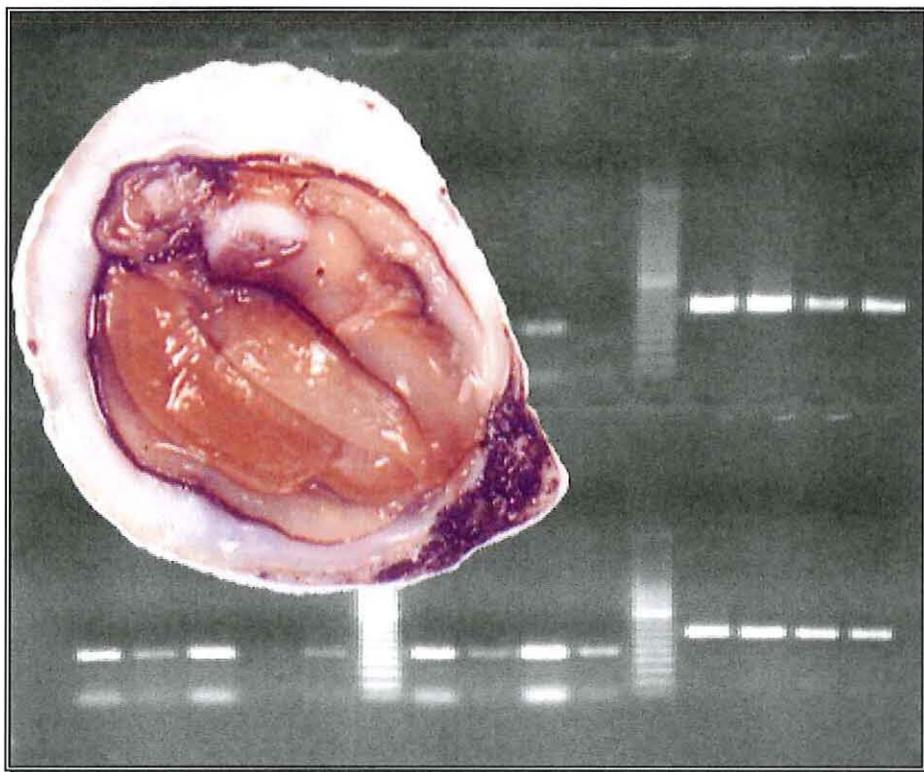




**Contrat Région Poitou-Charentes 1999
Convention 99 RPC-A-203 "Génétique"**

**Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du
genre *Crassostrea* : hybridation et conservatoire de souches**

**P. Boudry, S. Heurtebise, A. Huvet, S. Lapègue, C. Ledu, P. Phélipot
et A. Gérard**



Laboratoire Ifremer de Génétique et pathologie

BP 133 17390 LA TREMBLADE (FRANCE)

Tel. 05.46.36.98.36

Fax. 05.46.36.37.51

SOMMAIRE

1. PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE ET OBJECTIFS SCIENTIFIQUES 3

2. ETUDE GÉNÉTIQUE DES HUITRES DE MANGROVES DE L'ATLANTIQUE SUD 5

- 2.1. INTRODUCTION..... 5
- 2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES 6
 - 2.2.1. Prélèvement de tissus 6
 - 2.2.2. Extraction de l'ADN..... 7
 - 2.2.3. PCR (réaction de polymérisation en chaîne) 7
 - 2.2.4. Vérification de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose..... 8
 - 2.2.5. PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)..... 8
 - 2.2.6. Visualisation des fragments digérés par électrophorèse sur gel d'acrylamide..... 8
 - 2.2.7. SSCP (polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin) 8
 - 2.2.8. Séquençage..... 9
 - 2.2.9. Analyse des séquences..... 10
- 2.3. RÉSULTATS 11
 - 2.3.1. Obtention de produits de PCR pour la PCR- RFLP, la SSCP et le séquençage 11
 - 2.3.2. Détermination du polymorphisme de longueur de fragment de restriction (PCR-RFLP)..... 11
 - 2.3.3. Détermination du polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (SSCP)..... 12
 - 2.3.4. Détermination de la séquence du fragment 16S et de la phylogénie des huitres creuses étudiées 13
- 2.4. DISCUSSION..... 17

3. ETUDE DE CROISEMENTS ENTRE *C. ANGULATA* ET *C. GIGAS* 19

- 3.1. INTRODUCTION..... 19
- 3.2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE :..... 19
- 3.3. RÉSULTATS 20
- 3.4. CONCLUSION 21

4. RÉALISATION ET ANALYSE DE CROISEMENTS ENTRE *CRASSOSTREA GIGAS* ET DEUX AUTRES ESPÈCES D'HUITRES DU GENRE *CRASSOSTREA* 22

- 4.1. CROISEMENT ENTRE *CRASSOSTREA GIGAS* ET *C. ARIAKENSIS*..... 22
- 4.2. CROISEMENT ENTRE *CRASSOSTREA GIGAS* ET *C. SIKAMEA*..... 22

5. BIBLIOGRAPHIE 23

1. Problématique générale et objectifs scientifiques

L'étude de la variabilité génétique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est un point essentiel dans la mise en place de programmes de gestion des ressources génétiques et de sélection chez cette espèce. *C. gigas*, originaire du Japon, a été introduite dans de nombreuses régions du monde et représente aujourd'hui plus de 95 % de la production mondiale d'huîtres. Introduite en France au début des années 1970 pour remplacer l'huître portugaise *Crassostrea angulata*, c'est aujourd'hui une ressource de première importance pour notre région.

Malgré la maîtrise du cycle de reproduction de l'espèce et son importance commerciale, elle n'a encore pas été génétiquement améliorée et on peut considérer les stocks comme « sauvages » ou « non domestiqués ». La très grande majorité du naissain mis en élevage en France est en effet issue du milieu naturel. Le développement d'écloseries, visant principalement à approvisionner les producteurs en naissain, permet désormais d'envisager des programmes de sélection ou la diffusion de nouvelles souches.

Une meilleure connaissance des ressources génétiques disponibles est donc un élément essentiel au choix des stratégies de gestion et de sélection chez cette espèce. Cette connaissance nécessite :

- Le développement de marqueurs génétiques permettant de distinguer les individus au sein de l'espèce ou les différentes espèces au sein du genre,
- La mise en place d'expérimentations permettant la comparaison d'huîtres de différentes origines géographiques.

La possibilité d'introduire des huîtres de diverses origines géographiques, de les reproduire et de les élever sans risque d'introduction de pathogènes pour les populations locales.

Dans le cadre du plan Etat-Région 1994-1998, un programme de conservatoire de souches a été initié au Laboratoire IFREMER de La Tremblade. Ce conservatoire a pour objectif d'acclimater différentes espèces ou souches d'huîtres creuses (genres *Crassostrea* et *Saccostrea*) afin d'acquérir des connaissances sur ces espèces et d'évaluer l'intérêt qu'elles pourraient présenter pour l'ostréiculture locale. L'importation d'espèces étrangères sur les côtes françaises est désormais strictement réglementée: la dissémination d'une nouvelle espèce peut se révéler néfaste d'un point de vue écologique et nuire aux productions existantes. De plus, ces huîtres peuvent être porteuses de pathogènes qui, s'il venaient à se répandre dans le milieu, pourraient toucher les stocks locaux. En conséquence, les huîtres importées sont strictement confinées au laboratoire dans une « salle de quarantaine » dont l'eau est traitée à l'ozone avant rejet afin d'éviter à la fois la dissémination des huîtres et d'éventuels pathogènes.

Au sein même de l'espèce *Crassostrea gigas*, certaines populations sont susceptibles de présenter des caractéristiques différentes de celles actuellement produites en France. Ces différences pourraient être liées à des conditions environnementales particulières à chaque zone géographique, la sélection naturelle ayant alors permis aux populations de s'adapter aux conditions locales. L'identification de telles populations représenterait un intérêt immédiat pour l'ostréiculture locale, puisqu'elles pourraient être

rapidement diffusées auprès des producteurs (après les contrôles sanitaires indispensables). Suite à l'introduction et la reproduction au sein du conservatoire de différentes souches, nous avons désormais débuté les expérimentation sur le terrain, en collaboration avec le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC, IFREMER La Tremblade) et le Laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (LCPL, IFREMER Bouin).

Les études réalisées en 1999 ont essentiellement porté sur :

- l'étude d'échantillons d'huîtres de mangrove, en provenance d'Afrique et d'Amérique du sud,
- l'analyse de croisements entre *C. gigas* et *C. angulata*.
- l'analyse de croisements entre *C. gigas* et d'autres espèces d'huîtres du genre *Crassostrea*.

2. Etude génétique des huîtres de mangroves de l'Atlantique Sud

• 2.1. Introduction

Les huîtres sont des bivalves ayant une large répartition géographique. En effet, elles sont présentes sur pratiquement toutes les côtes du monde où elles peuvent faire l'objet d'une culture intensive. Les huîtres creuses du genre *Crassostrea* sont également présentes partout (sauf dans les zones froides) et ce genre comprend plusieurs espèces décrites avec plus ou moins de précision selon leur intérêt économique.

Par ailleurs, ces descriptions sont difficiles à interpréter du fait de la plasticité de forme de la coquille et de la morphologie interne de ces animaux. En effet, les caractères externes ne permettent pas de distinguer deux espèces car l'aspect de la coquille est largement influencé par les conditions du milieu (Rodriguez-Romero *et al*, 1979 a). Des individus d'une même espèce peuvent avoir des aspects très différents selon le milieu dans lequel ils vivent. La répartition géographique, longtemps utilisée comme critère distinctif, n'est à présent plus une référence du fait des nombreuses introductions d'espèces étrangères sur les lieux de culture (Littlewood, 1994). De plus, il est possible d'obtenir des hybrides viables lors de croisements entre individus de différentes espèces (Allen et Gaffney, 1993), ce qui rend encore plus difficile la définition d'espèces face à ces flux géniques

Face à ce « flou » taxonomique, l'étude de populations d'huîtres creuses de l'Atlantique sud conservées au laboratoire de génétique de la Tremblade, peut apporter un début de réponse quant à leur appartenance à telle ou telle espèce et par extension sur la phylogéographie des huîtres creuses dans l'Atlantique sud. Nos premières analyses portent sur l'ADN mitochondrial d'espèces africaines (sénégalaises principalement) et sud-américaines (Brésil, Martinique et Guyane).

Il semble *a priori* que la côte sud-américaine soit occupée par *Crassostrea rhizophorae* (carte figure 1), espèce vivant dans les mangroves fortement influencées par la mer et semblant remplacer *C. virginica* sur les côtes sud-américaines (Rodriguez-Romero *et al*, 1979 b; Rodriguez-Romero et Garca-Montes de Oca, 1998; Littlewood, 1994; Ladron de Guevara *et al*, 1996). Mais un autre auteur (Singarajah, 1980) y décrit 4 espèces : *C. brasiliiana* (Lamark, 1819), *C. sp*, *C. paraibanensis* et *C. rhizophorae* (Guilding, 1828). Cependant, cet auteur considère que *C. brasiliiana* et *C. rhizophorae* ne sont qu'une seule et même espèce. *C. brasiliiana* a fait l'objet de travaux notamment sur sa croissance (Pereira et Das Chagas Soares, 1996).

La côte ouest africaine (carte figure 1) est quant à elle occupée par *C. gasar*. Cette huître est également présente dans les mangroves. Elle commence à faire l'objet de culture, notamment au Sénégal (Gilles, 1991). Des études sont donc menées pour améliorer les conditions d'élevage de cette huître de palétuvier. Elle semble supporter des variations importantes du milieu et en particulier de salinité (Gilles, 1991). Cependant, à notre connaissance, aucune étude génétique n'a été faite sur *C. gasar*. En effet, elle n'est consommée pour l'instant que par les populations locales et la recherche est, par ailleurs, encore peu développée à ce sujet en Afrique. Ce qui n'est pas le cas des huîtres de la côte américaine (*C. virginica* et *C. rhizophorae*) qui font

l'objet de nombreuses recherches en génétique (Littlewood, 1994; O'Foighil *et al*, 1995).

L'utilisation de plus en plus répandue de la biologie moléculaire permet une approche très fine de la phylogénie. L'étude des marqueurs moléculaires ouvre de nouveaux axes de recherches en taxonomie et en phylogénie. De plus, l'analyse de séquences de fragments d'ADN a permis la distinction d'espèces d'huîtres très proches (Buroker *et al*, 1979; Banks *et al*, 1993; O' Foighil *et al*, 1998).

C'est pourquoi, nous nous proposons d'étudier le fragment d'ADN mitochondrial 16S, afin de différencier les populations africaines et sud-américaines échantillonnées. En effet, le génome mitochondrial présente des avantages par rapport au génome nucléaire. Il est de petite taille et sa forme est très conservée d'un embranchement à l'autre, son contenu en gènes est modeste et il présente peu ou pas de séquences non codantes. Sa transmission est uni-parentale et sans recombinaison. Les séquences codantes sont moins soumises aux forces évolutives (sélection...) et sont donc assez conservées. Pourtant, le génome mitochondrial présente une variabilité importante, ce qui en fait un outil apprécié pour les études inter-spécifiques. Il permet ici d'identifier les différentes populations d'huîtres creuses à partir de l'étude de son polymorphisme.

Dans un premier temps, le fragment 16S, amplifié par PCR (Mullis, 1983), sera digéré par des enzymes de restriction (PCR-RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction). Cette méthode permet de visualiser d'éventuelles mutations touchant le site de restriction d'une des enzymes. Puis, une analyse en SSCP (Polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin) permettra de détecter d'éventuelles variations de la séquence nucléotidique de ce fragment.

Enfin, nous comparerons les séquences du fragments 16S de populations de l'Atlantique sud avec celles d'autres espèces d'huîtres creuses (*C. gigas*, *C. virginica*...). Ces séquences nous permettront ensuite de construire des arbres phylogénétiques illustrant les relations existant entre les espèces d'huîtres du genre *Crassostrea*.

- 2.2. Matériel et méthodes

- 2.2.1. Prélèvement de tissus

Le prélèvement de tissu branchial se fait par biopsie après anesthésie de l'animal au MgCl₂ ou par sacrifice. Les échantillons sont ensuite mis dans l'éthanol 100 % pour une conservation à long terme ou directement traités au phénol-chloroforme pour en extraire l'ADN. Les produits d'extraction sont alors conservés à -20°C.

Le tableau 1 indique les différentes populations étudiées avec leur provenance et l'espèce présumée à laquelle elles appartiennent.

Tableau 1 : Liste des populations d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* étudiées

Populations	Espèce présumée	Lieu de prélèvement
ZIG	<i>C. gasar</i>	Sénégal. Zinguinchor (palétuvier)
NOB	<i>C. gasar</i>	Sénégal. Kafountine. Casamance. (palétuvier)
PIC	<i>C. gasar</i>	Sénégal
ALM	<i>C. gasar</i>	Sénégal. Pointe des Almadies
SIN	<i>C. rhizophorae</i>	Guyane. Mont Sinery (palétuvier)
MAS	<i>C. rhizophorae</i>	Martinique. Massy- Massy
PAR	<i>C. rhizophorae</i>	Brésil. Baie de Paranagua (palétuvier)
X	<i>C. rhizophorae</i>	Brésil. Baie de Paranagua (palétuvier)
XX	<i>C. rhizophorae</i>	Brésil. Baie de Paranagua (palétuvier)

Les 3 populations brésiliennes PAR, X et XX proviennent de la même localité. Les PAR ont fait l'objet d'un premier échantillonnage. Les X et les XX ont été reçues ultérieurement et ont été classées en 2 populations d'après leur aspect morphologique différent.

2.2.2. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait au phénol-chloroforme. Dans un premier temps, les échantillons sont digérés par la protéinase K afin de dégrader la partie protéique de l'échantillon par rupture des liaisons ester entre les acides aminés. Le phénol permet ensuite de séparer les différents constituants de l'échantillon et le chloroforme termine l'extraction des acides nucléiques et élimine les traces de phénol. Enfin l'éthanol 100% précipite les acides nucléiques qui seront repris dans un volume approprié de TE 1X (Tris EDTA) et conservés à -20°C .

2.2.3. PCR (réaction de polymérisation en chaîne)

La PCR (Saiki *et al*, 1985) permet d'obtenir un grand nombre de copies du fragment à étudier. L'utilisation de la Taq polymérase purifiée à partir de *Thermus aquaticus* depuis 1988, a simplifié les protocoles. Elle permet d'amplifier une région précise de l'ADN grâce à deux amorces (séquence en annexe 2) d'orientation opposée et complémentaires de la séquence adjacente à la région cible. Cette réaction permet d'amplifier un fragment de 570 pb de l'ADN 16S de deux individus de chaque population par une succession de cycles de dénaturation de l'ADN et des amorces, d'hybridation des amorces et d'élongation pendant laquelle la Taq polymérase assure la réplication de la séquence entre les deux amorces (figure 2).

L'ADN extrait est dilué puis mélangé à la solution de PCR contenant :

- l'enzyme Taq polymérase
- le tampon de réaction de l'enzyme
- du MgCl_2 . Les ions Mg^{2+} sont des co-facteurs de l'enzyme
- des dNTP. Les nucléotides sont essentiels pour l'étape d'élongation
- deux amorces spécifiques (16S AR et 16S BR)

- de l'eau

Une série d'étapes à différentes températures se déroulent comme suit :

- 1- 5 minutes de dénaturation initiale à 94°C.
- 2- 1 minute de dénaturation à 94°C
- 3- 1 minute d'hybridation à 55°C
- 4- 1 minute d'élongation à 72°C
- 5- 7 minutes d'élongation finale à 72°C

Les étapes 2, 3 et 4 sont répétées 30 fois dans un thermocycleur de type Crocodile II (Appligene) ou Robocycler (Stratagene).

2.2.4. Vérification de le PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

La PCR est une réaction très sensible. Ainsi la moindre variation d'un paramètre (température, concentration d'ADN au départ...) peut inhiber l'amplification. Une migration sur un gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (BET) permet de visualiser le fragment de 570 paires de bases amplifié.

2.2.5. PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

Cette méthode permet de visualiser des mutations au niveau de sites de restriction dans le fragment étudié entre individus. La présence d'une mutation peut entraîner ou non, la coupure du fragment. La PCR-RFLP permet de déterminer les haplotypes des 9 populations étudiées. La transmission uni-parentale de l'ADN mitochondrial (et l'absence de recombinaison) permet d'obtenir directement la constitution génotypique haploïde de l'individu. Une série de digestions enzymatiques est ainsi effectuée sur 2 individus de chaque population et cela avec 7 enzymes (*TaqI*, *MseI*, *HhaI*, *HaeIII*, *RsaI*, *HindIII*, *SacI*).

2.2.6. Visualisation des fragments digérés par électrophorèse sur gel d'acrylamide

Les profils de restriction sont observés sur gels d'acrylamide, beaucoup plus résolutifs que les gels d'agarose. Les gels sont coulés entre 2 plaques de verres espacées de 1.5mm. La migration se fait verticalement pendant environ 2h sous une tension de 300V et une intensité de 500mA. Le tampon de migration est du TBE 1X réfrigéré par une circulation d'eau à une température constante. Après migration, le gel est trempé environ 15 minutes dans une solution de BET, puis observé sur la table UV. L'ensemble des profils obtenus permet de déterminer différents haplotypes à partir du nombre de bandes et donc du nombre de sites de coupure sur le fragment.

2.2.7. SSCP (polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin)

Quelques essais de la méthode SSCP ont été faits sur un individu de chaque population, afin de vérifier la cohérence des résultats obtenus en PCR-RFLP.

L'ADN simple brin a la capacité d'adopter une conformation secondaire lorsque les 2 brins sont séparés. En effet, un changement de séquence (structure primaire), même minime, peut entraîner une conformation différente du simple brin d'ADN et donc une migration différente. Ainsi cette technique permet de détecter des mutations de manière plus précise que la PCR-RFLP.

La migration électrophorétique se fait sur un gel d'acrylamide 8 % (protocole de l'annexe 4) non dénaturant et dans un tampon de TBE 0.6X. L'épaisseur du gel est de 0.75mm contre 1.5mm en PCR-RFLP. La migration se fait à faible puissance (3W soit 200V et 150mA) et à basse température (4°C) pendant environ 14h. Une coloration au BET permet ensuite de visualiser les bandes sous UV.

2.2.8. Séquençage

Afin de visualiser plus précisément les différences observées en PCR-RFLP et SSCP, le fragment 16S est séquençé (selon le principe de la méthode de Sanger), c'est-à-dire que la succession des nucléotides est déterminée.

Le fragment d'ADN à séquencer est soumis à une série de cycles en présence de l'une des 2 amorces, des 4 nucléotides et de l'un des 4 didésoxynucléotides marqué au phosphore 33. La réaction de séquençage se déroule donc dans 4 tubes différents.

De plus, contrairement à une PCR classique, seules les molécules d'ADN de départ servent de matrice. Ce n'est donc pas une réaction en chaîne exponentielle. La réaction est arrêtée lorsqu'un ddNTP est incorporé pendant l'élongation par l'enzyme séquençase. Ainsi une multitude de fragments dont la taille diffère d'une seule base est obtenue. La figure 5 montre le principe de la réaction de séquençage.

Les réactions ont été conduites selon le protocole modifié du fournisseur (Oligonucléotide tailing kit de Boehringer-Mannheim) et du stage de biologie moléculaire (Leroux et Desmarais, 1998).

Les produits de PCR sont purifiés, c'est-à-dire débarrassés des restes de la réaction de PCR (huile, amorces, dNTP...) avec le kit High pure PCR product purification de Boehringer-Mannheim. Les produits obtenus sont ensuite visualisés et quantifiés à l'aide d'une gamme de concentrations du marqueur de taille par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. En effet, un excès d'ADN entraîne soit une inhibition de la réaction, soit une mauvaise qualité de la séquence sur le film (bandes trop larges, parfois plusieurs bandes au même niveau...).

Le séquençage du fragment 16S est effectué selon la méthode de Sanger. Le gel est mis sous tension à vide afin d'éliminer l'excès d'urée et des autres produits composant le gel (APS, TEMED). Le temps de migration est un paramètre important. En effet, un nombre maximum de bandes doit être obtenu sur le gel : une migration trop longue entraîne la perte des fragments les plus petits (en bas du gel), alors qu'une migration trop courte ne permet pas de bien séparer les fragments les plus gros (en haut du gel). Etant donné la taille du fragment, le séquençage a été réalisé à partir des 2 extrémités et donc des 2 amorces.

Ce protocole présente l'avantage d'être rapide (il est possible de faire plusieurs gels dans la journée) et d'optimiser le nombre de bases obtenues : un seul dépôt de la 2^{ème} amorce suffit pour obtenir la fin de la séquence tout en recoupant le début de celle-ci réalisée avec la 1^{ère} amorce.

Lorsque la migration est terminée, le gel est démoulé (c'est-à-dire que les 2 plaques de verre sont séparées) puis séché sous vide d'air à une température de 65°C. Il est ensuite mis en contact avec un film photographique (Kodac Scientific Imaging Film) pendant environ une nuit, selon l'intensité de la radioactivité du gel.

Après révélation du film photographique, la lecture de la séquence se fait de bas en haut en alignant les bases de proche en proche.

2.2.9. Analyse des séquences

L'analyse des séquences nucléotidiques se fait à l'aide du logiciel d'alignement *CLUSTALW* (<http://pbil.ibcp.fr>) (Thompson *et al*, 1994). Ce logiciel permet de visualiser les différences entre les séquences et de déterminer le pourcentage d'alignement (ou d'homologie) entre les séquences.

Les distances entre paires de séquences ont été calculées à partir du modèle de Kimura (1980) grâce au programme *DNADIST* du logiciel *PHYLIP* (Felsenstein, 1993).

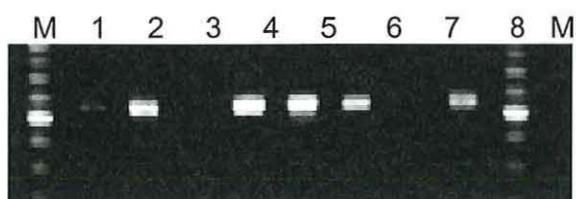
La matrice de distances nucléotidiques ainsi obtenue sert de base au programme *NEIGHBOR* de *PHYLIP* qui permet la construction d'un arbre phylogénétique non enraciné à partir de la méthode du *neighbor-joining* de Nei et Saitou (1987). Son principe est de regrouper les paires de taxons les plus proches afin de minimiser la longueur des branches de l'arbre. De plus, cette méthode autorise des taux d'évolution différents selon les branches. La représentation graphique de cet arbre est réalisée grâce au logiciel *TREEVIEW* (Page, 1996).

• 2.3. Résultats

2.3.1. Obtention de produits de PCR pour la PCR- RFLP, la SSCP et le séquençage

La figure 7 montre un exemple de migration de produits de PCR sur gel d'agarose 1 %. Les résultats ainsi obtenus orientent la suite des analyses du fragment 16S.

Figure 7 : Exemple de résultats obtenus en PCR sur le fragment 16S (photo traitée par le logiciel *ADOBE PHOTOSHOP*)



M : marqueur de taille (Ladder 100- 1500 bp). La bande 500 bp est plus marquée et sert de référence.

2.3.2. Détermination du polymorphisme de longueur de fragment de restriction (PCR-RFLP)

Résultats obtenus en PCR-RFLP effectuées sur le fragment mitochondrial 16S par le panel de 7 enzymes de restriction sont résumés dans le tableau 4.

La plupart des profils (sauf *Rsa I* et *Sac I*) montre qu'il existe des sites de coupure des enzymes utilisées (voir matériel et méthodes tableau 2) car plusieurs bandes sont observées. Les profils des autres enzymes sont par ailleurs différents d'une population à l'autre. Il existe donc des mutations au niveau du site de restriction de l'enzyme.

Les digestions par les enzymes *Rsa I* et *Sac I*, qui ne présentent pas de sites de restriction, montrent qu'il existe tout de même une différence de migration puisque toutes les bandes ne sont pas au même niveau. Ceci peut être s'expliquer de la façon suivante :

- existence de sites de coupures de très petits fragments qui ne sont pas détectables sur le gel. Ceci peut expliquer les fragments « manquants » lorsque les profils sont observés.
- variation de la conformation de l'ADN entraînant une migration différente

Certaines enzymes peuvent ainsi être utilisées en routine pour donner une première idée des différents types d'huîtres que l'on veut étudier et dont on ne connaît rien. En effet, l'enzyme *Taq I*, par exemple, permet d'obtenir des profils polymorphes facilement discernables par rapport à d'autres enzymes pour lesquelles il peut exister une ambiguïté dans la distinction de bandes très proches.

De plus, les séquences présentées ultérieurement permettent de confirmer grâce à une étude de la carte de restriction* réalisée sur les 2 types de séquences, qu'une mutation entraîne l'apparition d'un site de coupure pour cette enzyme chez *C. rhizophorae*. Enfin, ces profils permettent de déterminer des haplotypes pour les 9 populations étudiées (tableau 4).

Tableau 4 : Résultats obtenus en PCR-RFLP effectuées sur le fragment mitochondrial 16S

Populations	HhaI	TaqI	RsaI	SacI	HaeIII	MseI	HindIII	Haplotypes
ZIG	a	a	a	a	b	b	a	I
NOB	a	a	a	a	b	b	a	I
PIC	a	a	a	a	b	b	a	I
ALM	a	a	a	a	b	b	a	I
SIN	a	a	a	a	b	b	a	I
MAS	b	b	a	a	a	a	b	II
PAR	a	a	a	a	b	b	a	I
X	b	b	a	a	a	a	b	II
XX	b	b	a	a	a	a	b	II

* La carte de restriction n'est pas présentée ici. Elle a été réalisée à partir du site Internet : <http://www.infobiogen.fr>

2.3.3. Détermination du polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (SSCP)

Les résultats de cette méthode sont de bonne qualité et vont dans le même sens que ceux obtenus en PCR-RFLP. Le gel présenté en figure 9 montre les résultats obtenus sur un individu de chacune des 9 populations. La SSCP confirme l'existence de 2 types d'huîtres creuses parmi les 9 populations étudiées (tableau récapitulatif 5).

Figure 9 : profil obtenu en SSCP (Photo traitée par le logiciel ADOBE PHOTOSHOP)

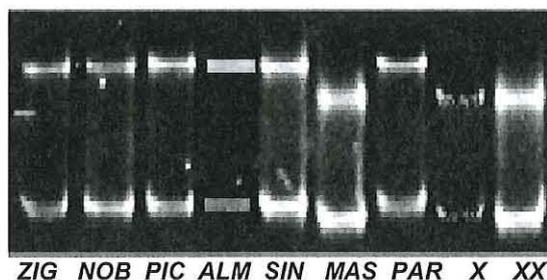


Tableau 5 : Haplotypes des différentes populations avec le lieu de prélèvement et l'espèce présumée

Population	espèce présumée	lieu de prélèvement	Haplotype
ZIG	<i>C. gasar</i>	Sénégal	I
NOB	<i>C. gasar</i>	Sénégal	I
PIC	<i>C. gasar</i>	Sénégal	I
ALM	<i>C. gasar</i>	Sénégal	I
SIN	<i>C. rhizophorae</i>	Guyane	I
PAR	<i>C. rhizophorae</i>	Brésil	I
MAS	<i>C. rhizophorae</i>	Martinique	II
X	<i>C. rhizophorae</i>	Brésil	II
XX	<i>C. rhizophorae</i>	Brésil	II

L'haplotype I (dit africain) et l'haplotype II (dit martiniquais) sont localisés sur la figure 10. Les 2 haplotypes sont présents en Amérique du Sud et coexistent dans la même localité au Brésil (Baie de Paranagua). Par ailleurs, la population guyanaise SIN et la population brésilienne PAR, présumée respectivement *Crassostrea rhizophorae* et *Crassostrea sp* (Boudry *et al*, 1999) s'avèrent correspondre au type africain, c'est-à-dire à l'espèce *Crassostrea gasar*.

2.3.4. Détermination de la séquence du fragment 16S et de la phylogénie des d'huîtres creuses étudiées

Il n'a été possible de lire que 470 paires de bases au maximum. D'après les résultats obtenus en PCR, le séquençage aurait dû permettre de lire les 570 bp que compte le fragment amplifié. Il est cependant classique de ne pouvoir lire le début des séquences en séquençage manuel. La lecture des gels permet de déterminer 2 séquences différentes correspondant respectivement aux types I et II. Ces séquences sont nouvelles et seront déposées dans des bases de données telles que *GenBank* par exemple.

Des séquences nucléotidiques du même fragment de 16S chez des espèces connues telles que *Crassostrea gigas*, *virginica* et *ariakensis* extraites d'une publication (O' Foighil *et al*, 1995) permettent une comparaison avec les séquences des 9 populations. La séquence de *Crassostrea angulata* est également donnée par cet auteur mais elle n'est pas publiée.

Pour plus de clarté, un individu de chacun des 2 types est utilisé. Les types I africain et II martiniquais sont respectivement considérés comme l'espèce *Crassostrea gasar* et *Crassostrea rhizophorae*.

Le logiciel *CLUSTALW* permet de faire les alignements suivants :

Alignement des 6 espèces disponibles permettant de voir les différences de séquence (figure 12). Le pourcentage d'homologie entre ces 6 espèces est de 76.80 %. Ceci montre que les individus de chacune de ces espèces appartiennent bien à des espèces différentes.

Alignement des espèces 2 par 2 permettant de voir des rapprochements phylogénétiques (tableau 6). Ce tableau met en évidence les rapprochements suivants :

C. gigas, *C. angulata* et *C. ariakensis*

C. virginica et *C. rhizophorae*

C. gasar

Par exemple, *C. gigas* et *C. ariakensis* sont plus proches l'une de l'autre (94%) que *C. gigas* et *C. gasar* (84%).

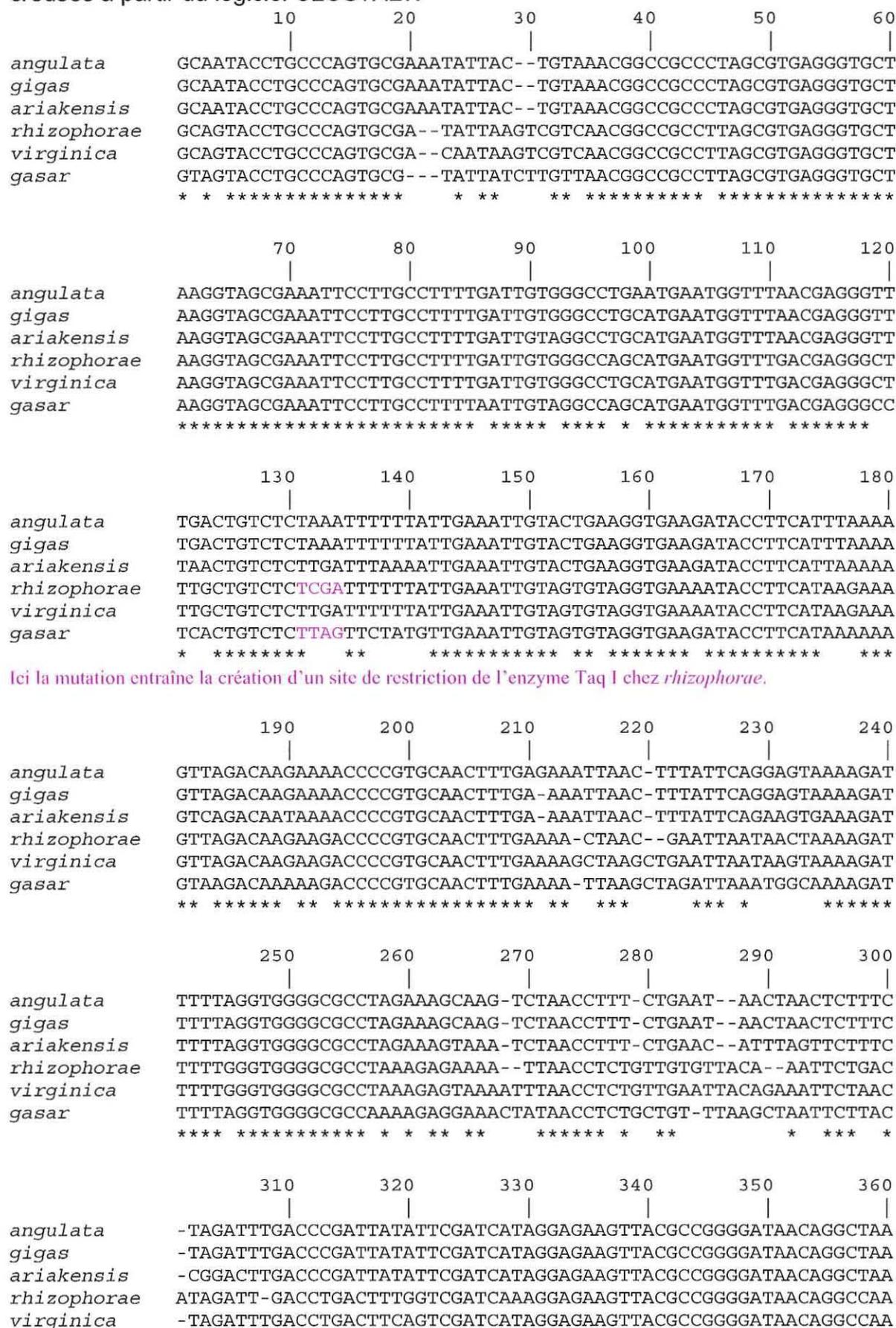
Tableau 6 : Pourcentage d'homologie des espèces 2 par 2

	<i>C. gigas</i> *	<i>C. angulata</i> **	<i>C. virginica</i> *	<i>C. ariakensis</i> *	<i>C. gasar</i>	<i>C. rhizophorae</i>
<i>C. gigas</i>	100	99.54	85.97	94.48	84.74	85.84
<i>C. angulata</i>		100	85.75	94.04	84.32	85.42
<i>C. virginica</i>			100	84.16	87.76	94.57
<i>C. ariakensis</i>				100	84.51	83.86
<i>C. gasar</i>					100	88.41
<i>C. rhizophorae</i>						100

* : O' Foighil et al, 1995

** : O' Foighil, 1997 (séquence non publiée)

Figure 12 : alignement de la séquence du fragment 16S de 6 espèces d'huîtres creuses à partir du logiciel *CLUSTALW*



```

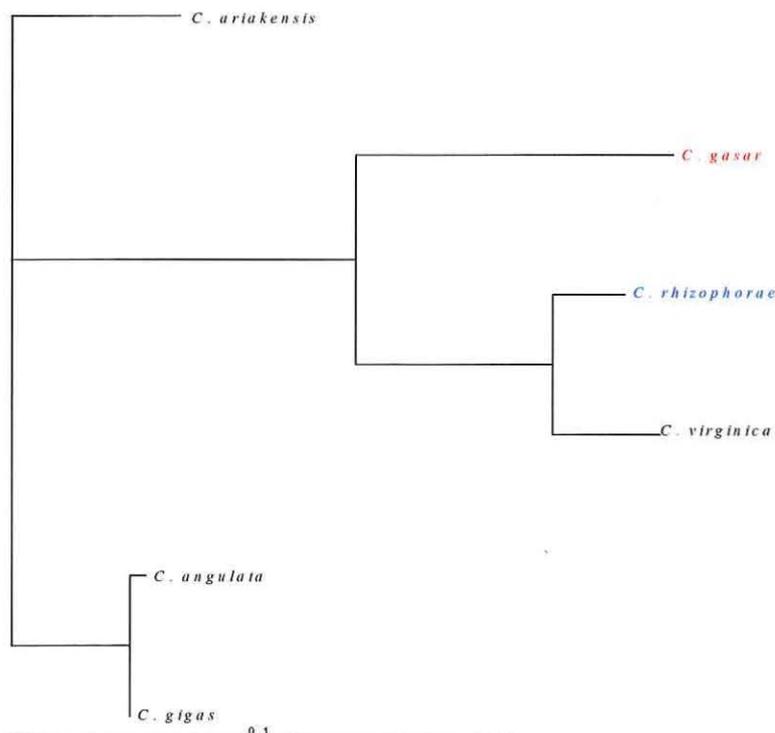
gasar      -TGGAGTTGACCTGACTTAAGTCGATCAAAGGAGAAGTTACGCCGGGGATAACAGGCCAA
           ** * **** * * * ***** *****
           |         |         |         |         |         |
           370       380       390       400       410       420
angulata   TCCTTTAGTAGAGTTCGTATTGGCTAAAGGGATTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATA
gigas      TCCTTTAGTAGAGTTCGTATTGGCTAAAGGGATTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATA
ariakensis TCCTTTAGTAGAGCTCGTATTGGCTAAAGGGATTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATG
rhizophorae TCCTTTAGTAAAGTTCGTATTAAC TAAAGGGCTTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATT
virginica  TCCTTTAGTAAAGTTCGTATTAAC TAAAGGGCTTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATT
gasar      TTCTTTAGTAAAGCTCGTATTAAC TAAAGGGCTTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGGATT
           * ** ***** ** ***** ***** *****
           |         |
           430       440
angulata   ATAGCTTCAAGGCGTAGAGGCTTT
gigas      ATAGCTTCAAGGCGTAGAGGCTTT
ariakensis ATAGCTTCAAGGCGTAGAGGCTTT
rhizophorae ATAGCTTTAAGGCGTAGAAGCTTT
virginica  ATACCTTTAAGGCGTAGAAGCTTT
gasar      ATAGCTTCAAGGCGTAGATGCTTT
           *** ** ***** *****

```

La phylogénie est illustrée par des arbres construits par le logiciel *TREEVIEW* comme le montrent les figures 13a et 13b. Les 2 constructions apportent les mêmes informations, seule la présentation change.

Ces 2 arbres indiquent et confirment les rapprochements déjà obtenus à partir des alignements, c'est-à-dire que *C. gasar* semble être un type intermédiaire entre *gigas* /*angulata* d'une part et *virginica* /*rhizophorae* d'autre part.

Figure 13a : arbre phylogénétique construit par *TREEVIEW* illustrant les relations entre 6 espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* à partir de la séquence du fragment 16S.



• 2.4. Discussion

Les différentes données relatives à l'environnement et à la morphologie des populations étudiées laissent penser que ces huîtres présentent une certaine plasticité: pour un environnement donné (mangrove), les populations d'huîtres présentent des formes variées de la coquille. Les difficultés rencontrées dans la distinction des espèces par la morphologie interne et par celle de la coquille (Littlewood, 1994) font de la biologie moléculaire un outil fiable pour ce type d'étude. Ainsi, les 3 méthodes utilisées ici (PCR-RFLP, SSCP et séquençage) permettent d'identifier en routine les 2 types étudiés. Les résultats obtenus en restriction sont confirmés par les séquences et la SSCP permet également de distinguer sans ambiguïté les 2 types.

Ces 2 espèces (les 9 populations pouvant être regroupées sous les noms *C. gasar* et *rhizophorae*) sont capables de s'adapter à un même environnement. Par ailleurs, la mangrove est un milieu particulier et exigeant du point de vue des paramètres physiques (luminosité, température, salinité...). *C. gasar* semble donc s'adapter à différentes conditions physiques du milieu puisqu'elle est présente de chaque côté de l'Atlantique. En Amérique du sud où *C. rhizophorae* est l'espèce normalement rencontrée (Singarajah, 1980), *C. gasar* est présente en Guyane et en sympatrie avec *C. rhizophorae* au Brésil. Ceci n'avait pas encore été montré.

Chaque espèce étant caractéristique d'un côté de l'Atlantique, la présence de *C. gasar* sur les côtes sud- américaines permet d'émettre plusieurs hypothèses :

- 1- présence naturelle ou introduction par les courants (hypothèse à prendre avec beaucoup de précautions). Une étude des courants laisse penser que le transport se ferait de l'Amérique vers l'Afrique,
- 2- introduction artificielle par l'homme.

L'hypothèse 1 et les résultats obtenus (présence de *C. gasar* dans 2 sites sud-américains) supposerait que *C. gasar* est originaire d'Amérique du sud et se serait dispersée en Afrique par le jeu des courants. Cependant, les espèces étudiées sont très anciennes et leur différenciation s'est faite il y a longtemps. L'étude du fragment 16S permet alors de distinguer les 2 espèces, mais pas le polymorphisme intraspécifique des populations de *C. gasar* de part et d'autre de l'Atlantique car ce fragment est très conservé. Afin de déterminer depuis combien de temps *C. gasar* se trouve de chaque côté de l'Atlantique, l'étude de fragments nucléaires serait alors plus appropriée.

La suite logique de cette étude est un échantillonnage plus important sur toutes les côtes atlantiques de l'Amérique Latine afin de connaître l'aire de répartition de *C. gasar* par rapport à celle de *C. rhizophorae*.

Une question se pose alors : S'agit-il vraiment de 2 espèces différentes ? En effet, l'étude des séquences et de leur pourcentage d'homologie indiquent qu'il y a des différences relativement importantes entre les séquences des 2 types (88.41 % d'homologie, tableau 6). Cependant il est difficile de séparer 2 espèces à partir d'un pourcentage : à partir de quel chiffre deux espèces sont-elles effectivement distinctes ?

De plus, étant donné que ces 2 espèces vivent en sympatrie au Brésil, une étude plus poussée en génétique des populations permettrait de dire s'il existe un flux de gènes entre elles. Un échantillonnage plus important dans cette zone ou dans d'autres où les 2 espèces sont présentes ensemble et une étude du polymorphisme intra et interspécifique permettrait de connaître le taux de divergence existant entre ces 2 espèces.

Des expériences complémentaires doivent alors être envisagées :

- croisements expérimentaux entre les 2 types présents au Brésil, un des critères de la spéciation étant l'isolement reproductif,
- études génétiques d'un grand nombre d'individus de chaque type afin d'estimer le polymorphisme intra et interpopulation.

Des études antérieures ainsi que les arbres phylogénétiques réalisés ici mettent en évidence des rapprochements entre espèces. *C. rhizophorae* et *C. virginica* sont proches et des hybrides peuvent être obtenus. De plus, il existe une zone hybride présentant un gradient de transition entre ces 2 espèces sur la côte sud du Golfe du Mexique (Rodriguez-Romero *et al*, 1998).

De même, des hybrides ont pu être obtenus entre *C. gigas* et *C. angulata* (Menzel, 1974 ;Boudry *et al*, 1999). Il est donc possible de faire des rapprochements entre les espèces : *Gigas-angulata* d'une part et *rhizophorae-virginica* d'autre part. *C. gasar* semble être intermédiaire entre ces 2 regroupements en étant toutefois plus proche de *rhizophorae-virginica* (arbres en figures 13a et 13b). Cette position fait de *C. gasar* une espèce pont, c'est-à-dire susceptible de transférer des caractères de résistance entre les 2 regroupements précédents par des croisements. En effet, *C. gigas* est résistante à des infections touchant *C. virginica*. Ainsi le croisement d'hybrides *gasar-gigas* résistants avec *C. virginica* pourrait peut-être permettre à cette dernière d'acquérir le caractère de résistance.

Cette étude est la première d'un point de vue génétique en ce qui concerne *C. gasar*. Il s'agit donc ici de résultats préliminaires concernant la position phylogénétique de cette espèce au sein du genre. Ceci devra être confirmé et étayé avec d'autres marqueurs moléculaires.

3. Etude de croisements entre *C. angulata* et *C. gigas*

- 3.1. Introduction

De nombreuses études ont été menées sur la distinction entre *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*. Les individus appartenant à ces deux taxons présentent les mêmes caractères morphologiques (coquille, charnière, structure des branchies). De plus, la plupart des données physiologiques et écologiques sont similaires. Les études génétiques sur les allozymes (Mathers et al., 1974; Mattiucci et Villani, 1983) n'apportent pas d'éléments suffisants permettant de les distinguer et concluent à leur forte homologie génétique.

Les croisements d'individus *Crassostrea angulata* et *C. gigas* donnent naissance à des hybrides viables (Burocker et al., 1979), (cette expérience a été effectuée au laboratoire génétique de la station Ifremer de La Tremblade). Ainsi le fait de les considérer comme deux espèces différentes est ici remis en cause. Il existe apparemment aucune barrière reproductive entre les deux taxons. Aussi, Menzel (1974) les considère comme 2 sous-espèces appartenant à l'espèce *C. gigas*, les nommant alors *Crassostrea gigas angulata* et *C. gigas gigas*.

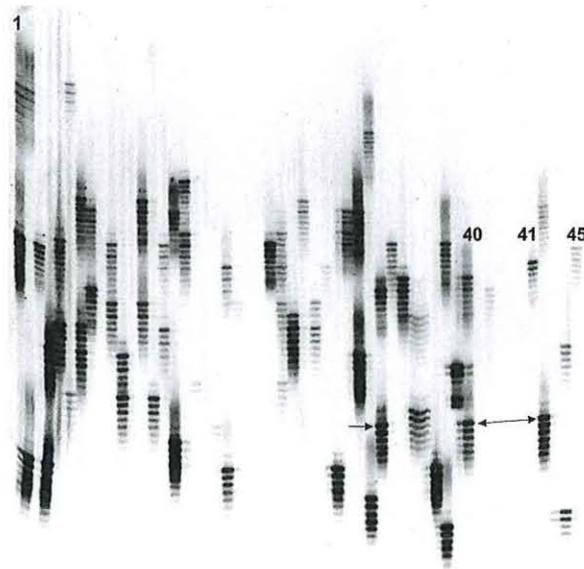
- 3.2. Objectifs de l'étude :

L'objectif était d'étudier le croisement *C. gigas* et *C. angulata* et plus particulièrement, l'existence éventuelle d'un isolement reproductif partiel entre ces deux taxons.

Nous avons analysé la voie mâle en estimant la compétition spermatique vis à vis de chaque type d'ovocyte. Nous avons donc effectué un mélange des deux types de gamètes mâles, en proportion équivalente, sur chacun des gamètes femelles. Suivant les lois classiques de l'hérédité, un tel croisement devrait donner une répartition égale : la moitié des descendants de type paternel *C. gigas* et l'autre moitié *C. angulata*. Le pourcentage d'hybrides ainsi obtenu pourra traduire, dans des conditions génétiques standards, l'existence ou non d'un isolement reproductif partiel entre *C. gigas* et *C. angulata*.

Nous avons donc analysé les parents de ce croisement à l'aide de marqueurs microsatellites, puis, nous avons typé sur ces mêmes marqueurs les descendants échantillonnés six heures après la fécondation.

Figure 1. Exemple d'un marqueur microsatellite (L16) sur un échantillon de parents et d'embryons.



Colonnes 1 à 40: 10 femelles *C. gigas* , 10 mâles *C. gigas* , 10 femelles *C. angulata* and 10 mâles *C. angulata*. lignes 41 to à: embryons. Colonne 42, le petit allèle (montré avec une flèche) a seulement été trouvé sur deux mâles *C. angulata*. Ceci met en évidence que le géniteur de cet embryon est *C. angulata*. Les colonnes vides sur le gel correspondent aux parents pour lesquels l'amplification par PCR n'a donné aucun résultat et qui ont été par conséquent ré-amplifiés.

• 3.3. Résultats

Les analyses des 40 parents aux 3 marqueurs microsatellites montrent une forte variabilité puisque les marqueurs CG44, L16 et L10 ont révélé respectivement 20, 23 et 24 allèles .Le nombre d'allèles communs entre *C. angulata* et *C. gigas* est de 20% pour le locus CG44, 25% pour L10 et de 34% pour L16. Tous loci confondus 35% des allèles sont spécifiques de *C. angulata* et 39% de *C. gigas*.

L'ADN de 373 embryons (62,2%) a été correctement amplifiés. Les 37,8% restants n'ont pu être amplifiés quelque soit celui des trois locus testés. Dans ce cas, les PCR ont été répétées , afin d'exclure dans un premier temps les problèmes techniques au niveau de l'étape d'amplification. Il semblerait que les difficultés d'amplification, soient en fait dues à des problèmes durant l'étape d'extraction de l'ADN plutôt qu'à des artéfacts de PCR.

Le tableau 1 donne l'assignement exact avec 1 , 2 et 3 locus microsatellites.

L'analyse par le marqueur CG44 des 373 embryons extraits permet l'assignement de 71% des embryons quelque soit le taxon. L'ajout du marqueur L10 permet d'élever ce

taux à 86% et le troisième marqueur L16 suffit à l'assignement taxinomique de l'ensemble des embryons correctement extraits.

Tableau 1. Pourcentage d'assignement des embryons par marqueur microsatellite.

Nombre de locus utilisés	1 : CG44	2: CG44, L10	3 : CG44, L10, L16
% d'embryons assignés issus des femelles <i>C. gigas</i>	63.8	81.8	100
% d'embryons assignés issus femelles <i>C. angulata</i>	77.2	89.6	100
Total % (pour les deux taxons)	71.1	86.1	100

Dans les croisements avec compétition spermatique, les contributions paternelles de chaque taxon sont attendues équilibrées. Nous attendons donc 50% d'individus "purs" et 50% d'individus hybrides. Dans le croisement femelles GG, les embryons *C. gigas* et les embryons hybrides représentent respectivement 56% et 44%, pourcentage qui ne sont pas statiquement différents de ceux attendus ($\chi^2=2.58$; ddl 1; $P>0.1$). Par contre, dans le croisement femelles AA, les embryons *C. angulata* représentent 34% alors que les embryons hybrides les 66% restants. Le nombre d'embryons hybrides observés est significativement supérieur à celui attendu sous l'hypothèse d'une fécondation aléatoire ($\chi^2=21.56$; ddl 1; $P>0.01$). Les nombre d'embryons purs et hybrides analysés sont également significativement différents entre les femelles AA et GG ($\chi^2=17.69$; ddl 1; $P>0.01$).

Tableau 2. Taxons paternel des embryons analysés de 6 heures.

croisement	Nombre d'embryons assignés	Nombre d'embryons de père <i>C. angulata</i>	Nombre d'embryons de père <i>C. gigas</i>
1: femelles <i>C. gigas</i>	171	75 (43.9 %)	96 (56.1 %)
2: femelles <i>C. angulata</i>	202	68 (33.6 %)	134 (66.3 %)

• 3.4. Conclusion

Aucune fécondation préférentielle n'a pu être mise en évidence. Au contraire, une plus forte contribution des mâles *C. gigas* a été montré pour les femelles *C. angulata*, ce qui pourrait suggérer un effet d'hétérosis précoce. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si la production croissante de *C. gigas* au sud de l'Europe menace la conservation des populations locales de *C. angulata*.

4. Réalisation et analyse de croisements entre *Crassostrea gigas* et deux autres espèces d'huîtres du genre *Crassostrea*

Les résultats présentés ci-dessous font suite à l'étude des potentialités d'hybridations inter-spécifiques déjà initiée de 1994 à 1998 à partir d'espèces importées et conservées dans le conservatoire de souches.

- 4.1. Croisement entre *Crassostrea gigas* et *C. ariakensis*

En 1998, un croisement inter-spécifique entre des individus de sexe femelle *C. gigas* et des individus de sexe mâle *C. ariakensis* a permis d'obtenir un lot d'animaux "hybride" viables présentant un taux de survie de 30% et des caractéristiques morphologiques proches de ceux du lot témoin *C. gigas* produit simultanément .

Une analyse de l'état d'hybridation de ces huîtres a donc été réalisée en 1999 en PCR-RFLP par l'utilisation du marqueur nucléaire diagnostique 28S (séquence D'ADN codant pour l'ARNr 28S) (Littlewood, 1994) et de l'enzyme de restriction *Bgl*III .

L'observation des profils de restrictions obtenus après migration électrophorétique des produits de digestions sur gel d'agarose, a permis de confirmer l'état hybride des animaux issus du croisement entre *C. gigas* et *C. ariakensis*.

- 4.2. Croisement entre *Crassostrea gigas* et *C. sikamea*

En 1999, des essais de reproductions par croisements intra et inter-spécifiques entre des géniteurs *Crassostrea gigas* locales et des individus de la première génération de *Crassostrea sikamea* obtenue au sein du conservatoire de souches ont permis de produire 3 lots bi-parentaux de plusieurs centaines d'individus :

- Un lot témoin de *C. gigas* x *C. gigas*

- Un lot issu du croisement femelle *C. gigas* x mâle *C. sikamea*

- Un lot issu du croisement femelle *C. sikamea* x mâle *C. gigas*

Une analyse par marqueur moléculaire nucléaire ITS (Hedgecock *et al*, 1999) a été réalisée récemment sur des individus des différents lots. Le statut hybride du troisième lot *C. sikamea* x *C. gigas* a été confirmé, mais l'utilisation d'autres marqueurs moléculaires nucléaires ou microsatellites s'avère nécessaire pour définir le statut du deuxième lot *C. gigas* x *C. sikamea*.

L'ensemble des animaux hybrides produits au cours de ces deux différents croisements sont stockés dans le nouveau local du conservatoire de souches de la station de Ronce les bains construit en 1999.

5. Bibliographie

- Allen S.K. et Gaffney P.M. (1993). Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea rivularis* (Gould). *Aquaculture* 113: 291-300.
- Arnold M.L. (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *An. Rev. Ecol. Syst.*, 23: 237-61
- Banks M.A., Hedgecock D., Waters C. (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2: 129-136.
- Barton N.H. and Hewitt G.M. (1985) Analysis of hybrid zones. *An. Rev. Ecol. Syst.*, 16: 113-148.
- Barton N.H. and Hewitt G.M. (1989) Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* 341: 497-503.
- Beaumont A.R., Abdul-Matin A.K.M. and Seed R. (1993) Early development, survival and growth in pure and hybrid larvae of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Moll. Stud.*, 59 : 120-123.
- Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y. and Bonhomme F. (1998) Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics*, 55 : 190-195.
- Boudry P., Heurtebise S., Collet B., Cornette F. and Gerard A. (1998) 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. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226: 279-291.
- Boudry P., Heurtebise S., Huvet A., Chollet B., Ledu C., Phélipot P. and Gérard A. (1999). Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : hybridation et conservatoire de souches. Synthèse finale.
- Buroker N. E., Hershberger W. K., Chew K. K. (1979). Population genetics of the Family Ostreidae. I. Intraspecific studies of genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar. Biol.* 54: 171-184.
- Edmands S. (1999) Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution*, 53 : 1757-1768.
- Estoup A., Largiader C.D., Perrot E. and Chourrout D. (1996) Rapid one-tube extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 5(4) : 295-598.
- Felsenstein (1993). PHYLIP : Phylogeny Inference Package, version 3.5
- Gaffney P.M. and Allen S.K. (1993) Hybridization among *Crassostrea* species: a review. *Aquaculture*, 116 : 1-13.
- Gardner J.P.A. (1997) Hybridization in the sea. *Adv Mar Biol*, 31, 1-78.
- Gilles S. (1991). Settlement and growth of the West African mangrove oyster, *Crassostrea gasar*, in the Casamance, Senegal. *Rev. Hydrobiol. Trop.* vol.24, No. 3: 197-207.
- Harrison R.G. (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7, 69-128.
- Hedgecock D., McGoldrick D.J., Manahan D.T., Vavra J., Appelmans N. and Bayne B.L. (1996) Quantitative and molecular genetic analyses of heterosis in bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 203 : 49-59.

- Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C. and Bonhomme F. (2000) Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Anim. Genet.* 31: 71-72.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Ladron De Guevara B., Winkler F., Rodriguez-Romero F. and Palma-Rojas C. (1996). Comparative karyology of four american oyster species. *The Veliger* 39 (3): 260-266.
- Lamarck J.B.M. (1819) *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres*, Vol. 6, Paris.
- Larzul D. (1993). La PCR. Un procédé de réplication *in vitro*. *Technique & Documentation- Lavoisier*.
- Launey S. and Hedgecock D. (1999) Genetic load causes segregation distortion in oysters: mapping at 6 hours. *Plant & Animal Genome VII Conference*. January 17-21, 1999, San Diego, USA.
- Leroux F. et Desmarais E. (1998). Formation en Biologie moléculaire (BIO-formation. Institut de formation continue).
- Liou L.W. and Price T.D. (1994) Speciation by reinforcement of premating isolation. *Evolution* 48: 1451-1459.
- Littlewood D.T.J (1994). Molecular phylogenetic of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 3(3): 221-229
- Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V. and Zouros E. (1998) Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Anim. Genet.* 29: 63-72.
- Mathers N.F., Wilkins N.P. and Walne P.R. (1974). Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. gigas*. *Biochem Syst Ecol* 2: 93-96.
- Mattiucci S. and Villani F. (1983) Studio elettroforetico dei sistemi gene-enzima in ostriche classificate come *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca: *Ostreidae*). *Parasitologia* 25: 21-27.
- Menzel R.W. (1974). Portuguese and Japanese oysters are the same species. *J. Fish. Res. Board Can.* 31: 453-456.
- Nei M. et Saitou (1987). Genetic distance and molecular phylogeny. *Population Genetic and Fishery Management* : 193-223
- Norris A.T., Bradley D.G. and Cunningham E.P. (2000) Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182: 73-83.
- O' Foighil D., Gaffner P.M., Hilbish T.J. (1995). Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* (Wakiya)] oyster species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 192: 211-220
- O' Foighil D., Gaffney P.M., Wilbur A.E., Hilbish T.J. (1998). Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar. Biol.* 131(3): 497-503.
- Page R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Palumbi S.R. (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 25, 547-572.
- Palumbi S.R. and Metz E.C. (1991) Strong reproductive isolation between closely related tropical sea urchins (genus *Echinometra*). *Mol. Biol. Evol.* 8(2) : 227-239.

- Pereira O.M., Das Chagas Soares F. (1996). Analysis on cultivation of oyster *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) at Guarapari Station, in Cananeia- SP lacunar- estuarine region. *Boletim do Instituto de Pesca Sao Paulo*.
- Rodriguez-Romero F., Laguarda-Figueras A., Uribe-Alcocer M. (1979). Comparative analysis of the karyotypes of two oyster species of the genus *Crassostrea* from Mexico : *C. virginica* and *C. corteziensis*. *An. Centro Cienc. Del Mar y limnol. Univ. Nal. Auton. Mexico*, 6 (1): 19-24.
- Rodriguez-Romero F., Uribe-Alcocer M., Laguarda-Figueras A. and Diupotex-Chong M. E. (1979). The karyotype of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). *VENUS* (Jap. Jour. Malac.) 38(2): 135-140.
- Rodriguez-Romero F. and Garca-Montes de Oca M. (1998). Chromosomes of the experimental hybrid of *Crassostrea virginica* Gmelin 1791 and *Crassostrea rhizophorae* Guilding 1828 (Pseudolamellibranchiata : Ostreidae). *Ciencias Marinas* 24(1): 55-63.
- Roques S., Duchesne P. and Bernatchez L. (1999) Potential of microsatellites for individuals assignment: the north Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study. *Mol. Ecol.* 8: 1703-1717.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. and Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. S. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467
- Singarajah K.V. (1980). On the taxonomy, ecology and physiology of a giant oyster, *Crassostrea paraibanensis*, new species. *Bull. Marine Sc.*, 30(4) : 833-847, 1980
- Solignac M., Périquet G., Anxolabéhère D. and Petit C. (1995). *Génétique et Evolution. Tome II : L'espèce, l'évolution moléculaire.* Edition Hermann, éditeurs des sciences et des arts. 161-162 .
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.