

Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998

Convention 95/RPC-R-57 "Génétique"

ACCLIMATATION DE NOUVELLES ESPECES D'HUITRES CREUSES

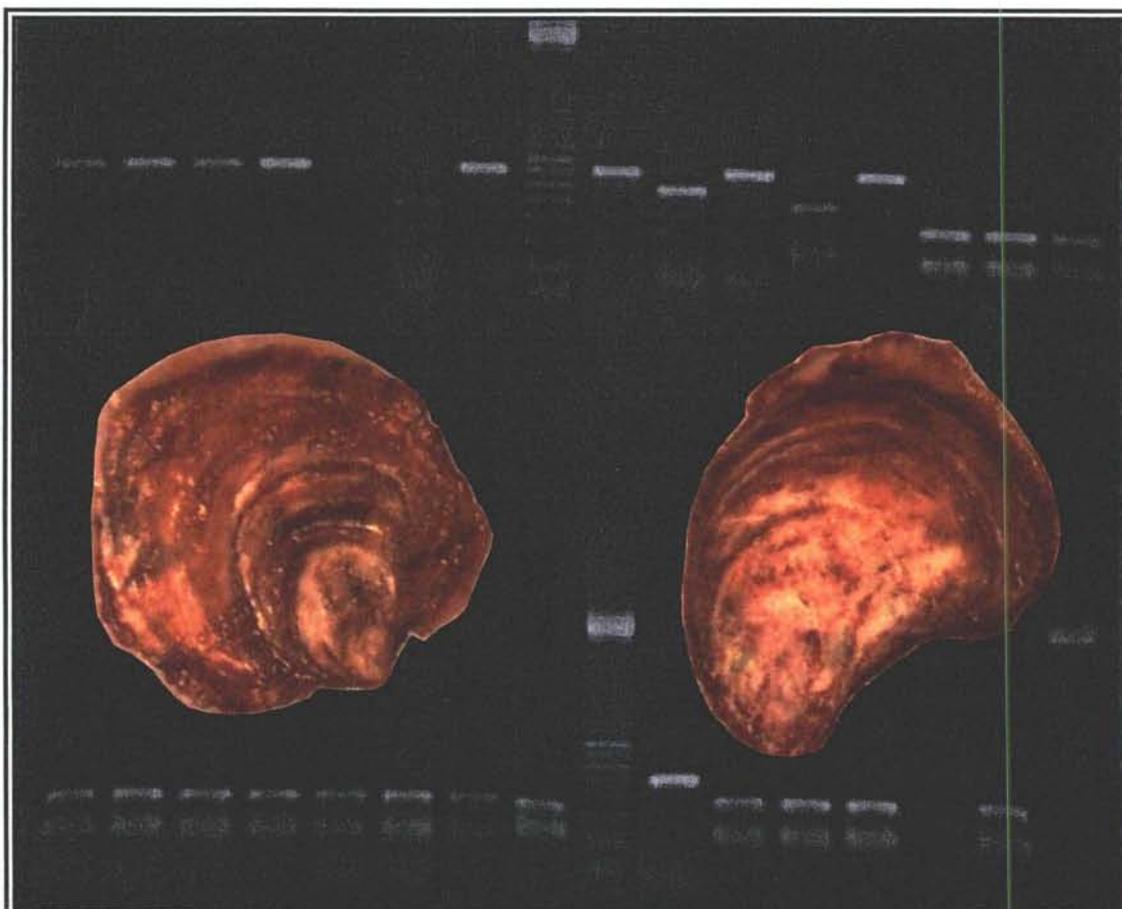
DU GENRE *CRASSOSTREA* :

HYBRIDATIONS ET CONSERVATOIRE DE SOUCHES

rapport année 1995

**P. BOUDRY, Y. NACIRI, S. HEURTEBISE, C. DELSERT
C. LEDU, P. PHELIPOT, B. CHOLLET, N. COCHENNEC**

sous la direction de GERARD A.



Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie

Unité de Recherche en Génétique

B.P. 133 -17390 - La Tremblade (FRANCE)

Tél. : 46 36 98 36

Fax : 46 36 37 51

IFREMER

Rapport de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER
Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998.

ACCLIMATATION DE NOUVELLES ESPECES D'HUITRES CREUSES
DU GENRE *CRASSOSTREA* :
HYBRIDATIONS ET CONSERVATOIRE DE SOUCHES
rapport année 1995

P. BOUDRY, Y. NACIRI, , S. HEURTEBISE, C. DELSERT
C. LEDU, P. PHELIPOT, B. CHOLLET, N. COCHENNEC
sous la direction de **GERARD A.**

-

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Génétique
B.P. 133 -17390 - La Tremblade (FRANCE)
Tél. : 46 36 98 36
Fax : 46 36 37 51

SOMMAIRE

1. Introduction : rappel du contexte professionnel et des objectifs scientifiques du programme	3
2. Actions menées pour l'année 1995	5
2.1. inventaire de début de saison	5
2.2. Importations réalisées	5
2.3. Contrôles sanitaires avant et après importations (réalisés par l'URPIG)	6
2.4. Croisements effectués à l'écloserie:	8
2.5. Inventaire du Conservatoire en fin de saison	10
2.6. Comparaison des taux de fécondation inter-spécifiques	10
3. Développement de marqueurs moléculaires du génome mitochondrial	13
3.1. Introduction	13
3.2. Matériel et Méthodes	13
3.2.1. Matériel biologique:	13
3.2.2. Extraction de l'ADN total	14
3.2.3. Amplification PCR	14
3.2.4. Digestion par enzyme de restriction	15
3.2.5. Migration sur gel d'agarose	15
3.3. Résultats	16
3.3.1. Amplifications	16
3.3.2. Polymorphisme de longueur de fragments de restriction	16
3.3.3. Conclusions et perspectives	18
4. Conclusion Générale et Perspectives pour 1996	19
5. Références bibliographiques	20

1. Introduction : rappel du contexte professionnel et des objectifs scientifiques du programme

L'histoire de l'ostréiculture est émaillée, en France ainsi que dans d'autres pays, d'une succession de phase de développement, de surexploitation, d'apparition de maladies qui perturbent fortement les productions et conduisent parfois à adapter de nouvelles techniques d'élevage après introduction d'espèces non-indigènes. Ces éléments historiques montrent la nécessité d'aménager les bassins conchylicoles afin d'éviter à la fois la surexploitation et la "fragilisation" des populations vis à vis des agents pathogènes.

Depuis la disparition massive de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, victime entre 1969 et 1971 d'une épidémie virale, et de l'effondrement de l'élevage de l'huître plate, *Ostrea edulis*, qui subi l'impact de deux parasitoses la martelliose et la bonamiose, l'ostréiculture française connaît actuellement **une situation de monoculture de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas***, suite à l'introduction massive de l'espèce entre 1971 et 1975 (Grizel et Héral, 1991). Or, en Amérique du Nord, deux maladies ont déjà été identifiées sur *C. gigas* : le *Mikrocytos mackini* (protozoaire) et l'OVVD (Oyster Velar Virus Disease, virus s'attaquant uniquement aux larves) (Elston et Wilkinson, 1985). Ces maladies n'ont pour l'instant pas été signalées en France, mais leur introduction accidentelle pourrait avoir des conséquences catastrophiques sur l'économie de l'ostréiculture française. Cette situation serait d'une gravité d'autant plus aiguë que la situation de monoculture, les fortes densités d'élevage couramment pratiquées, ainsi que les pratiques culturales consistant à transférer des lots d'une région ostréicole à l'autre (entre Normandie et Bassin de Marennes-Oléron par exemple), provoqueraient une extension fulgurante de la maladie.

Face à ce danger potentiel, trois attitudes prévalent :

- le **contrôle zoosanitaire** des importations (objet des directives CEE et mission des services vétérinaires),
- la **recherche d'outils de diagnostic** adaptés pour effectuer des contrôles zoosanitaires fiables,
- la **recherche de nouvelles "souches" ou d'espèces de remplacement** dans le cas éventuel d'une épizootie grave sur l'huître creuse *C. gigas*.

Le laboratoire IFREMER "Génétique Aquaculture et Pathologie" (GAP) (La Tremblade et Bouin) a donc entrepris des actions de recherche sur ces différents points. L'Unité de Recherche en Génétique, en collaboration avec tous les membres du Réseau Génétique Mollusques (REGEMO), a axé une partie de ses travaux sur l'acclimatation

et l'hybridation de différentes espèces du genre *Crassostrea*. Ces recherches ont débuté avec le soutien du Conseil Général de Charente-Maritime depuis 1992 sur des essais d'acclimatation de *C. virginica*, l'huître creuse américaine. En prolongement de cette étude, l'URGE a proposé à la région Poitou-Charentes un programme de recherche plus vaste sur l'ensemble des espèces d'huîtres creuses. Dans cette optique, nous proposons de réaliser au cours des 5 années de programme :

- **Une revue bibliographique** des différentes espèces d'huîtres creuses vivant dans le monde et leurs potentialités en terme de diversification des productions locales. Cette revue a été présentée dans le rapport 1994 sous forme de fiches synthétiques, présentant les principales caractéristiques biologiques et écologiques des espèces, leurs distributions géographiques, les formes d'exploitation commerciale, les possibilités de croisements inter-spécifiques et les maladies identifiées.
- **Des essais d'acclimatation** de quelques espèces qui sont choisies en fonction de cette recherche bibliographique et des possibilités d'importation d'huîtres indemnes de tout agent pathogène. Ceci suppose des examens pathologiques préalables, qui seront pris en charge par l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (URPIG) de La Tremblade, conformément aux recommandations d'importation du C.I.E.M. (Conseil International d'Exploitation de la Mer).
- **Des croisements intra-spécifiques** et des élevages comparatifs sont réalisés en milieu fermé (salle de quarantaine avec stérilisation des eaux de rejet) dans l'optique d'identifier les espèces susceptibles d'être acclimatées aux conditions d'élevages en métropole.
- **Des croisements inter-spécifiques** sont tentés visant à contrôler le confinement génétique des nouvelles espèces acclimatées, ainsi que les performances (croissance, fertilité) des hybrides éventuellement obtenus.
- **Une étude génétique des populations naturelles et cultivées de *C. gigas*** visant à définir la structuration génétique de ces populations et la différenciation des stocks, et de tester certaines populations pour rechercher des caractéristiques originales susceptibles d'améliorer les performances d'élevage de *C. gigas* en France. A plus long terme, ces informations permettront de définir une politique de gestion des ressources génétiques de l'espèce.
- **Une recherche de marqueurs moléculaires** pour caractériser les populations et les espèces. Il s'agit de marqueurs de l'ADN nucléaire hypervariables (de type microsatellite ou anonyme simple copie) pour la discrimination fine des populations, ou, dans un premier temps, de l'ADN mitochondrial pour la distinction entre espèces.

2. Actions menées pour l'année 1995

2.1. inventaire de début de saison

L'inventaire des animaux du conservatoire de souches au début 1995 est présenté dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Inventaire des animaux au début 1995

Espèce	Origine	Génération / année d'arrivée ou de production	Effectif
<i>Crassostrea virginica</i>	Canada	G0 / 1994	76
<i>Crassostrea virginica</i>	Pays de Galles	G1 / 1992	97
<i>Crassostrea rivularis</i>	U.S.A.	G0 diploïdes / 1994	84
<i>Crassostrea rivularis</i>	U.S.A.	G0 triploïdes / 1994	103

Les objectifs pour l'année 1995 étaient donc les suivants :

1. Assurer une **première reproduction** pour les espèces où des géniteurs G0 sont disponibles. L'objectif est ici de limiter au maximum le stockage d'animaux importés ; et de produire une descendance qui pourra être directement comparée avec des témoins *C. gigas* produits conjointement.
2. **Hybridations inter-spécifiques** : tenter l'hybridation des différents taxons présents en fonction des connaissances disponibles dans la littérature sur ce sujet (voir pour revue Gaffney et Allen, 1993)
3. importation de **nouvelles souches ou espèces** : Elargir la gamme des espèces présentes au sein du conservatoire de souches (en fonction des capacités d'accueil limitées de notre salle de quarantaine).

2.2. Importations réalisées

Les importations suivantes ont été réalisées au cours de l'année 1995 (en incluant début 1996) :

1. ***Crassostrea angulata***: 89 individus en provenance d'Espagne (Chiclana, province de Cadiz). Réception le 4/7/95 après examen histologique par l'URPIG sur 30 individus.
2. ***Crassostrea angulata***: 81 individus en provenance du Portugal (baie de Setubal). Réception le 18/01/96 avec examen à la réception.

3. ***Crassostrea sikamea*** : 180 Individus en provenance de Californie (Bodega Bay, Californie). Réception le 10/9/95, après examen histologique par l'URPIG sur 30 individus.
4. ***Crassostrea gigas*** : 150 individus en provenance de Corée du Sud (NFRDA, Pusan). Réception le 3/6/95 avec examen à la réception.

Les importations de *C. angulata* et *C. sikamea* se sont réalisées dans de bonnes conditions et peu de mortalités ont été observées suite au transfert. On peut donc raisonnablement espérer utiliser ces individus comme géniteurs pour la saison de reproduction 1996.

Par contre l'importation de *C. gigas* en provenance de Corée a été un échec, dans le sens où les huîtres ont été détruites car certaines étaient porteuses du parasite *Martelioides* sp.

2.3. Contrôles sanitaires avant et après importations (réalisés par l'URPIG)

Un total de 321 individus originaires de divers pays ont fait l'objet d'une analyse en microscopie photonique. Ces analyses ont concerné 4 espèces différentes :

- 219 *Crassostrea gigas*.
- 30 *Crassostrea angulata*.
- 32 *Crassostrea sikamea*.
- 40 *Crassostrea rivularis*.

3 différents types d'échantillons peuvent être distingués :

- Les échantillons reçus fixés (animaux fixés dans du "Carson"), pour contrôle avant importation.
- Les échantillons prélevés sur animaux vivants (individus sacrifiés à leur arrivée pour contrôle sanitaire, notamment en cas d'importation sans contrôle préalable).
- Les échantillons prélevés sur animaux morts au sein du conservatoire pour rechercher la cause de ces mortalités.

Le cas de l'importation de *C. gigas* en provenance de Corée, sans qu'il n'ait été possible d'effectuer un contrôle sanitaire préalable, est un exemple caractéristique des risques liés à l'importation d'huîtres en provenance de pays éloignés. La présence d'individus porteurs du parasite *Martelioides* sp. illustre la nécessité d'un contrôle rigoureux avant importation et du maintien des animaux en salle de quarantaine après importation. En effet, les contrôles préalables sont habituellement réalisés sur environ 30 individus. Ce contrôle préalable a pour objectif de s'assurer que le lot candidat à l'importation n'est pas porteur de tel ou tel parasite ou maladie connue. Par contre, ces contrôles préalables ne garantissent en aucun cas l'absence de pathogène dans le lot qui sera importé. Des contrôles sont donc nécessaires

après importation (notamment sur les huîtres qui meurent en salle de quarantaine). Pour le cas des *C. gigas* de Corée, le *Martelioïdes* a été repérés sur seulement 3 individus sur un total de 149, suite à des mortalités qui auraient pu être considérées comme "normales" quelques jours après l'arrivée du lot au sein du Conservatoire. L'ensemble du lot a été détruit pour éviter tout risque de contamination. Ceci souligne donc la nécessité d'un suivi très strict des lots importés.

Tableau 2 : Résultats des différents examens histologiques

Espèce	Origine	Nombre d'analyses	Résultats
<i>C. gigas</i>	Irlande	70	- 3 animaux à suspicion d'herpès. - 2 animaux avec des corpuscules éosinophiles. - 3 animaux avec des ciliés. - 2 animaux avec une hypertrophie de certains diverticules digestifs.
<i>C. gigas</i>	Corée du Sud	149 (après importation) : 7 Ax histo. 142 Ax frottis	- 3 animaux avec des parasites de type <i>Martelioïdes</i> . - 2 animaux avec des ciliés.
<i>C. angulata</i>	Espagne	30 (avant importation)	- 10 animaux présentant des images de type kystique d'origine indéterminé, dans la glande digestive
<i>C. sikamea</i>	U.S.A.	20 (avant importation)	- 2 animaux avec une prolifération de cellules brunes. - 5 animaux avec des ciliés. - 1 animal avec des rickettsies.
<i>C. sikamea</i>	U.S.A.	12 (après importation)	- 5 animaux avec des parasites de type <i>Martelioïdes</i> . - 3 animaux avec des corpuscules éosinophiles.
<i>C. rivularis</i>	U.S.A.	40 (après importation)	- 3 animaux présentant de parasites de type <i>Bonamia</i> .

Lexique :

- Martelioïdes : Protozoaire parasite de la gonade de l'huître creuse.
- Rickettsies : Bactéries intracellulaires.

2.4. Croisements effectués à l'écloserie:

Les animaux présents au sein du conservatoire de souche ont permis de réaliser des croisements intra- et inter-spécifiques. L'ensemble des croisements ont été réalisés par "stripping" afin de d'éviter les risques de fécondations incontrôlées.

Tableau 3 : Elevages larvaires réalisés en 1995 pour le Conservatoire de Souches

Date	Elevages	Femelles (nombre de géniteurs)	Mâles (nombre de géniteurs)	Résultats
12/6/95	RSCG9524 Lot 1 : Lot 2 :	<i>C. gigas</i> "lisses" (8) <i>C. gigas</i> "frisées" (8)	<i>C. gigas</i> "lisses" (7) <i>C. gigas</i> "frisées" (6)	Lots supprimés à J7 pour raisons sanitaires 100 % normales 100 % "anormales"
15/6/95	RSGR9525 Lot 1 : Lot 2 :	<i>C. gigas</i> (7) <i>C. gigas</i> (7)	<i>C. gigas</i> (3) <i>C. rivularis</i> (16)	Pas de femelles <i>C. rivularis</i> 100 % normales 100 % normales
4/7/95	RSGR9525 Lot 1 : Lot 2 :	<i>C. gigas</i> (1) <i>C. gigas</i> (1)	<i>C. gigas</i> (1) <i>C. rivularis</i> (1)	Pas de femelles <i>C. rivularis</i> OK pas de larves
22/8/95	RSGX9538 Lot 1 : Lot 2 : Lot 3 : Lot 4 : Lot 5 : Lot 6 : Lot 7 : Lot 8 : Lot 9 : Lot 10 : Lot 11 : Lot 12 : Lot 13 : Lot 14 : Lot 15 : Lot 16 :	<i>C. gigas</i> (4) <i>C. angulata</i> (2) <i>C. sikamea</i> (7) <i>C. rivularis</i> (2) <i>C. gigas</i> (4) <i>C. angulata</i> (2) <i>C. sikamea</i> (7) <i>C. rivularis</i> (2) <i>C. gigas</i> (4) <i>C. angulata</i> (2) <i>C. sikamea</i> (7) <i>C. rivularis</i> (2) <i>C. gigas</i> (4) <i>C. angulata</i> (2) <i>C. sikamea</i> (7) <i>C. rivularis</i> (2)	<i>C. gigas</i> (3) <i>C. gigas</i> (3) <i>C. gigas</i> (3) <i>C. gigas</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. rivularis</i> (5) <i>C. rivularis</i> (5) <i>C. rivularis</i> (5) <i>C. rivularis</i> (5)	Jeté à J8 Jeté à J13 Jeté à J13 Jeté à J10 Jeté à J10 Jeté à J13 Jeté à J10 Jeté à J8 Jeté à J13 Jeté à J13 Jeté à J15 Jeté à J6 Jeté à J13 Jeté à J15 Jeté à J13 Jeté à J10
12/9/95	RSGX9541 Lot 1 : Lot 2 : Lot 3 : Lot 4 : Lot 5 : Lot 6 : Lot 7 : Lot 8 : Lot 9 : Lot 10 : Lot 11 : Lot 12 :	<i>C. gigas</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. gigas</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. gigas</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. gigas</i> (3) <i>C. angulata</i> (3) <i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. gigas</i> (2) <i>C. gigas</i> (2) <i>C. gigas</i> (2) <i>C. angulata</i> (2) <i>C. angulata</i> (2) <i>C. angulata</i> (2) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. sikamea</i> (2) <i>C. rivularis</i> (3) <i>C. rivularis</i> (3) <i>C. rivularis</i> (3)	Jeté à J22 Jeté à J1 Jeté à J10 Jeté à J22 Jeté à J1 90% larves normales Jeté à J13 Jeté à J1 90% larves normales Jeté à J1 Jeté à J1 Jeté à J8
14/9/95	RSCA9542 Lot 1 : Lot 2 :	<i>C. angulata</i> (4) (double du Lot 1)	<i>C. angulata</i> (3)	Jeté à J13 Jeté à J15
21/9/95	RSCA9542 Lot 1 :	<i>C. angulata</i> (5)	<i>C. angulata</i> (5)	jeté à J10

Le bilan de l'ensemble des croisements réalisés en 1995 est donc assez faible en terme d'élevages. les **principaux problèmes rencontrés** ont été les suivants :

1. Peu ou pas de maturation chez *C. virginica*, ce qui explique l'absence de reproduction de cette espèce cette année.
2. Seules 2 individus femelles ont été observées chez *C. rivularis*, ce qui explique l'absence de reproduction intra-spécifique de cette espèce cette année.
3. Des mortalités importantes en élevage larvaire sur l'ensemble des lots (témoins *C. gigas* compris) à la fin du mois d'Août et début septembre.

Les lots suivants sont donc **actuellement en élevage** en salle de quarantaine :

RSGR9525 :

Lot 1 : *C. gigas* x *C. gigas* (lot témoin)

Lot 2 : *C. gigas* x *C. rivularis* (lot hybride présentant environ 40 huîtres dont la morphologie est bien distincte de celle des individus du lot témoin; les autres individus étant vraisemblablement des "contaminations" de *C. gigas* "pure").

RSGX9541

Lot 6 : *C. sikamea* x *C. angulata*

Lot 9 : *C. sikamea* x *C. sikamea*

2.5. Inventaire du Conservatoire en fin de saison

Tableau 4 : Inventaire des animaux à la fin 1995

Espèce	Origine	Génération / année d'arrivée ou de production	Effectif
<i>C. virginica</i>	Canada	G0 / 1994	62
<i>C. virginica</i>	Pays de Galles	G1 / 1992	91
<i>C. rivularis</i>	U.S.A.	G0 diploïdes / 1994	12
<i>C. gigas</i> x <i>C. rivularis</i>	Conservatoire de souches	hybrides G1 / 1995	≈ 40 (+ un lot témoin <i>C. gigas</i> x <i>C. gigas</i> et des "contaminants")
<i>C. angulata</i>	Espagne	G0 / 1995	74
<i>C. angulata</i>	Portugal	GO / 1996	75
<i>C. sikamea</i>	U.S.A.	GO / 1995	136
<i>C. sikamea</i>	U.S.A.	G1 / 1995	≈ 100
<i>C. sikamea</i> x <i>C. angulata</i>	Conservatoire de souches	hybrides G1 / 1995	≈ 75

Sur 10 raceways disponibles, 9 sont occupés.

2.6. Comparaison des taux de fécondation inter-spécifiques

La comparaison des taux de fécondation obtenus pour les différents taxons pour les deux tentatives d'hybridations (RSGX9538 et RSGX9541) fournit des résultats très intéressants. Les tableaux suivants donnent le détail de ces taux de fécondation absolus ou relatifs (par rapport au taux observé en intra-spécifique).

RSGX9538

Tableau 5 : Pourcentage de fécondation = (larves comptées à J1 / ovules à J0) x 100

♀	♂	<i>C. gigas</i> (3)	<i>C. angulata</i> (4)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (5)
<i>C. gigas</i> (4)		16.4	22.5	6.1	0.05
<i>C. angulata</i> (2)		18.3	15	4.6	2.5
<i>C. sikamea</i> (7)		1.5	0.3	3.8	0.1
<i>C. rivularis</i> (2)		0.3	3.8	1.2	30.7

Tableau 6 : Pourcentage de fécondation en considérant les performances des mâles en intra-spécifique = (pourcentage de fécondation / pourcentage de fécondation en intra-spécifique pour les mâles de l'espèce concernée) x 100. Les comparaisons sont donc à faire en colonne par rapport à la valeur 100 en intra-spécifique.

♀	♂	<i>C. gigas</i> (3)	<i>C. angulata</i> (4)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (5)
<i>C. gigas</i> (4)		100	137	37	0.3
<i>C. angulata</i> (2)		122	100	31	17
<i>C. sikamea</i> (7)		39	8	100	3
<i>C. rivularis</i> (2)		1	12	4	100

Tableau 7 : Pourcentage de fécondation en considérant les performances des femelles en intra-spécifique = (pourcentage de fécondation / pourcentage de fécondation en intra-spécifique pour les femelles de l'espèce concernée) x 100. Les comparaisons sont donc à faire en ligne par rapport à la valeur 100 en intra-spécifique.

♀	♂	<i>C. gigas</i> (3)	<i>C. angulata</i> (4)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (5)
<i>C. gigas</i> (4)		100	150	161	0.1
<i>C. angulata</i> (2)		111	100	121	8
<i>C. sikamea</i> (7)		9	2	100	0.3
<i>C. rivularis</i> (2)		2	25	31	100

On remarque qu'il n'existe pas de différences majeures selon le sens du croisement, à l'exception de *C. sikamea*, dont la compatibilité avec *C. gigas* et *C. angulata* est clairement supérieure comme mâle (6,1 et 4,6 %) que comme femelle (1,5 et 0,3 %). On peut également remarquer la différence de performance entre *C. angulata* et *C. gigas* sur *C. rivularis* (en moyenne 21 contre 1,2).

Ces résultats peuvent donc être globalement résumés par le tableau suivant :

Tableau 8 : Résumé des pourcentages relatif de fécondation (moyenne mâle + femelle)

	<i>C. gigas</i>	<i>C. angulata</i>	<i>C. sikamea</i>	<i>C. rivularis</i>
<i>C. gigas</i>	100	121	23	1,2
<i>C. angulata</i>		100	17	21
<i>C. sikamea</i>			100	16
<i>C. rivularis</i>				100

RSGX9541

Tableau 9 : Pourcentage de fécondation = (larves comptées à J1 / ovules à J0) x 100

♀	♂	<i>C. gigas</i> (2)	<i>C. angulata</i> (2)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (3)
<i>C. gigas</i> (3)		34.9	25.1	0.2	0
<i>C. sikamea</i> (2)		12.5	14.2	15.6	0.7

Tableau 10 : Pourcentage de fécondation en considérant les performances des mâles en intra-spécifique = (pourcentage de fécondation / pourcentage de fécondation en intra-spécifique pour les mâles de l'espèce concernée) x 100. Les comparaisons sont donc à faire en colonne par rapport à la valeur 100 en intra-spécifique.

♀	♂	<i>C. gigas</i> (2)	<i>C. angulata</i> (2)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (3)
<i>C. gigas</i> (3)		100	/	1	/
<i>C. sikamea</i> (2)		36	/	100	/

Tableau 11 : Pourcentage de fécondation en considérant les performances des femelles en intra-spécifique = (pourcentage de fécondation / pourcentage de fécondation en intra-spécifique pour les femelles de l'espèce concernée) x 100. Les comparaisons sont donc à faire en ligne par rapport à la valeur 100 en intra-spécifique.

♀	♂	<i>C. gigas</i> (2)	<i>C. angulata</i> (2)	<i>C. sikamea</i> (2)	<i>C. rivularis</i> (3)
<i>C. gigas</i> (3)		100	72	0.5	0
<i>C. sikamea</i> (2)		80	91	100	4.5

Cette seconde expérience est moins complète que la précédente pour cause d'absence de femelles *C. rivularis* et de la contamination des lots ayant comme parent femelle *C. angulata*. On remarquera des résultats inverses à ceux de l'expérience précédente en ce qui concernent *C. sikamea*, dont la compatibilité avec *C. gigas* et *C. angulata* est cette fois supérieure comme femelle (80 et 91 %) que comme mâle (0.5 %).

3. Développement de marqueurs moléculaires du génome mitochondrial

3.1. Introduction

La recherche de marqueurs moléculaires du génome mitochondrial chez les huîtres creuses du genre *Crassostrea* a pour objectif principal de pouvoir identifier avec certitude chaque espèce ou taxon, ainsi que les hybrides inter-spécifiques (et cela à tous les stades de développement). De plus ces marqueurs peuvent servir de base à l'étude des relations phylogénétiques entre espèces. Les résultats obtenus en 1995 concernent le génome mitochondrial. La recherche de marqueurs nucléaires a commencé en 1996.

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

- La relative simplicité de la technique, par rapport aux R.F.L.P. sur ADN mitochondrial purifié comme celle utilisée 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 possibilité d'utiliser les ADN totaux pour d'autres types de marqueurs, comme les microsatellites qui seront prochainement développés chez *C. gigas*.
- La possibilité de séquencer ces fragments (séquencage direct des produits de P.C.R.) afin d'obtenir des informations sur les relations phylogénétiques entre les espèces.

3.2. Matériel et Méthodes

3.2.1. Matériel biologique:

Le matériel biologique disponible est de deux types:

1. Des fragments de tissus sont prélevés par biopsie sur les huîtres vivantes présentent au sein du conservatoire de souche. L'ensemble des individus adultes sont numérotés de manière à pouvoir revenir sur des animaux présentant des caractéristiques génétiques particulière (en cas de polymorphisme intra-spécifique). L'ensemble des animaux disponibles est résumé dans le tableau 4.
2. Des échantillons de tissus conservés congelés ou dans l'éthanol absolu. Les échantillons actuellement disponibles sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Liste des échantillons conservés en alcool pour extraction d'ADN.

Espèce	Origine	Effectif
<i>C. gigas</i>	Irlande	≈ 30
	Corée	≈ 150
<i>C. gasar</i>	Sénégal	1
<i>C. iredalei</i>	Thaïlande	1
<i>C. belcheria</i>	Thaïlande	1
<i>S. commercialis</i>	Nouvelle-Calédonie	30
<i>C. rivularis</i>	USA	≈ 30

3.2.2. Extraction de l'ADN total

L'ADN de chaque individu est extrait suivant le protocole décrit dans Naciriet *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.

3.2.3. 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.

Tableau 13 : Présentation des Amorces utilisées

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

3.2.4. Digestion par enzyme de restriction

Les produits d'amplification sont directement digérés par 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) avec 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 caractéristiques des enzymes testées: 7 enzymes à 4 paires de bases et 1 à 6 paires de bases. D'autres enzymes, notamment des enzymes à 6 paires de bases, seront testées prochainement.

Tableau 14 : Présentation des enzymes de restriction utilisées

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

3.2.5. Migration sur gel d'agarose

Le contrôle utilisé pour les 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'éthidium (voir figure 1).

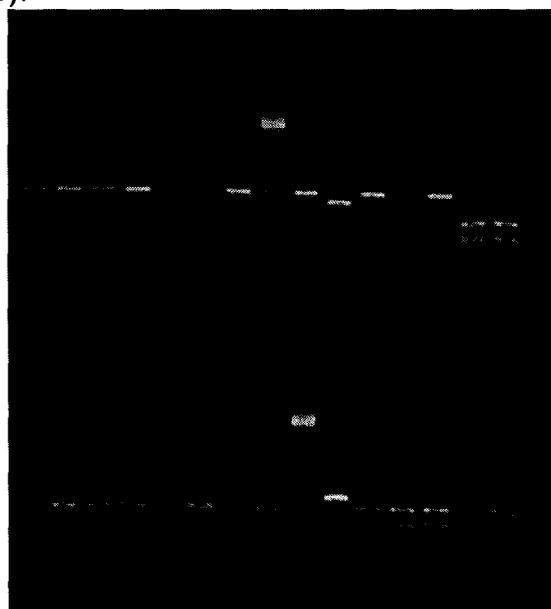


Figure 1 : Exemple de profils de restriction des fragments 16S en COI par l'enzyme *RsaI*

3.3. Résultats

3.3.1. 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 choisies malgré les multiples tentatives faisant varier température d'appariement et concentration en $MgCl_2$. 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 les amorces utilisées 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.

3.3.2. 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. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants. Le fragment 16S apparaît moins variable que le fragment COI. Les points suivants sont particulièrement intéressants :

1. Chaque taxon peut être distingué par son haplotype propre. L'objectif initial, qui était de pouvoir disposer d'un marqueur spécifique pour chaque taxon est donc pleinement atteint.
2. Une distinction peut être faite entre *C. gigas* et *C. angulata* pour l'enzyme *MseI* sur le fragment COI. Ces deux taxons étant généralement considérés comme conspécifiques, la possibilité de les distinguer pourrait apporter un outil très précieux pour éclairer la question de l'origine du taxon *angulata*. Ce point sera étudié plus en détail en 1996.
3. L'utilisation du seul couple *TaqI* / COI permet à lui seul de distinguer 4 des 5 taxons (seules *C. gigas* et *C. angulata* présentent le même profil).

Tableau 15 : Bilan des premiers résultats par taxon

Espèce	Nombre d'individus étudiés	haplotypes observés
<i>C. angulata</i>	5	A, B
<i>C. gigas</i>	4	C
<i>C. rivularis</i>	4	D
<i>C. sikamea</i>	4	E, F
<i>C. virginica</i>	5	G
Tous taxons confondus	22	7

Tableau 16 : Détail des haplotypes observés par individu. Les types sont désignés arbitrairement par des lettres minuscules pour chaque couple fragment/enzyme, l'haplotype (lettre majuscule) résulte de la combinaison des différents sites de restriction.

Individu	16S								COI								
	Sau3A	SacI	TaqI	AccI	RsaI	MseI	HhaI	HaeIII	TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	AccI	RsaI	HaeIII		
CA3	a	a	a	a	a	a	a	a	c	c	a	b	b	c	c	A	
CA4	a	a		a	a	a	a	a	c	c	a	b	b	c	c	A	
CA2	a	a	a	a	a	a	a	a	c	c	a	b	b	c	c	A	
CA1test	a	a	a	a	a	a	a	a	c	c	a	b	b	c	c	A	
CA1	a	a	a	a	a	a	a	a	c	d	a	b	b	c	c	B	
CG10		a		a		a	a	a	c	c	a	d	b	c	c	C	
CG3test	a	a	a	a	a	a	a	a	c	c	a	d	b	c	c	C	
CG2	a	a	a	a	a	a	a	a	c	c	a	d	b	c	c	C	
CG3	a	a	a	a	a	a	a	a	c	c	a	d	b	c	c	C	
CR18	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	D	
CR2test	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	D	
CR12	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	D	
CR17	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	D	
CS2	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	b	c	b	E	
CS4	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	b	c	b	E	
CS1	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	a	b	c	b	E	
CS2test	a	a	a	a	a	c	a	a	b	b	b	a	b	c	b	F	
CVgb4	a	a	a	a	b	b	a	b	f	c	a	c	c	c	a	G	
CVca20	a	a	a	a	b	b	a	b	f	c	a	c	c	c	a	G	
CVca26	a	a	a	a	b	b	a	b	f	c	a	c	c	c	a	G	
CVgb25	a	a	a	a	b	b	a	b	f	c	a	c	c	c	a	G	
CV2test	a	a	a	a	b	b	a	b	f	c	a	c	c	c	a	G	
Nb. de profils observés	1	2	1	1	2	3	1	2	4	4	2	4	3	2	4	7	
"Among and Within"	-	A	-	-	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A		
						W					W						

"CA" = *Crassostrea angulata*

"CG" = *Crassostrea gigas*

"CR" = *Crassostrea rivularis*

"CS" = *Crassostrea sikamea*

"CV" = *Crassostrea virginica*

"A" = polymorphisme inter-spécifique

"W" = polymorphisme intra-spécifique.

3.3.3. Conclusions et perspectives

Ces premiers résultats nous semblent encourageant et nous proposons de continuer ce 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.

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 (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 interspécifiques. 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).

4. Conclusion Générale et Perspectives pour 1996

Le conservatoire de souches s'est enrichi cette année de 2 nouvelles espèces : *C. angulata* et *C. sikamea*, deux taxons qui présentent l'intérêt de pouvoir se croiser avec *C. gigas*. La possibilité de disposer de 3 taxons pouvant s'hybrider avec *C. gigas* ouvre des perspectives intéressantes, comme le montrent les deux expériences d'hybridation réalisées en 1995. Malheureusement, l'étude comparée des performances des différentes espèces et leurs hybrides n'a pu être menée à bien pour cause de mortalités larvaires en 1995. Ces travaux seront repris en 1996.

Afin de tenter d'améliorer les conditions de maturation en salle de quarantaine, les huîtres ont été soumises à une période de froid (eau maintenue entre 8 et 10°C à l'aide de cryostats) durant un mois. Cette période avait pour objectif d'assurer une période de repos physiologique aux animaux. Nous pouvons donc espérer assurer en 1996 la reproduction des lots importés en 1994 et 1995.

Des marqueurs diagnostiques de chaque espèce sont désormais disponibles en ce qui concerne le génome mitochondrial. Le développement de marqueurs nucléaires sera entrepris en 1996. Ces marqueurs seront très précieux pour le contrôle (non-destructif) du statut hybride des animaux issus des expériences d'hybridation interspécifique.

5. Références 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.
- 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.
- ELSTON RA, WILKINSON MT (1985). PATHOLOGY, MANAGEMENT AND DIAGNOSIS OF OYSTER VELAR VIRUS-DISEASE (OVVD). *AQUACULTURE* 48: 189-210.
- 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 DNAB SEQUENCES OF *MYTILUS* SPP. (BIVALVIA: MOLLUSCA). *MOLECULAR MARINE BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* 2(1): 44-50.
- GRIZEL_H, HERAL_M. 1991. INTRODUCTION INTO FRANCE OF THE JAPANESE OYSTER (*CRASSOSTREA-GIGAS*). *JOURNAL DU CONSEIL INTERNATIONAL POUR L'EXPLORATION DE LA MER* 1991 VOL.47 No.3 PP.399-403.
- HATZOGLOU E, RODAKIS G, LECANIDOU R (1995). COMPLETE SEQUENCE AND GENEORGANIZATION 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.
- LITTLEWOOD DTJ (1994). MOLECULAR PHYLOGENETICS OF CUPPED OYSTERS BASED ON PARTIAL 28S RRNA GENE SEQUENCES. *MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION* 3: 221-229.
- 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 DNAMOLECULAR *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 EUROPEAN FLAT OYSTER *OSTREA EDULIS* (L.). *MOLECULAR MARINE BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 4(1):83-89.