROM E.M., AASE H. 1989. Low genetic variation in Scandinavian populations of *Ostrea edulis* L. - possible causes and implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- LE BOULAY C., SELLOS D., VAN WORMHOUDT A.V. 1998. Cathepsin L gene organization in crustaceans. *Gene*, 218, 77-84.
- LEHNERT S.A., WILSON K.J., MOORE S.S. Tissue-specific expressed sequence Tags from the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. *Marine Biotechnology* (in press)
- LESSA E.P. 1992. Rapid survey of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 323-330.
- MCDONALD J.H., VERELLI B.C., GEYER, L.B. 1996. Lack of geographic variation in anonymous nuclear polymorphisms in the american oyster *Crassostrea virginica*. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 1114-1118.
- NACIRI Y., VIGOUROUX Y., DALLAS J., DESMARAIS E., DELSERT C., BONHOMME F. 1995. Identification of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeat in the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 4, 83-89.
- PALUMBI S.R. 1995. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Systematics 2nd edn* (eds Hillis D, Moritz C), pp. 205-247. Sinauer, Sunderland, MA.

- RANSON G. 1961. Les espèces d'huitres perlières du genre *Pinctada* (Biologie de quelques unes d'entre elles). *Mém. Inst. Sci. Nat. Belgique*, 2(67) :1-95.
- SAAVEDRA C., ZAPATA C., GUERRA A., ALVAREZ G. 1993. Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* 115, 85-95.
- 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.
- SINGER-SAM J., TANGUAY R.L., RIGGS, A.D. 1989. Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications : a Forum for PCR Users*. Issue 3 (September) :11.

8. RECAPITULATIF DES PUBLICATIONS ACCEPTEES OU SOUMISES PENDANT LA DUREE DU PRESENT CONTRAT

- BAHRI-SFAR L., LEMAIRE C., BEN HASSINE O. K., BONHOMME, F. Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proc. R. Soc. London, B*, soumis
- BIERNE N., LEHNERT S.A., BEDIER E., BONHOMME F., MOORE S.S. Screening for Intron-Length Polymorphisms in Penaeid Shrimp Using Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) PCR, *Molecular Ecology*, soumis.
- BORSA P., DAGUIN C., RAMOS CAETANO S., BONHOMME, F. 1999. Nuclear-DNA evidence that northeastern atlantic *Mytilus trossulus* mussels carry *M. edulis* genes. *Journal of Molluscan studies*, in press.
- DAGUIN C., BORSA P. 1999. Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 235, 55-65.
- GARCIA DE LEON F. J., CANONNE M., QUILLET E., BONHOMME F., CHATAIN B. 1998. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 159, 303-316.
- HUVET A., BOUDRY P., OHRESSER M., DELSERT C., BONHOMME F. Microsatellites in the Pacific Cupped Oyster *Crassostrea gigas* and Other Cupped Oyster Species. *Animal Genetics*, soumis
- LAUNEY S., LEDU C., DELSERT C. Variable microsatellites in the european flat oyster *Ostrea edulis* and their use in other flat oyster species. *Molecular Ecology* (soumis).
- NACIRI M., LEMAIRE C., BORSA P., BONHOMME F. Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Heredity* (sous-presse)

**13. ANNEXE 5 :
COMPTE RENDU DE LA REUNION
"GENETIQUE DES POPULATIONS"
DU 18 NOVEMBRE 1998.**

Compte-rendu de la réunion "Génétique des populations"

Paris, le 18 novembre 1998

Ordre du jour: "Renouvellement de l'URM 16 (entre le laboratoire de François Bonhomme et le laboratoire de Génétique et Pathologie de La Tremblade); faut-il élargir cette collaboration aux recherches halieutiques et avec quelle organisation ?

Etaient présents:

- François Bonhomme (CNRS),
- DS: P. Nival,
- DRV: A. Maucorps, A. Michel, P. Lemercier, J.M. Griessinger,
- RH: L. Antoine, J. Bouchet, N. Lacroix, D. Woehring,
- RA: Y. Harache, A. Gérard, P. Boudry, S. Lapègue (rapporteur),
- VP: L. Han Ching, J. Dietrich.

La matinée a été dédiée à une **discussion scientifique** initiée par la présentation d'un exemple d'étude réalisée sur le loup de mer (ou bar selon les zones) en génétique des populations (François Bonhomme). L'analyse des résultats obtenus à partir de microsatellites a permis de mettre en évidence une différenciation génétique faible mais significative entre les zones Atlantique et Méditerranée ouest. Il n'a pas été retrouvé la différenciation observée avec des marqueurs allozymiques entre populations de lagune et de mer. Au contraire des marqueurs microsatellites, supposés neutres, les marqueurs allozymiques sont susceptibles d'être soumis à la sélection. L'hypothèse d'une seule unité de reproduction en Méditerranée ouest a été émise au vue de ces résultats. Plusieurs hypothèses sont alors envisageables pour expliquer ce genre de résultats, selon que l'on se trouve à l'équilibre génétique ou non. Afin de mieux comprendre le phénomène observé grâce aux marqueurs génétiques étudiés, des données concernant l'écologie de l'espèce sont à ce stade nécessaires. L'exemple de cette étude avait pour but de montrer que la génétique pouvait amener des renseignements sur le fractionnement spatial et temporel des événements de reproduction chez une espèce, mais également de mettre en lumière les intérêts mutuels à un travail en commun en halieutique et génétique, disciplines obtenant des informations pouvant s'avérer complémentaires dans la compréhension de la dynamique des populations de certaines espèces.

Une discussion s'est ensuite engagée sur l'outil microsatellite et ses potentialités dans la réponse à des questions intéressant l'halieutique, telles que le nombre d'unités de reproduction chez une espèce, l'effectif efficace à la reproduction, le suivi de cohortes, l'identification d'espèces de larves, l'effet de pressions entropiques sur les populations, la gestion des cheptels; mais aussi l'émergence d'autres techniques de biologie moléculaire (puces à ADN), des comparaisons avec de nombreuses autres espèces de poissons et mollusques.

Il a semblé à tout le monde que la dimension génétique devenait incontournable dans la gestion des espèces halieutiques et aquacoles, que des questions communes pouvaient intéresser les deux disciplines, et qu'il n'était pas question d'avoir une relation de type soustraitance. Après avoir présenté ses différents axes de recherche en génétique et la façon dont fonctionnait son équipe (un permanent et des doctorants), François Bonhomme a précisé que des études en terme de marqueurs génétiques pouvait être réalisées sur plusieurs espèces, ce qui a d'ailleurs été fait dans l'URM 16, mais que une certaine constance lui apparaissait nécessaire dans le choix d'un modèle, et que le loup sur lequel de nombreuses informations

étaient déjà disponibles pourrait être un bon candidat. Il attendait de l'halieutique qu'elle identifie les éléments pour lesquels une information génétique lui paraîtrait intéressante.

L'après-midi, une **discussion interne Ifremer** s'est tenue afin de savoir si une collaboration entre l'halieutique et une compétence génétique externe (telle que le laboratoire de François Bonhomme, ou un autre) pouvait être envisagée et sous quelle forme. En plus de l'éventualité d'une nouvelle collaboration avec RH, Yves Harache souhaite évoquer la pérennité de l'URM 16 dont la fin de l'année voit le terme.

Après avoir rappelé la façon dont a fonctionné l'URM, Pierre Boudry et André Gérard ont insisté sur l'investissement humain qui a été réalisé par le laboratoire de Génétique et Pathologie et qui a permis d'obtenir des résultats positifs en terme de transfert des compétences vers Ifremer.

Plusieurs questions ou remarques sont apparues au cours de la discussion, après un accord unanime avec Yves Harache pour ne pas faire l'impasse sur la dimension génétique en aquaculture comme en halieutique. La question est de savoir si l'halieutique veut investir dans ce domaine par le biais d'une collaboration externe à l'exemple du département Ressources Aquacoles ? L'avis général a été dans le sens d'une collaboration sur un sujet précis afin de commencer des échanges, à charge pour l'halieutique de réfléchir à des sujets d'intérêt à cours terme. Cependant, Jean Bouchet a insisté sur le fait que le besoin d'outils génétiques ne se feraient peut-être sentir qu'à moyen ou long terme en halieutique (10-15 ans), lorsque les décideurs dans la gestion des stocks auraient été convaincus par des critères alternatifs de nature écologique dans un premier temps, domaine de l'halieutique qu'il fallait considérer comme une priorité selon lui. Il a été finalement conclu qu'une première approche avec la génétique pouvait être intéressante afin de mettre en marche de futures collaborations qui pourraient se dessiner à moyen terme.

La seconde grande question concernait les moyens à mettre en œuvre pour réaliser cette collaboration. Une option était de réaliser le même genre de collaboration que l'URM 16. Cependant, Yves Harache a souligné que, dans l'hypothèse d'un développement de l'aquaculture poisson, il pourrait être intéressant de créer un outil plus ambitieux où les composantes aquaculture, génétique, halieutique, biologie moléculaire pourraient être regroupées dans un pool de compétence facilement activable sur des sujets d'intérêt commun. La création du centre de Sète pourrait être une opportunité pour un tel groupe. On pourrait alors envisager d'associer sous une forme à définir des compétences Ifremer, ORSTOM, CNRS,...

EN CONCLUSION, les idées suivantes ont été retenues:

- Le développement d'un programme de recherche en génétique est incontournable en halieutique,
- il est nécessaire de réfléchir à des actions de programme où la génétique des populations ou quantitative pourrait être associée à l'écologie halieutique,
- il apparaît judicieux de conforter le pool génétique à Palavas dans l'optique d'une coopération avec un pool multidisciplinaire et éventuellement pluri-institut qui pourrait se positionner à Sète en coopération avec RA.
- L'URM 16 est prolongée d'au moins deux années pendant laquelle une réflexion en terme de positionnement des personnes (formation interne, recrutement interne ou externe, rattachement) est nécessaire en vue de l'élaboration d'un pool multidisciplinaire complémentaire du pool génétique trembladais.