



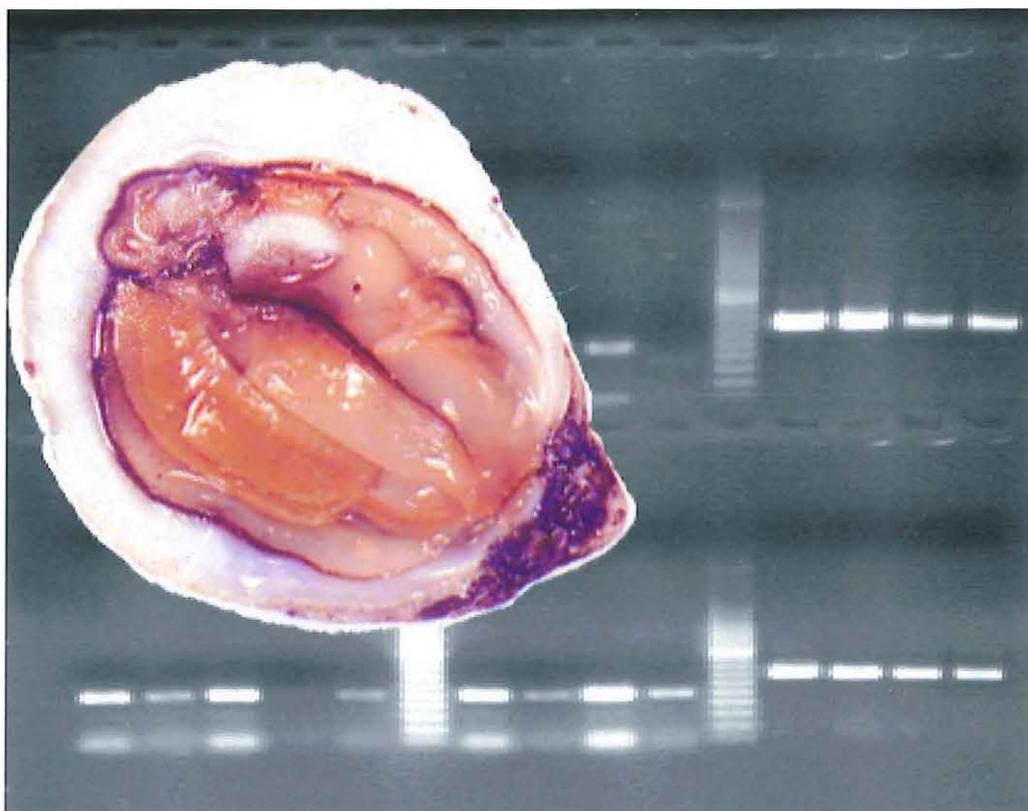
Contrat de plan Etat/Région Poitou-Charentes 1994-1998

Convention 97 RPC-R-54 "Génétique"

Programme "génétique"

Rapport année 1997

**P. BOUDRY, S. DUMOLIN-LAPEGUE, E. GOYARD, S. HEURTEBISE,
C. LEDU, P. PHELIPOT et A. GERARD**



Laboratoire de Génétique Aquaculture et Pathologie

BP 133 17390 La Tremblade (FRANCE)

Tel. 05 46 36 98 36

Fax. 05 46 36 37 51

SOMMAIRE

1	ACTION DE RECHERCHE 1: ACCLIMATATION DE NOUVELLES ESPÈCES D'HUÎTRES CREUSES DU GENRE CRASSOSTREA : HYBRIDATION ET CONSERVATOIRE DE SOUCHES.....	1
1.1	RAPPEL DES OBJECTIFS.....	1
1.2	ACTIONS MENÉES POUR L'ANNÉE 1997 AU SEIN DU CONSERVATOIRE DE SOUCHES.....	3
1.2.1	<i>Inventaire de début de saison</i>	3
1.2.2	<i>Importations réalisées</i>	4
1.2.3	<i>Croisements effectués à l'écloserie</i>	4
1.2.4	<i>Suivi de croissance comparée des lots issus de croisements intra-spécifiques</i>	6
1.3	RECHERCHE DE MARQUEURS D'ESPÈCES ET DE POPULATIONS (SYNTHÈSE DES RÉSULTATS 1996-97)	8
1.3.1	<i>Objectifs</i>	8
1.3.2	<i>Méthodologie</i>	8
1.3.3	<i>Matériel biologique</i>	8
1.3.4	<i>Extraction de l'ADN</i>	10
1.3.5	<i>Amplification PCR</i>	11
1.3.6	<i>Digestions par des enzymes de restriction</i>	11
1.3.7	<i>Electrophorèse</i>	12
1.4	RÉSULTATS	13
1.4.1	<i>Marqueurs mitochondriaux</i>	13
1.4.2	<i>Marqueurs microsatellites</i>	18
1.5	APPLICATIONS ET TRANSFERTS ENVISAGEABLES	21
1.6	CONCLUSION	21
1.7	BIBLIOGRAPHIE	22
2	ACTION DE RECHERCHE 2: AMÉLIORATION DE LA QUALITÉ CHEZ L'HUÎTRE CREUSE CRASSOSTREA GIGAS PAR LA SÉLECTION DE SOUCHES PERFORMANTES.....	24
2.1	RAPPEL DES OBJECTIFS.....	24
2.2	SUIVI DES PERFORMANCES DE CROISSANCE	24
2.3	ANALYSES PHYSIOLOGIQUES.....	27
2.4	ANALYSES GÉNÉTIQUES	28
2.5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	30

1 ACTION DE RECHERCHE 1:

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

1.1 RAPPEL DES OBJECTIFS

L'histoire de l'ostréiculture est émaillée, en France ainsi que dans de nombreux autres pays, d'une succession de phases de développement, de surexploitation et 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 conchycoles afin d'éviter à la fois la surexploitation et la fragilisation des cheptels 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 marteliose et la bonamiose l'ostréiculture française connaît actuellement une situation de monoculture de l'huître *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'O.V.V.D. (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'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 culturelles 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:

1. Le contrôle zoosanitaire des importations (objet des directives européennes et mission des services vétérinaires).
2. La recherche d'outils de diagnostic adaptés pour effectuer des contrôles zoosanitaires fiables.
3. La recherche de nouvelles "souches" ou d'espèces de remplacement dans le cas d'une éventuelle épizootie grave sur l'huître creuse *C. gigas*.

Le laboratoire IFREMER "Génétique Aquaculture et Pathologie" (GAP, La Tremblade) a donc entrepris des actions de recherche sur ces différents points. Le GAP 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, le GAP 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 le GAP 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'élevage 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 hyper-variables (de type microsatellite) pour la discrimination fine des populations, ou, dans un premier temps, de l'ADN mitochondrial pour la distinction entre espèces.

1.2 ACTIONS MENÉES POUR L'ANNÉE 1997 AU SEIN DU CONSERVATOIRE DE SOUCHES

1.2.1 Inventaire de début de saison

L'inventaire des animaux du conservatoire de souches au début 1997 est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 : Inventaire des animaux au début 1997.

Espèce	Origine	Génération/année d'arrivée ou de production	Effectif
<i>C. virginica</i>	Canada	G0/1994	44
<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 de souche	G1/1995	100
<i>C. sikamea</i> x <i>C. angulata</i>	Conservatoire de souche	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

Les objectifs pour l'année 1997 étaient les suivants :

- Poursuivre les premières reproductions des espèces pour lesquelles nous disposons de géniteurs G0. L'objectif est toujours de limiter le stockage d'animaux importés en produisant une descendance simultanément à des témoins *C. gigas* qui serviront de comparaison.
- Tenter des hybridations inter-spécifiques des différents taxons présents au sein du conservatoire en fonction des connaissances disponibles dans la littérature sur ce sujet (voir pour revue Gaffney et Allen, 1993).
- Importer de nouvelles souches ou espèces. Elargir la gamme des espèces présentes au sein du conservatoire de souches (les capacités d'accueil de la salle de quarantaine étant limitée).

1.2.2 Importations réalisées

Au cours de l'année 1997, les importations suivantes ont été réalisées :

Crassostrea rhizophorae : 40 individus de population naturelle en provenance de Guyane (Mont Sinery, huîtres de palétuviers). Réception avec examen histologique le 15/01/97.

Crassostrea gigas : 100 individus en provenance de Boryung et Hwaseong – Ouest de la Corée du Sud (sur la Mer Jaune). Réception 05/12/97.

Tiostrea chilensis : 25 individus en provenance de Bangor, Pays de Galles. Cette espèce d'huître plate est originaire de Nouvelle Zélande.

Ces importations se sont déroulées dans des conditions suffisamment favorables puisqu'aucune mortalité significative n'a été enregistrée dans les mois qui ont suivi.

Tableau 2 : Contrôles sanitaires avant et après importations

Espèces	N° lot	Techniques	Nb. Analyses	Résultats
<i>C. rhizophorae</i>	97/03	histologie	3 animaux	RAS
<i>T. chilensis</i>	97/21	histologie	5 animaux	RAS
<i>C. gigas</i> X <i>C. angulata</i>	97/25	PCR	30 animaux	RAS
<i>T. lutaria</i>	97/43	histologie	2 animaux	RAS
<i>T. chilensis</i>	97/72	histologie	1 animal	RAS
<i>C. gigas</i> Taiwan	97/87	histologie	29 animaux	6/29 avec 1 métazoaire dans le tube digestif. 1/29 avec 1 colonie de rickettsie dans 1 diverticule digestif 1/29 présente 1 importante dégradation des épithéliums digestifs
<i>C. gigas</i> Corée	97/115	MET	1 animal	aucun agent observé
		histologie	17 animaux	2/17 suspicions d'herpès
<i>C. rivularis</i>	97/116	Hybridation in situ	2 animaux	RAS
		MET	2 animaux	aucun agent observé
<i>C. gigas</i> Corée	97/118	histologie	18 animaux	1/18 avec 1 colonie de rickettsie dans 1 diverticule
		Hybridation in situ	6 animaux	1/6 suspicion d'herpès.
		MET	1 animal	RAS
		MET	1 animal	aucun agent observé

1.2.3 Croisements effectués

Les différents croisements obtenus au cours de l'année 1997, ont été réalisés en utilisant les géniteurs disponibles au sein du conservatoire de souches (tableau 3). La majeure partie des croisements a été réalisée par "stripping", hormis les rares pontes obtenues par chocs thermiques.

Tableau 3 : Elevages larvaires réalisés en 1997 pour le Conservatoire de Souches

Date	Elevage/Lots	Femelles (nombre de géniteurs)	Mâles (nombre de géniteurs)	Résultats/ Observations
24/06/97	CGCA9714			
	Lot 1:	<i>C. gigas</i> (4)	<i>C. gigas</i> (10)	mortalité totale du lot à J15
	Lot 2:	<i>C. angulata</i> (10)	<i>C. gigas</i> (10)	mortalité totale du lot à J17
	Lot 3:	<i>C. gigas</i> (4)	<i>C. angulata</i> (4)	mortalité totale du lot à J17
	Lot 4:	<i>C. angulata</i> (10)	<i>C. angulata</i> (4)	mortalité totale du lot à J17
3/07/97	RSGX9715			
	Lot 1:	<i>C. gigas</i> (15)	<i>C. gigas</i> (5)	Lot fixé à J19
	Lot 2:	<i>C. gigas</i> (15)	<i>C. rivularis</i> (12)	Lot fixé à J19
	Lot 3:	<i>C. gigas</i> (15)	<i>C. rivularis</i> (12)	Lot fixé à J19
	Lot 4:	<i>C. gigas</i> (15)	<i>C. sikamea</i> (13)	Lot fixé à J19
19/08/97	RSGX 9719			
	Lot1:	<i>C. gigas</i> (9)	<i>C. gigas</i> (10)	Lot fixé à J20
	Lot2:	<i>C. gigas</i> (3)	<i>C. angulata</i> (10)	Lot fixé à J20
	Lot3:	<i>C. angulata</i> (9)	<i>C. gigas</i> (8)	Lot fixé à J17
	Lot4:	<i>C. angulata</i> (3)	<i>C. angulata</i> (8)	Lot fixé à J17

Actuellement, le mode de fonctionnement de la salle de quarantaine du conservatoire de souches ne permet pas de réaliser dans des conditions idéales une maturation synchrone des géniteurs des différentes espèces présentes que l'on souhaite reproduire ou hybrider. En effet, les conditions requises pour assurer la maturation de ces espèces ne sont pas identiques, tout au moins pour certaines d'entre elles. Quant à la difficulté technique à maintenir constamment des températures différentes de maturation, elle provient du fonctionnement même de la salle de quarantaine qui repose sur le principe d'un circuit partiellement fermé.

Pour améliorer le traitement des eaux de rejet, le système de chloration/neutralisation est en cours de remplacement par un système à l'ozone, qui permettra le traitement de plus grandes quantités d'eau. D'autre part, l'extension des bâtiments de la station IFREMER à Ronce les bains, dont la réalisation est prévue pour 1998, devrait permettre de résoudre ce problème technique en augmentant significativement la surface réservée au conservatoire de souches et d'assurer ainsi des conditions de maturation et de testage plus favorables.

Le bilan des productions réalisées en 1997 est le suivant :

1. Les deux élevages réalisés en croisements intra et inter-spécifiques de *Crassostrea gigas* et de *Crassostrea angulata* ont permis d'obtenir malgré les épisodes fréquents de mortalité en élevage larvaire, des lots de quelques centaines d'individus notamment :

RSGX9719

Lot1 : *C. gigas* x *C. angulata* représenté par 200 individus

Lot2 : *C. gigas* x *C. angulata* représenté par 200 individus

Lot3 : *C. angulata* x *C. gigas* représenté par 400 individus

Lot4 : *C. angulata* x *C. angulata* représenté par 400 individus

2. Les premières productions d'hybrides réalisées en 1996 par croisement de *Crassostrea gigas* et de *Crassostrea rivularis* ne nous avait pas permis d'obtenir suffisamment d'animaux pour suivre les performances de croissance.

Des croisements ont donc été réalisés cette année à partir de ces deux mêmes espèces, et ont permis l'obtention de nombreux individus qui cependant après analyse par marqueurs moléculaires ne se sont pas avérés hybrides. Des analyses complémentaires doivent être réalisées sur ces animaux.

Ces expérimentations seront renouvelées en 1998.

1.2.4 Suivi de croissance comparée des lots issus de croisements intra-spécifiques.

Le suivi de croissance de la production de *Crassostrea virginica* (RSVV) de 1996 a été poursuivi cette année en comparaison du témoin de *Crassostrea gigas* dans la salle de quarantaine. La figure 1 présente ces résultats de manière graphique. Il se confirme encore cette année que les performances de *C. gigas* sont significativement supérieures à celles de *C. virginica*.

Figure 1. Comparaison des performances de croissance de *C. gigas* et *C. virginica* (données obtenues en salle de quarantaine).

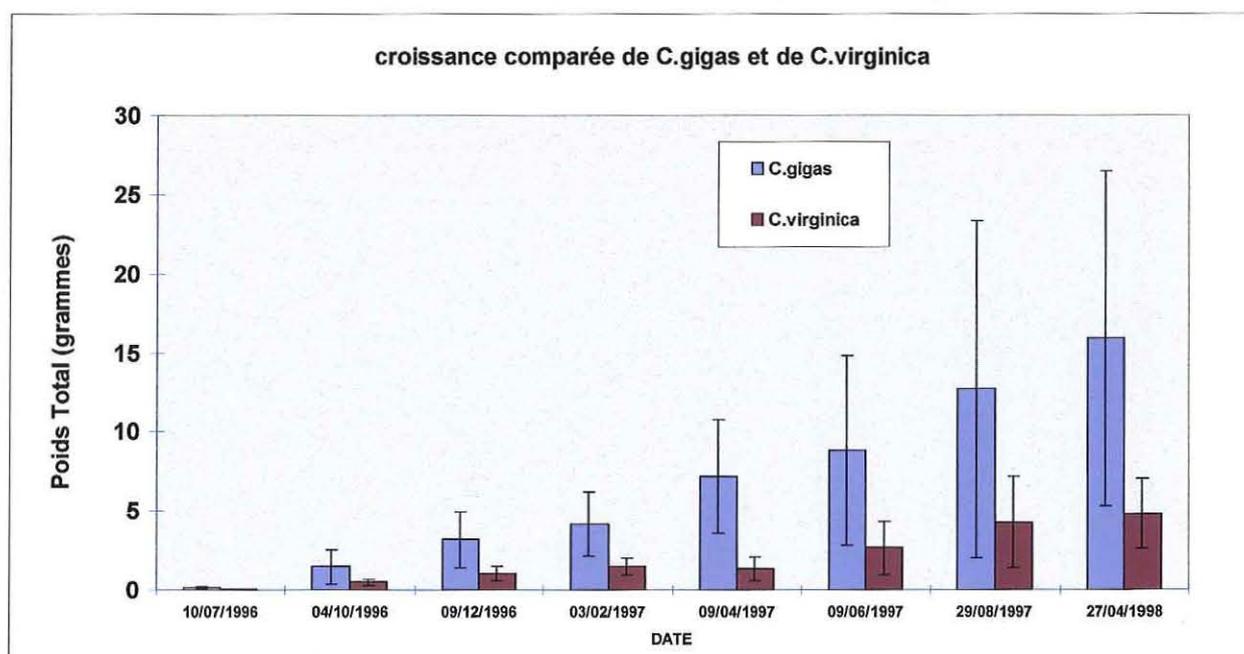


Tableau 4 : Inventaire du conservatoire en fin de saison 1997

espèce	Origine	Génération/année d'arrivée ou de production	Effectif
<i>C. sikamea</i>	U.S.A	G0/1995	76
<i>C. sikamea</i>	Conservatoire de souche	G1/1995	54
<i>C. rivularis</i>	U.S.A	G0/1996	33
<i>C. gigas</i>	Espagne	G0/1996	36
<i>C. rhizophorae</i>	Guyane	G0/1997	20
<i>T. chilensis</i>	Pays de galles	G0/1997	15
<i>C. gasar</i>	Sénégal	G0/1996	13
<i>S. commercialis</i>	Australie	G0/1996	20
<i>C. virginica</i>	Conservatoire de souche	G1/1996	2000
<i>C. angulata</i>	Conservatoire de souche	G1/1997	200
<i>C. angulata</i> x <i>C. gigas</i>	Conservatoire de souche	G1/1997	500
<i>C. gigas</i> x <i>C. gigas</i>	Conservatoire de souche	G1/1997	500
<i>C. gigas</i> x <i>C. rivularis</i>	Conservatoire de souche	G1/1997	1000

1.3 RECHERCHE DE MARQUEURS D'ESPÈCES ET DE POPULATIONS (SYNTHÈSE DES RÉSULTATS 1996-97)

1.3.1 Objectifs

La recherche de marqueurs moléculaires chez les huîtres creuses répond à deux objectifs principaux :

- **La recherche de marqueurs diagnostiques des différentes espèces** présentes au sein des deux genres d'huîtres creuses : *Crassostrea* et *Saccostrea*.
- **La recherche de marqueurs de populations** au sein de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, principale espèce d'huître produite en France et dans le monde.

1.3.2 Méthodologie

Les techniques qui ont été privilégiées reposent sur **l'amplification *in vitro* de l'ADN** (PCR) et la recherche de polymorphisme de fragments de restriction (**PCR-RFLP**) ou de longueur (**microsatellites**). Cette approche a été notamment choisie pour les raisons suivantes:

- ❖ La technique est relativement légère à mettre en œuvre (comparativement aux RFLP sur ADN mitochondrial purifié par exemple), donc applicable à de grands échantillons (études "en population", contrôles d'importations...),
- ❖ La "compatibilité" entre les deux techniques, celles-ci utilisant les mêmes échantillons (collections d'ADN génomique),
- ❖ La possibilité de séquencer ultérieurement ces fragments (par séquençage direct des produits des PCR) afin d'obtenir des informations sur les relations phylogénétiques entre les espèces.

1.3.3 Matériel biologique

Le matériel biologique analysé peut être de 2 types :

- ❖ Des huîtres vivantes, comme celles présentes au sein du conservatoire de souches de La Tremblade. Les prélèvements de tissus sont réalisés par biopsie,
- ❖ Des échantillons conservés dans l'alcool ou au congélateur.

Les tableaux 5, 6 et 7 présentent les taxons et populations étudiés pour les marqueurs mitochondriaux (16S et COI) et 4 locus microsatellites.

Comparativement aux marqueurs allozymiques, les marqueurs basés sur la technique de la PCR présentent 2 avantages :

- ❖ La collecte et la conservation des échantillons est plus facile car la congélation n'est pas nécessaire,
- ❖ La quantité de tissu nécessaire à l'extraction d'ADN (environ 1 mm²) permet d'étudier les animaux de manière non destructive, ce qui est impossible pour les allozymes.

Tableau 5 : Huîtres creuses étudiées en PCR-RFLP des fragments mitochondriaux 16S.

Espèce	Origine/Descriptif
<i>C. echinata</i>	Nouvelle Calédonie- Huîtres de rocher - population naturelle
<i>C. rivularis</i>	USA – population d'écloserie, introduite du Japon
<i>C. belcheria</i>	Thaïlande - population naturelle
<i>C. virginica</i>	Canada – population naturelle
<i>C. iredalei</i>	Thaïlande - population naturelle
<i>C. sikamea</i>	USA - population d'écloserie, introduite du Japon
<i>C. margaritacea</i>	Madagascar - population naturelle
<i>C. gasar</i>	Sénégal; huîtres de palétuvier, population naturelle
<i>C. angulata</i>	Espagne, population naturelle
<i>C. gasar</i>	Côte d'Ivoire - population naturelle
<i>C. gigas</i>	Estuaire de la Seudre – population introduite du Japon

Tableau 6 : Populations de *C. gigas* et *C. angulata* échantillonnées pour l'étude en PCR-RFLP du le fragment mitochondrial COI.

Origine (pays)	Abréviation	Taxa	Status	Effectif
Estuaire de la Seudre (France)	SEU	<i>C. gigas</i>	captage naturel	20
Bonne Anse (France)	BON	<i>C. gigas</i>	captage naturel	9
Estuaire de la Charente (France)	CHA	<i>C. gigas</i>	captage naturel	15
Arcachon (France)	ARC	<i>C. gigas</i>	captage naturel	15
Rade de Brest (France)	BRE	<i>C. gigas</i>	captage naturel	24
Gravelines (France)	GRA	<i>C. gigas</i>	captage naturel	23
Guernesey (Angleterre)	GUE	<i>C. gigas</i>	écloserie	16
Bangor (Pays de Galles)	BAN	<i>C. gigas</i>	écloserie	10
Tasmania (Australie)	TAS	<i>C. gigas</i>	captage naturel	11
Nouvelle-Zelande	NEW	<i>C. gigas</i>	?	12
Chungmu (Corée du sud)	CHU	<i>C. gigas</i>	captage naturel	14
Keelung (Taiwan)	KEE	<i>C. gigas</i>	captage naturel	23
Ria Formosa (Portugal)	RFG	<i>C. gigas</i>	captage naturel	11
Ria Formosa (Portugal)	RFA	<i>C. angulata</i>	captage naturel	11
Setubal (Portugal)	SET	<i>C. angulata</i>	captage naturel	13
Cadiz (Espagne)	CAD	<i>C. angulata</i>	captage naturel	26

Tableau 7: Populations de *C. gigas* et *C. angulata* échantillonnées pour l'étude basées sur les marqueurs microsatellites.

Population	Taxon prédéterminé	Descriptif (lieu de prélèvement)	Effectif
RFA, RFG	Ca / Cg	Faro, 1 population présentant un mélange de <i>C.gigas</i> et <i>C.angulata</i> , 200 km au sud de Lisbonne, Portugal	35
CAD	Ca	Cadix, Chiclana de la Frontera, 150 km au sud de Faro, Espagne	50
SET	Ca	Setubal, 20 km au sud de Lisbonne, Portugal	13
TAH	Ca	Tahaddart, 340 km au nord de Casablanca, Maroc	16
KEE	Cg	Keelung, Sud de Taiwan	30
CHU	Cg	Chungmu, Corée du Sud	50
OUA	Cg	Lagune de Oualidia, 175 km au sud de Casablanca, Maroc	45
VEN	Cg	Venise, Italie	39
BAN	Cg	Bangor, Pays de Galle, GB (population d'écloserie)	41
ROZ	Cg	Anse du Roz, Rade de Brest, France	50
ARC	Cg	Arcachon, France	50
SEU	Cg	Anse de la Seudre, La Tremblade, France	49

Cg = *Crassostrea gigas*

Ca = *Crassostrea angulata*

1.3.4 Extraction de l'ADN

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-chloroforme. 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 (surtout pour les marqueurs microsatellites). Le tableau 8 compare ces deux méthodes d'extraction de l'ADN.

Tableau 8: Avantages et inconvénients des deux méthodes d'extraction.

Méthode d'extraction	Phénol/Chloroforme	Chélex 5% (Estoup <i>et al.</i> , 1996)
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> ☛fiabilité proche de 100% ☛obtention de grandes concentrations de matériel de bonne qualité ☛utilisation de petites quantités d'ADN dans un protocole PCR (la moitié de celles utilisées à partir d'ADN extrait au chélex) 	<ul style="list-style-type: none"> ☛protocole rapide ☛produits non toxiques
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> ☛protocole lourd ☛produits utilisés toxiques 	<ul style="list-style-type: none"> ☛fiabilité voisine de 70-80% chez <i>Crassostrea gigas</i> ☛obtention de faibles concentrations de matériel de qualité moyenne ☛utilisation de grandes quantités d'ADN dans le protocole PCR

1.3.5 Amplification PCR

1.3.5.1 Marqueurs mitochondriaux

L'obtention d'amorces permettant l'amplification de fragments de l'ADN mitochondrial a été menée à partir des données disponibles dans la littérature (tableau. 9).

Tableau 9. Amorces utilisées et fragments mitochondriaux correspondants.

Fragment amplifié et taille du fragment	Références et espèces concernées	Amorces
12S : 450 bp	Mokady <i>et al.</i> (1994): Litophaga spp., Mytilus edulis	12SBR: 5'-TTTCCCGCGAGCGACGGGCG 12SAR: 5'-GAAACCAGGATTAGATACCC
16S : 570 bp	Banks <i>et al.</i> (1993) : O'foighil <i>et al.</i> (1995) Crassostrea spp.	16SBR : 5'-GTCTGAACTCAGATCAGATCACGT 16SAR : 5'-CTGTTTATCAAAAATA
COI : 710 bp	Folmer <i>et al.</i> (1994): 80 espèces d'invertébrés	LCO1490 : GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG HCO2198 : 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

1.3.5.2 Marqueurs microsatellites

L'examen des individus a été réalisé au premier abord avec 3 marqueurs microsatellites (CG44, CG49, CG108) mis au point par l'équipe grecque de E. Zouros (Institute of Marine Biology of Creete). A cela s'ajoutent les essais de mise au point de 5 nouveaux marqueurs L8, L10, L16, L32, L48 (dont les séquences sont fournies par l'équipe de F. Bonhomme, laboratoire Génome et Populations). Une fois la mise au point accomplie, un des nouveaux marqueurs (L10) a pu être utilisé sur l'ensemble des individus. Les autres serviront dans l'avenir à la compléter et l'affiner.

L'étude a donc été effectuée avec 4 loci microsatellites dont les caractéristiques essentielles sont données dans le tableau 10.

Tableau 10 : Amorces utilisées et marqueurs microsatellites correspondants.

locus (code Genbank)	séquence répétée	amorces	Tm	taille du fragment cloné
CG 44 (Y12085)	(CA) ₁₃	S : GAAGAATGTCATAGATTGATGG AS : CATGCCTGTTTACCAGTATTC	53°C	391 pb
CG 49 (Y12086)	(CA) ₃₅	S : CATCAGGGGTAAATTAAGTAAGC AS : CCACAGACGATTTTCATATATCCTG	53°C	194 pb
CG 108 (Y12087)	(CA) ₁₈	S : ATATGTAATGATTACGAAACT AS : GTATGAGATTTGGTTCCACC	55°C	228 pb
L 10	(AG) ₂₆	confidentiel	55°C	330 pb

amorces S = sens, amorces AS = anti-sens.

1.3.6 Digestions par des enzymes de restriction

Les produits d'amplification des fragments mitochondriaux 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 principalement sur des enzymes à 4 paires de bases afin de maximiser la probabilité de sites de coupure (tableau 11).

Tableau 11 : Caractéristiques des 9 enzymes de restriction utilisées.

Nom de l'enzyme	Site de reconnaissance (5' - 3')	Température optimale d'activité
<i>TaqI</i>	TCGA	65°C
<i>Sau3A</i>	GATC	37°C
<i>Acil</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>HindIII</i>	AAGCTT	37°C
<i>SacI</i>	GAGCTC	37°C

1.3.7 Electrophorèse

1.3.7.1 Fragments mitochondriaux

Le contrôle des amplifications PCR ainsi que la séparation des les fragments digérés sont réalisés sur gel d'agarose à 1% horizontal. Les fragments sont visualisés sur table U.V. après coloration au bromure d'ethidium.

1.3.7.2 Microsatellites

La séparation des fragments d'ADN de chaque individu est réalisée sur un gel d'acrylamide à 8% vertical. Cela permet une résolution fine des fragments de 60 à 400 paires de bases avec la discrimination de fragments ayant 1 paire de bases de différence. Les migrations se font à puissance constante (50 watts) sous voltage et intensité non limitants pendant 2 à 5 heures en fonction de la taille du locus analysé.

Les allèles sont numérotés à partir de 1 pour l'allèle le plus haut avec un incrément de 2 paires de bases soit un motif de répétition. Les allèles les plus hauts correspondent à ceux ayant la migration la plus réduite et sont donc les plus grands. Inversement, les allèles les plus bas sont les plus petits.

Tous les homozygotes et les individus sans résultat d'amplification ont été analysés deux et parfois trois fois. L'utilisation d'un témoin (mélange de plusieurs individus) permet les recouplements entre gels.

1.4 RÉSULTATS

1.4.1 Marqueurs mitochondriaux

1.4.1.1 Amplification

La mise au point des amplifications PCR a été réalisée dans un premier temps sur 6 individus "test", représentant 6 taxons. 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. 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 surprenante car les amorces en question ont été décrites comme amplifiant ce gène avec succès chez un très grand nombre d'espèces 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 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) , nous en concluons 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.

1.4.1.2 Polymorphisme de longueur de fragments de restriction

Fragment 16S

Les profils de restriction observés pour les différents taxons ou populations analysées sont présentés dans les tableaux 12 et 13. 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 2, construit avec NEIGHBOR and DRAWTREE du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993).

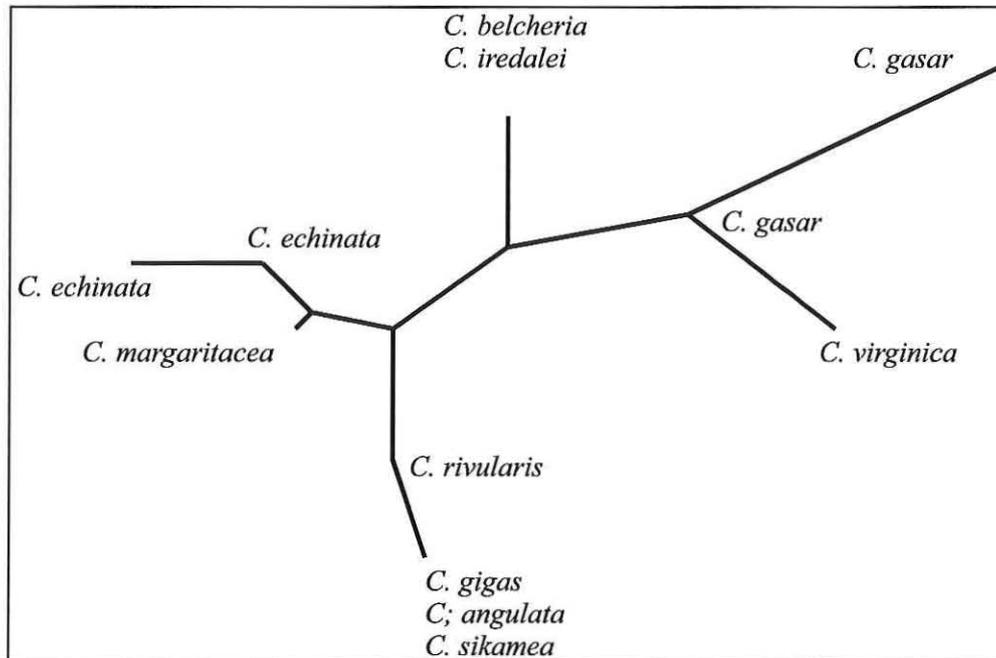
Tableau 12 : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction des produits d'amplification du fragment 16S. Les profils sont désignés arbitrairement par des lettres minuscules pour chaque couple fragment/enzyme.

Taxons/ populations	16S								Haplo- types
	TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	RsaI	HindIII	HaeIII	SacI	
<i>C. angulata</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>C. gigas</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>C. rivularis</i>	a	a	a	a	a	a	a	b	II
<i>C. sikamea</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	I
<i>C. virginica</i>	a	a	a	b	b	a	b	a	III
<i>C. iredalei</i>	a	a	a	b	b	a	a	b	IV
<i>C. belcheria</i>	a	a	a	b	b	a	a	b	IV
<i>C. echinata</i>	b	a	a	e	b	b	a	b	V
<i>C. margaritacea</i>	b	a	b	e	a	b	a	b	VI
<i>C. gasar</i> (Côte d'Ivoire)	a	b	a	e	b	a	b	a	VII
<i>C. sp.</i> (Guyane)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
<i>C. gasar</i> (Sénégal)	a	a	a	e	b	b	b	a	VIII
<i>C. 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 13 : Bilan des haplotypes observés par restriction du fragment 16S sur les différents taxons 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 2 : 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.



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 inexistants). La situation intermédiaire des huîtres ouest-africaines (*C. gasar*) entre les huîtres asiatiques (*C. gigas*, *C. sikamea* et *C. rivularis*) et américaines (*C. virginica*), 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.

Fragment COI

Ce fragment n'a pu être amplifié chez certaines espèces (*C. margaritacea*, *C. echinata*, et *C. gasar*). Pour les autres taxons, les tableaux 14 et 15 résument les résultats observés. Neuf haplotypes sont ainsi différenciés. Certains taxons, qui n'étaient pas différenciés par les profils de restriction sur le fragment 16S peuvent cette fois être distingués (par exemple *C. sikamea* / *C. gigas*).

Tableau 14 : 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	COI									Haplo- type
	TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	AccI	RsaI	HindIII	HaeIII	SacI	
<i>C. angulata</i>	c	c	a	b	b	c	a	c	a	A
	c	d	a	b	b	c	a	c	a	B
<i>C. 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>C. rivularis</i>	a	a	b	a	a	a	a	a	a	H
<i>C. sikamea</i>	b	b	b	a	b	c	a	b	a	S
<i>C. 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 15 : Bilan des haplotypes observés par restriction du fragment COI sur les différents taxons 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

Une étude au niveau intra-spécifique a été réalisée sur les populations présentées dans le tableau 2. Il s'agit de populations qui ont été identifiées (par les collègues qui nous les ont fournies) comme *C. angulata* (en provenance du Portugal et d'Espagne) ou *C. gigas*. Comme pour le fragment 16S, les relations entre haplotypes ont été analysées à l'aide du logiciel REAP (McElroy *et al*, 1991). Les fréquences des différents haplotypes dans les populations étudiées sont présentées dans le tableau 16. Une matrice de distances entre populations a servi de base à la construction de l'arbre présenté en figure 3, construit avec NEIGHBOR and DRAWTREE du logiciel PHYLIP (Felsenstein, 1993). La figure 3 montre une différenciation très nette entre les populations identifiées comme *C. angulata* (SET, CAD, RFA) et les populations identifiées comme *C. gigas* originaires de France, Grande Bretagne, Corée du sud, Australie, Nouvelle Zélande.... Jusqu'à ces résultats ces deux taxons n'étaient pas distinguables par des critères morphologiques et étaient considérés comme étant la même espèce. Ce dernier point est confirmé par leur proximité génétique, mais ils apparaissent désormais comme deux "races" géographiques distinctes.

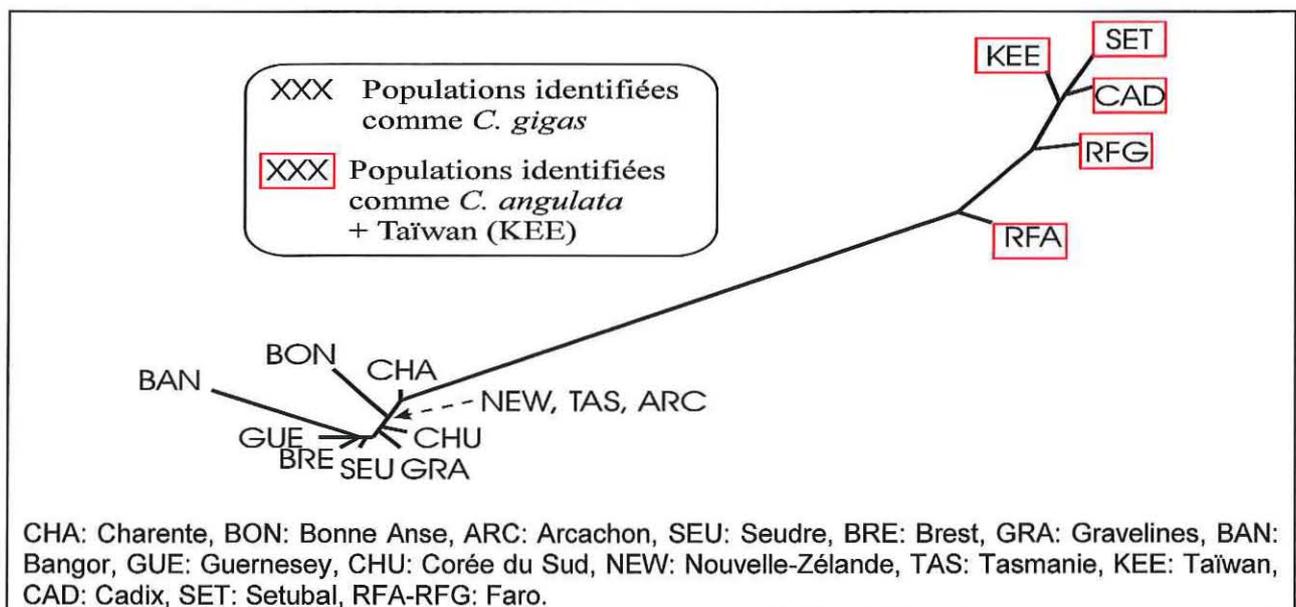
L'origine des huîtres portugaises a été débattue par de nombreux auteurs. En effet, l'absence de divergence morphologique et de barrière à l'hybridation entre les populations de *C. gigas* d'Asie et les populations de *C. angulata* du Portugal a poussé certains auteurs à supposer que ces dernières auraient peut-être été importées d'Asie lors des premiers échanges commerciaux. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse en identifiant Taïwan comme origine de *C. angulata*. Ces résultats sont

actuellement sous presse dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

Tableau 16 : Fréquences des haplotypes dans les populations d'huîtres portugaises et japonaises étudiées. Les haplotypes sont désignés par 4 lettres minuscules correspondant aux profils de restriction pour les enzymes *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI*, *MseI* et par une lettre majuscule.

pays d'origine	Population	Taxon	N	Haplotypes					
				A	B	C	D	E	J
				ccab	cdab	dcad	dcab	dcbd	acab
France	Tremblade	<i>C. gigas</i>	20			0.95		0.05	
	Bonne Anse	<i>C. gigas</i>	9			0.88			0.11
	Charente	<i>C. gigas</i>	15	0.07		0.93			
	Arcachon	<i>C. gigas</i>	15			1			
	Rade de Brest	<i>C. gigas</i>	24			0.92		0.08	
	Gravelines	<i>C. gigas</i>	23			0.91	0.04	0.04	
United-Kingdom	Guernesey	<i>C. gigas</i>	16			0.87		0.12	
United-Kingdom	Bangor	<i>C. gigas</i>	10			0.6		0.4	
Australie	Tasmanie	<i>C. gigas</i>	11			1			
Nouvelle Zélande		<i>C. gigas</i>	12			1			
Corée du Sud	Chungmu	<i>C. gigas</i>	14			0.93	0.07		
Taiwan	Keelung	<i>C. gigas</i>	23	0.87	0.04				0.09
Portugal	Ria Formosa	<i>C. gigas</i> ?	11	0.82	0.09	0.09			
	Ria Formosa	<i>C. angulata</i> ?	11	0.82		0.18			
	Setubal	<i>C. angulata</i>	13	0.85	0.15				
Espagne	Cadiz	<i>C. angulata</i>	26	0.92	0.08				

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



1.4.2 Marqueurs microsatellites

1.4.2.1 Polymorphisme et hétérozygotie

L'hétérozygotie globale à chaque locus est obtenue en divisant le nombre d'individus hétérozygotes au locus considéré par le nombre total d'individus analysés à ce même locus. Ces valeurs supposent l'état à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour l'ensemble des populations à chaque locus et correspondent aux valeurs nécessaires au calcul du F_{it} . On constate une grande variabilité (tableau 17) puisque le nombre d'allèles dépasse 50 à tous les locus. Le nombre moyen d'allèles par locus est de 53,25 avec un minimum de 52 aux loci CG44 et CG108 et un maximum de 56 au locus L10.

Tableau 17: Résultats propres aux microsatellites

locus	nb d'ind. analysés	nb d'ind. non amplifiés	nb d'ind. hétérozygotes	Hétérozygotie observée	Hétérozygotie attendue	nb total d'allèles
CG 44	468	12	312	0.68	0.97	52
CG 49	468	15	322	0.71	0.973	53
CG 108	468	8	380	0.83	0.969	52
L 10	468	3	422	0.90	0.97	56

Le tableau 18 représente le polymorphisme intra-population suivant les 4 loci considérés avec le nombre moyen d'allèles par locus, l'hétérozygotie observée et attendue. Le niveau de variabilité observé est très élevé. H_e (mesure de la diversité génique) donne des valeurs fortes (0,944 pour la population KEE au locus CG44 ; 0,962 pour SEU au locus L10). Chaque population présente à tous les loci un nombre conséquent d'allèles. Le nombre moyen d'allèles par locus et par population est de 27 avec un minimum de 23 (CG 44) et un maximum de 31 (L10). La population CHU présente un faible nombre d'allèles, environ deux fois moins que les populations présentant le même effectif (exemple : CHU et ARC présentent respectivement 15 et 30 allèles au locus CG49).

Tableau 18: Polymorphisme intra-population pour les 4 marqueurs microsatellites.

pop	nb all	CG44		nb all	CG108		nb all	CG49		nb all	L10	
		Ho	He									
RFAG	24	0,857	0,942	23	0,823	0,935	25	0,411	0,939	27	0,971	0,947
CAD	21	0,54	0,906	28	0,8	0,948	33	0,96	0,957	33	0,857	0,954
SET	12	0,692	0,896	13	0,769	0,887	11	0,545	0,892	17	1	0,914
KEE	26	0,766	0,944	26	0,966	0,943	26	0,666	0,942	30	0,896	0,948
TAH	27	0,875	0,908	32	0,937	0,918	33	0,4	0,904	37	1	0,933
OUA	14	0,571	0,942	15	0,822	0,955	30	0,727	0,956	27	1	0,962
BAN	26	0,658	0,879	33	0,756	0,887	33	0,575	0,937	38	0,951	0,945
ROZ	30	0,7	0,943	28	0,791	0,948	36	0,775	0,963	35	0,755	0,961
VEN	23	0,631	0,949	38	0,891	0,947	30	0,714	0,949	37	0,871	0,945
ARC	27	0,88	0,943	27	0,8	0,954	30	0,836	0,938	31	0,98	0,962
CHU	15	0,38	0,904	16	0,869	0,960	15	0,765	0,951	20	0,84	0,957
SEU	30	0,791	0,943	34	0,755	0,955	35	0,652	0,948	40	0,918	0,962

nb all = nombre total d'allèles par population et par locus,

Ho = hétérozygotie observée

He = hétérozygotie attendue

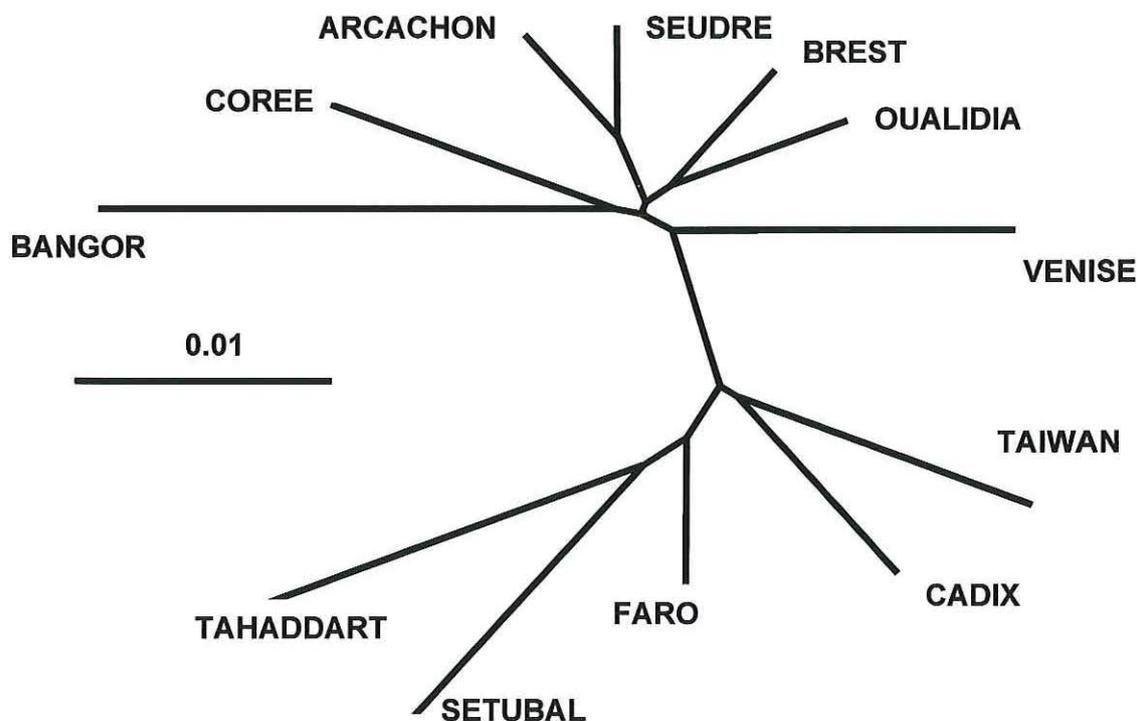
1.4.2.2 Variabilité inter-populations

La variabilité génétique entre populations est estimée au niveau multilocus par les calculs des indices F_{st} de Wright (1951). La différenciation observée entre paires de populations est faible avec un F_{st} de l'ordre de 0,001 à 0,04. Les F_{st} entre populations *Crassostrea gigas* (sans KEE) et *Crassostrea angulata* sont tous significatifs. Les populations européennes de *Crassostrea angulata* et Taïwan présentent pour la plupart des valeurs soit faiblement significatives (Faro/Taiwan et Cadix/Setubal) soit non significatives. C'est le cas des paires de populations suivantes : Faro avec Tahaddart ; Setubal avec Tahaddart, Faro et Taïwan.

Les F_{st} sont significatifs entre toutes les paires de populations *Crassostrea gigas* à l'exception de deux populations françaises Arcachon et Seudre seulement séparées d'une centaine de kilomètres ainsi que les populations Oualidia (OUA) avec Brest (ROZ) présentant une valeur quasi-nulle, résultat surprenant étant donné la situation des deux populations.

Une distance génétique quantifie le degré de divergence génétique entre unités taxonomiques (populations, espèces) prises deux à deux. Une matrice de distance de Cavalli-Sforza a été calculée sur ces populations à partir du logiciel Genetix et a permis la réalisation d'un arbre de distances par neighbor-joining (figure 4).

Figure 4 : Arbre construit par "neighbor-joining", illustrant les relations génétiques entre les populations à partir de données microsatellites.

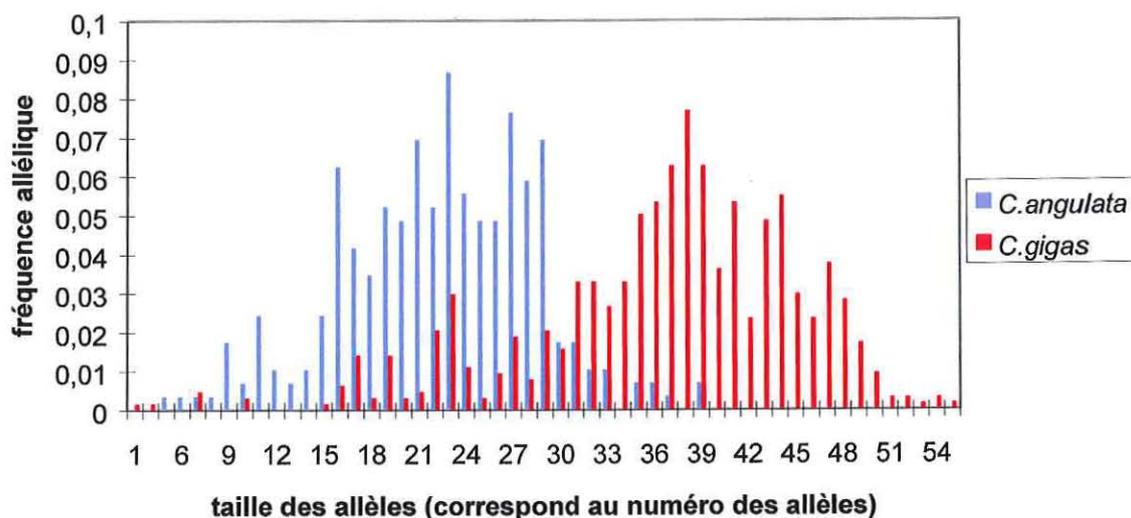


1.4.2.3 Différenciation *Crassostrea gigas* - *Crassostrea angulata* :

L'étude des fréquences alléliques à chaque locus chez *C. gigas* puis *C. angulata* amène à la réalisation d'histogrammes exprimant la fréquence des allèles en fonction de leur taille respective. L'exemple du locus CG44 est donné en figure 5.

Pour ce faire, toutes les populations, au sein de chaque taxon, sont groupées en une seule afin de procéder au calcul des fréquences alléliques dans deux pôles distincts et les comparer. Au vu des résultats (figures 1 et 2), la population KEE (Taïwan) est insérée dans le regroupement *C. angulata*. On constate que sur un loci (CG 44) une nette différenciation dans la taille des allèles apparaît entre les deux taxons : 38% des allèles présents chez l sont absents chez *C. angulata* et 15% dans le sens inverse. *C. angulata* ne présente que des allèles grands comparativement à *C. gigas* dont les allèles se répartissent sur toute la courbe avec une prédominance au niveau des petites tailles alléliques. Sur le locus CG 108, les résultats vont dans le même sens avec 24% des allèles présents chez *C. gigas* et absents chez *C. angulata*. Par contre sur les deux autres loci, à savoir CG 49 et L10, les allèles sont présents sur à peu près toute la distribution des tailles. Le pourcentage d'allèles présents chez l'un des deux taxons et absents chez l'autre ne dépasse pas 11%.

Figure 5 : Répartition des fréquences alléliques au locus CG44 en fonction de la taille des allèles.



Le test non paramétrique de Wilcoxon est utilisé pour tester l'homogénéité des distributions aux deux taxons. Les résultats obtenus sont :

CG44	19,70	*** / Très significatif
CG108	13,40	*** / Très significatif
CG49	8,55	*** / Très significatif
L10	1,13	Non Significatif

La distribution des allèles est bien significativement différente entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* aux loci CG44, CG108 et CG49 (mais pas au locus L10).

1.5 APPLICATIONS ET TRANSFERTS ENVISAGEABLES

Les possibilités d'application des marqueurs développés dans le cadre de ce programme sont nombreuses.

Les **marqueurs mitochondriaux** permettent de distinguer les différentes espèces d'huîtres, de manière fiable et non destructive. Cette distinction permet, par comparaison avec les profils observés pour les différents spécimens déjà étudiés, de déterminer des échantillons d'espèce indéterminée ou litigieuse. Ce contrôle peut être réalisé en cas d'importations d'huîtres en provenance de l'étranger afin de déterminer leur espèce. Notre étude nous permet notamment de distinguer *C. gigas* et *C. angulata*, taxons conspécifiques qui étaient jusqu'à présent indistinguables.

Ces techniques, basée sur l'amplification PCR peuvent être mises en œuvre dans tout laboratoire disposant des équipements suivants :

- ❖ centrifugeuse (extraction d'ADN)
- ❖ bain thermostaté (extraction d'ADN et restriction)
- ❖ thermocycleur (amplification de l'ADN par PCR)
- ❖ générateur et cuve d'électrophorèse horizontale (migration des fragments)
- ❖ table UV (visualisation des fragments d'ADN)

Les **marqueurs microsatellites**, beaucoup plus variables que les marqueurs mitochondriaux, ouvrent d'autres applications. En effet, les 4 locus utilisés sont spécifiques de l'espèce *C. gigas*. Les possibilités d'amplification de ces locus pour d'autres espèces n'ont pas encore été étudiées. Le très fort niveau de variabilité observé (plus de 50 allèles par locus) permet d'utiliser ces marqueurs pour des études de recherche de parenté (pour des lots produits en éclosion). Une autre application envisageable est la comparaison de lots (en cas de vol ou de litige concernant le statut d'un lot par rapport à un autre).

1.6 CONCLUSION

Des **marqueurs diagnostiques des différentes espèces** présentes au sein des deux genres d'huîtres creuses (*Crassostrea* et *Saccostrea*) ont été développés. Ces marqueurs du génome mitochondrial sont utilisables pour des contrôles d'échantillons

dont l'espèce est incertaine ou douteuse. Ce travail se poursuit au laboratoire, en fonction de l'arrivée de nouveaux échantillons et fera l'objet d'une publication de synthèse dans l'avenir.

Des **marqueurs de populations** au sein de l'huître creuse *Crassostrea gigas* sont disponibles. Les 4 locus microsatellites révèlent un faible niveau de différenciation entre populations, résultat concordant avec la récente introduction de l'espèce en Europe et les importants flux liés aux activités ostréicoles. Ce faible niveau de différenciation ne permet pas de distinguer de manière suffisamment nette les différents stocks pour permettre une identification claire.

1.7 BIBLIOGRAPHIE

- Banks M. A., Hedgecock D., C. Waters 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.
- Boudry P., Heurtebise S., Collet, B., Cornette, F., A. Gérard. 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.* in press.
- Bougrier S., Ragueneas G., Bachere E., Tige G., H. Grizel 1986. Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France. Résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. angulata* - *C. gigas*. ICES, C.M. 1986/F : 38.
- Comps M., Bonami J. R., Vago C., A. Campillo 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C. R. Acad. Sci. 3 Sci. Vie* **282**, 1991-1993.
- Estoup A., Largiader C. R., Perrot, E., D. Chourrout 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**, 295-298.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package, version 3.5c). Department of Genetics, SK, University of Washington, Seattle, WA.
- Folmer O., Black W. H., Hoeh W., Lutz, R., R. Vrijenhoek 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**, 294-299.
- Grizel H., M. Héral, 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer* **47**, 399-403.
- Héral M. 1986. Traditional oyster culture in France. In: G. Barnabé (ed.) *Aquaculture*. Ellis Horwood Limited, pp. 345-390.
- McElroy D., Moran P. Bermingham, E., I. Kornfield 1991. REAP. The restriction Enzyme Analyses Package. Version 4.0. Department of Zoology, Migratory Fish Research Institute and Center for Marine Studies, University of Maine, Orono, USA

- Menzel, R.W. 1974. Portuguese and Japanese oysters are the same species. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**, 453-455.
- Mokady O., Rozenblatt S., Graur D., Y. Loya 1994. Coral-host specificity of Red Sea *Lithophaga* bivalves: interspecific and intraspecific variation in 12S mitochondrial ribosomal DNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**, 158-164.
- O'Foighil D., Gaffney P. M., T. J. Hilbish 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.
- Smith P. J., Ozaki H., Y. Fujio 1986. No evidence for reduced genetic-variation in the accidentally introduced oyster *crassostrea gigas* in New-Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* **20**, 569-574.

2 ACTION DE RECHERCHE 2: Amélioration de la qualité chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par la sélection de souches performantes.

2.1 RAPPEL DES OBJECTIFS

Certains bassins ostréicoles, dont le bassin de Marenne-Oléron, présentent des densités très élevées en huîtres, qui se traduit par une compétition trophique importante et par une dépression générale des performances de croissance. Le but du programme débuté en 1996 vise à établir les relations entre les caractères physiologiques impliqués dans la croissance (respiration, assimilation, digestion, excrétion, rendement métabolique, etc...) et leurs bases génétiques (déterminisme, variabilité intra et inter-populations, hétérozygotie, accidents chromosomiques, etc...). L'objectif final est d'évaluer les possibilités de sélectionner des huîtres creuses *Crassostrea gigas* possédant de meilleurs rendements métaboliques pour des caractères physiologiques comme la nutrition ou la respiration par exemple.

L'année 1996 avait été principalement dédiée à la production de matériel biologique, de nouvelles techniques d'estimation des paramètres physiologiques et le développement de nouveaux marqueurs génétiques. Les premiers résultats avaient porté sur le paramètre croissance. Ils avaient permis de mettre en évidence l'existence de variabilité des performances de croissance, principalement due à des différences de potentiel de croissance ayant une composante génétique non négligeable. Les performances de croissance s'étaient avérées stables sur cette première année. Il était apparu que la croissance larvaire est corrélée aux performances de croissance après fixation mais que cette corrélation diminue au cours du temps.

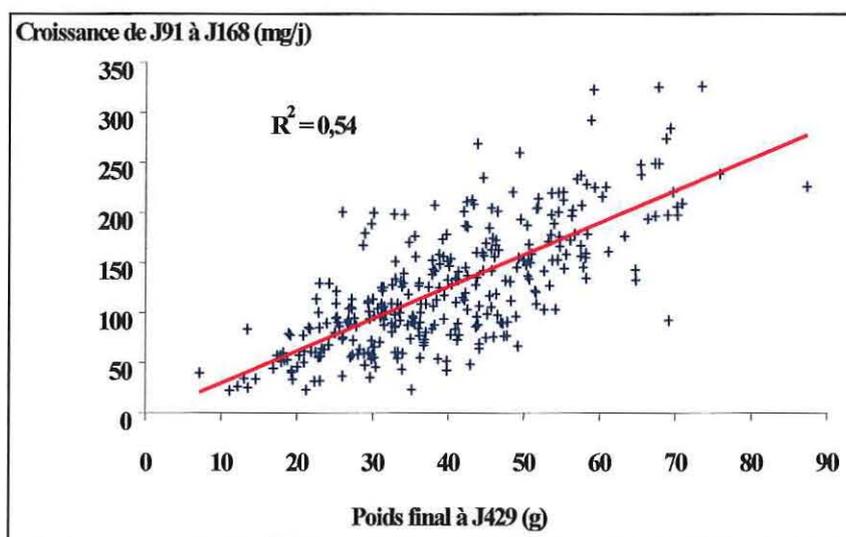
Cette année 1997 a surtout été consacrée au recueil de nombreuses données sur la croissance, la physiologie et la génétique issue de l'analyse des mêmes individus. Suite à de très fortes mortalités survenues pendant l'été 1996, une partie seulement des croisements réalisés a pu être utilisée pour répondre aux différentes questions. Il s'agit des croisements intra-population à partir de 5 individus mâles et 5 individus femelles des populations G0 (bassin d'Arcachon, Estuaire de la Seudre, Baie de Bonne-Anse, et Port des Barques) ayant abouti à 4 populations G1, ainsi que la quatrième pseudo-cohorte de fixation provenant des croisements inter-population. Ces populations ont été élevées en condition non sélective à l'écloserie de La Tremblade.

2.2 SUIVI DES PERFORMANCES DE CROISSANCE

La croissance individuelle a été suivie à partir du stade précoce à la station de La Tremblade. Un premier groupe d'individus (1213 huîtres) issus des croisements 5X5 effectués en 1996 ont été marqués individuellement. L'étude de leurs performances de croissance a montré une grande variabilité aux stades précoces ainsi qu'une constance de la vitesse de croissance au cours du temps. Environ 50 % de la variation du poids total observée l'année 2 peut être expliquée par le poids total atteint à la fin de l'année 1

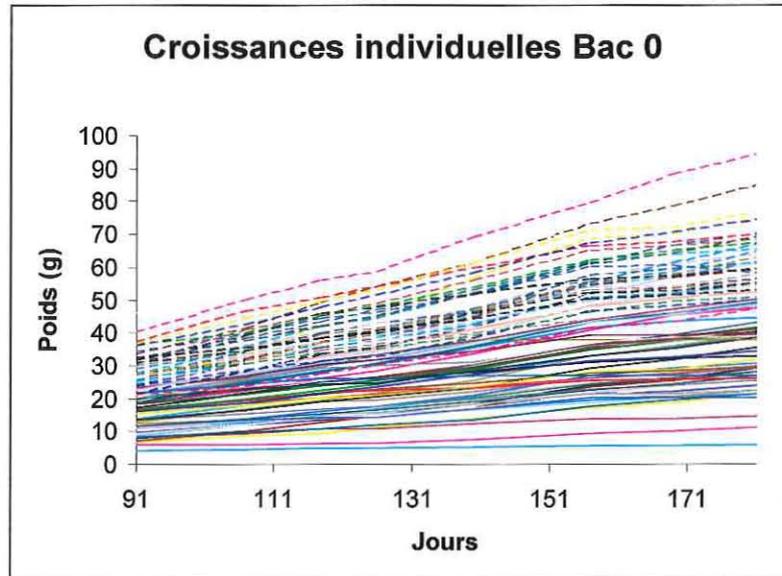
(Figure 6). Ces résultats confirment ceux obtenus l'année précédente sur les pseudo-cohortes. Parmi ces animaux, un échantillon a été choisi pour effectuer les mesures physiologiques décrites au paragraphe suivant.

Figure 6 : Corrélation entre le taux de croissance initial (estimé entre les jours 91 et 168) et le poids total mesuré au jour 429.



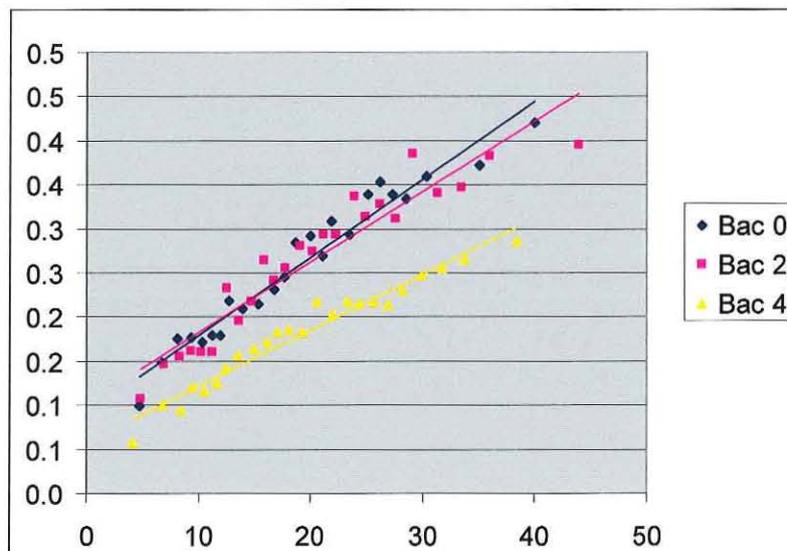
Parallèlement, deux autres expériences ont été conduites dans la nurserie de Bouin et dans l'étang de Thau. Dans l'expérience menée à Bouin, 3 populations G1 "5X5" ont été élevées dans différentes conditions de niveau de compétition trophique (faible = "Tank 0", moyen = "Tank 2" et élevée = "Tank 4"). L'objectif était d'étudier l'impact de la compétition inter-individuelle pour la nourriture sur la croissance d'huître de même âge mais de poids initial très variable. Les performances de croissance observées sont très variables d'un individu à l'autre (figure 7). Ces résultats montrent à nouveau que les performances de croissance sont en partie conservées dans le temps. Cela se traduit par une bonne corrélation entre le poids individuels au début de l'expérience et les performances de croissance observées au cours de l'expérience (voir figure 8).

Figure 7 : Courbes individuelles de croissance dans le bac "0" (faible compétition trophique).



Cette expérience permet également de fournir de nouveaux résultats sur la variabilité et la plasticité de la croissance. Cette expérience montre que les huîtres maintenues dans des conditions de faible et moyenne compétition trophique ont des performances similaires de croissance et qu'il n'y a pas d'interaction entre le niveau de compétition trophique et la relation entre poids total initial et vitesse de croissance (Figure 7). En effet, la compétition trophique affecte de façon similaire (à hauteur de 30% environ) les petites et les grosses huîtres.

Figure 8 : Effet du niveau de compétition (Bac 0, 2, 4 représentant respectivement les conditions de faible, moyenne et forte compétition trophique) sur la corrélation entre le poids total initial et la vitesse de croissance.



Les vitesses de croissance sont significativement différentes entre les 3 types de

croisement 5X5. Ce résultat tend à supporter l'idée d'une base génétique à ces différences observées entre les populations.

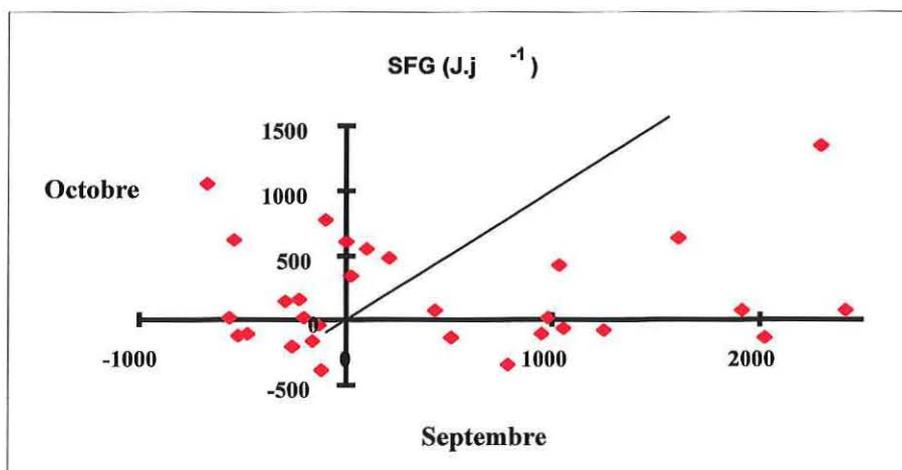
A la fin de ce suivi, certains individus ont été échantillonnés pour la détermination des génotypes en allozymes et microsatellites, le taux d'aneuploïdie (voir figure 10) et des dosages d'enzymes de stress.

2.3 ANALYSES PHYSIOLOGIQUES

Deux expériences principales ont été effectuées sur les populations G1: l'évaluation de la stabilité temporelle des paramètres physiologiques et la détermination des performances physiologiques (fonctions métaboliques, turn-over des protéines, activité des enzymes digestives). Un dispositif de mesure en continue de l'acquisition de l'énergie (filtration) et des dépenses énergétiques (consommation d'oxygène) a été développé dans le but d'améliorer l'estimation des différents termes du bilan énergétique chez les bivalves.

L'étude de la stabilité temporelle est basée sur les paramètres estimés à l'aide de ce dispositif expérimental. Les mêmes individus ont été ainsi étudiés à plusieurs reprises: Septembre 97, Octobre 97, Décembre 97 puis février 98 et Avril 98. Les valeurs moyennes observées du RTA (Respiratory Time Activity: pourcentage du temps passé par l'animal à consommer de l'oxygène sur la période de mesure) sont en complet accord avec les travaux antérieurs. Pour le moment, aucune stabilité temporelle des paramètres physiologiques n'a pu être mise en évidence (figure 9), mais c'est la première fois que de telles mesures (plutôt que estimations) sont faites individuellement. L'analyse globale des 5 séries d'expérience sur les mêmes individus devrait être plus informative sur la stabilité temporelle (si elle existe) et sur le comportement physiologique des animaux.

Figure 9 : Espérance de croissance en octobre en fonction de l'espérance de croissance en septembre.



Un autre échantillon des populations G1 a été acclimaté pendant 2 semaines à une faible température (15°C) et une faible quantité de nourriture. Le bilan énergétique de ces animaux a été ensuite déterminé par mesure discrète par la méthode en flux

continu. A l'issue de ces mesures de physiologie non destructive, le "turn-over" des protéines a été estimé. Les animaux ont ensuite été sacrifiés, échantillonnés et divisés entre les différents partenaires pour le dosage de l'activité des enzymes digestives et protéolytiques. Les résultats montrent une forte diminution de l'écart-type sur les données d'activité enzymatique entre les populations G0 et G1, qui peut être attribuée à une plus grande homogénéité des conditions environnementales pour les individus de la G1, en particulier en ce qui concerne la compétition trophique qui reste beaucoup plus élevée dans le milieu naturel. On ne peut cependant pas exclure une possible réduction de la variabilité génétique, puisqu'une faible part de celle-ci a été utilisée dans les croisements 5X5.

Il apparaît également qu'il n'y a pas de différence significative entre les populations pour les paramètres de nutrition et l'activité des enzymes digestives, excepté pour le poids de chair sèche, et ce, contrairement aux résultats obtenus pour des individus G0. En conséquence, on ne peut sélectionner une sous-population sur la base de l'activité des enzymes digestives pour obtenir des performances physiologiques spécifiques. Cependant, cette sélection pourrait se faire à un niveau individuel.

En effet, les différences individuelles observées pour les enzymes digestives pourraient être expliquées par l'existence de 2 groupes d'animaux. Les huîtres du premier groupe montrent une activité enzymatique plus faible, caractérisée par une affinité plus grande à la nourriture ingérée que les huîtres du second groupe. De la même manière, deux groupes d'individus peuvent être définis en fonction de la relation entre l'espérance de croissance et le poids sec estimé.

2.4 ANALYSES GÉNÉTIQUES

L'utilisation de 4 locus microsatellites fortement polymorphes a été standardisée, permettant d'identifier les parents de manière sûre et rapide dans des croisements en masse. Pour cela, une cinquantaine d'individus de chacune des 3 G1 étudiées ont été analysés. Environ 90 % des parentés peuvent être déterminées à l'aide de seulement 2 locus.

Dans nos croisements, la contribution des parents mâles et femelles (G0) à la génération suivante (G1) est fortement déséquilibrée. Certains individus ne contribuent pas du tout à la génération suivante alors que d'autres individus contribuent à la majorité de celle-ci (tableau 19).

Tableau 19 : Contribution des parents mâles (M) et femelles (F) dans les croisements de la population Arcachon.

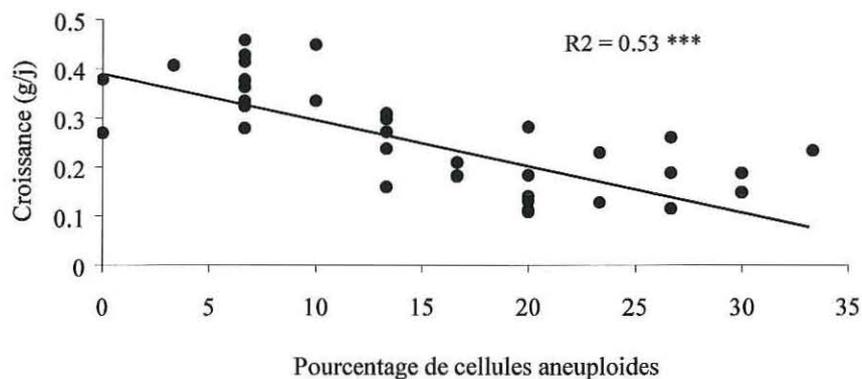
	M1	M2	M3	M4	M5	Total
F1	1	2	3	2	3	11
F2	1	2	3	6	8	20
F3	0	0	0	0	0	0
F4	4	3	4	1	5	17
F5	0	0	0	0	1	1
Total	6	7	10	9	17	49

La transmission entre les parents et la descendance de 3 croisements "5x5" a été étudiée également à l'aide de marqueurs enzymatiques. De forts écarts aux prédictions mendéliennes ont été observés à plusieurs locus dans les 3 populations. Ces déviations peuvent être reliées directement aux contributions parentales déséquilibrées dans chaque type de croisement. Aucune relation entre hétérozygotie et croissance (poids total) dans ces 3 populations n'a été mise en évidence.

Un traitement au $MgCl_2$ a été testé sur des huîtres marquées individuellement dans le but de déterminer le taux d'aneuploidie sur des biopsies de branchie. Les mitoses étaient absentes ou très rares dans ces préparations faites à partir d'animaux des 3 populations "5X5". Etant donné qu'aucune méthode non destructive n'a pu être mise au point pour sélectionner des géniteurs sur la base de leur taux d'aneuploidie, l'étude d'une transmission possible de l'aneuploidie à la génération suivante sera étudiée par une méthode destructive juste après la ponte (printemps 1998).

La comparaison des taux d'aneuploidie entre 10 petits individus de chaque population (25% pour Port des Barques, 25% pour Bonne-Anse, et 30% pour Arcachon) et 10 gros individus de chaque population (18% pour Port des Barques, 19% pour Bonne-Anse, et 22% pour Arcachon) a confirmé la corrélation entre l'aneuploidie somatique et la vitesse de croissance. Le taux d'aneuploidie global estimé sur ces individus est légèrement inférieur à celui estimé l'année précédente sur les pseudo cohortes, mais reste néanmoins relativement élevé.

Figure 10 : Corrélation entre le pourcentage de cellules aneuploïdes et la croissance mesurée à Bouin.



La recherche de marqueurs de chromosomes, basée sur deux types de techniques: banding (bande G et R) et le FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) est en cours dans le cadre de collaborations nationales (CNRS) et internationales (Irlande). Les bandes G permettent d'identifier les différentes paires de chromosomes d'un caryotype qui montre un motif spécifique. Les bandes R permettent un diagnostic complémentaire pour l'identification des chromosomes. Ces résultats sont les premiers obtenus chez l'huître creuse. Ils devraient permettre à l'avenir une identification des chromosomes manquants chez les individus présentant des cellules aneuploïdes.

Une banque génomique d'ADN a été construite contenant 240000 clones dont les inserts varient de 6 à 50 kpb. Le clonage de l'ADN génomique de *C. gigas* est

maintenant complet. Le principal travail de recherche a été le développement de méthodes pour préparer des étalements chromosomiques chez *C. gigas*. La méthode est optimisée et les étalements de chromosomes obtenus sont maintenant utilisables pour l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) à l'aide de sondes ADN.

2.5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Malgré les fortes mortalités enregistrées en 1995 et 1996, les études se poursuivent dans des conditions satisfaisantes et des réponses intéressantes ont pu être apportées en étudiant la croissance, la physiologie et la génétique sur des mêmes animaux.

Les suivies de croissance ont permis de mettre en évidence que les performances de croissance sont relativement stables entre la première et la seconde année et que la variabilité est très importante au sein du matériel étudié. Les estimations de croissance individuelle réalisées sur 1500 huîtres marquées nous permettent d'envisager une expérience de sélection pour la croissance et l'étude des réponses corrélatives à cette sélection.

Les marqueurs microsatellites ont permis d'identifier environ 90% des parentés entre les géniteurs G0 et les descendances obtenues en G1 pour les trois populations étudiées. Ce résultat confirme l'intérêt de ces marqueurs pour répondre à de telles questions. L'identification des parentés est en effet particulièrement importante dans ce genre d'études où l'on souhaite estimer des paramètres génétiques qui pourraient être biaisés par d'éventuelles contaminations que l'on ne peut exclure a priori au cours de l'élevage de ces animaux.

Les marqueurs microsatellites et allozymiques ont de plus montré que la contribution des différents parents aux croisements est fortement déséquilibrée. L'analyse conjointe des deux types de résultats sera réalisée prochainement.

En ce qui concerne les paramètres physiologiques, il semble que l'on puisse conclure à une non stabilité temporelle des caractères physiologiques étudiés. Des études supplémentaires sont nécessaires pour expliquer les différences observées au cours du temps. Les résultats obtenus à partir des huîtres élevées dans des conditions trophiques différentes montrent qu'il existe deux comportements différents en ce qui concerne les enzymes digestives et l'espérance de croissance.

L'absence d'interaction entre le niveau trophique et la relation (poids/pente) dans l'expérience menée en milieu intensif pourrait s'expliquer par le fait que l'on ne se situe peut-être pas dans des conditions très compétitives telles que l'on peut en rencontrer dans le milieu naturel comme l'estuaire de Marenne-Oléron.