

**Ressources génétiques chez l'huître creuse
Crassostrea gigas : variabilité, différenciation et
adaptation aux conditions de production en
Charente Maritime**

Rapport du
Contrat « Conseil Général du 2 mars 1998 »

Année 1998

**A. Huvet¹, P. Boudry¹, J.P. Baud², M. Nourry², P.
Phelipot¹, et A. Gérard¹**

**Avec la collaboration de :
C. Ledu¹, S. Heurtebise¹, F. Cornette¹, F. Blouin¹, E.
Bédier¹ et S. Lapegue¹**

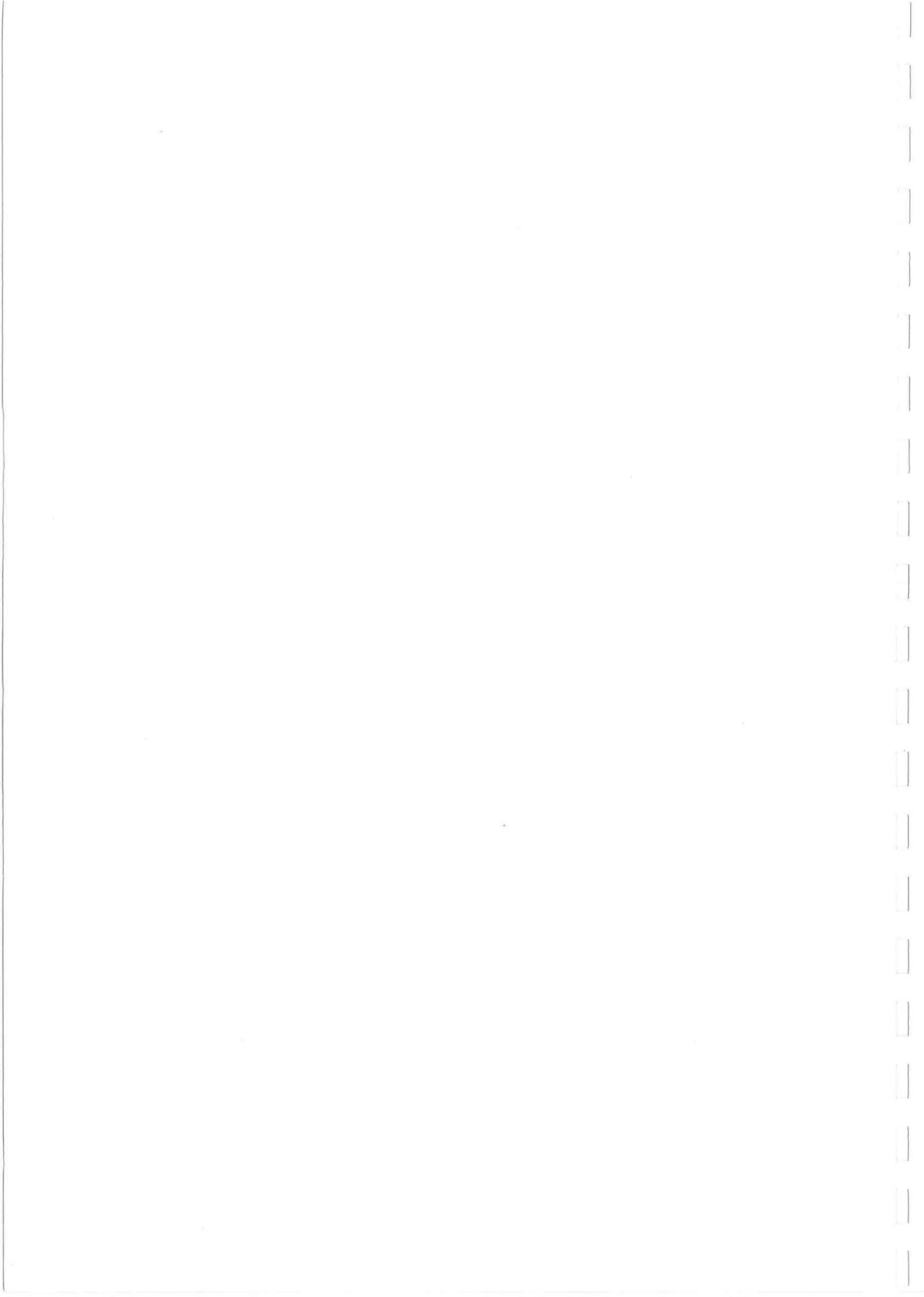
1-IFREMER

Laboratoire de Génétique et Pathologie
BP 133 – 17390 La Tremblade

2- IFREMER

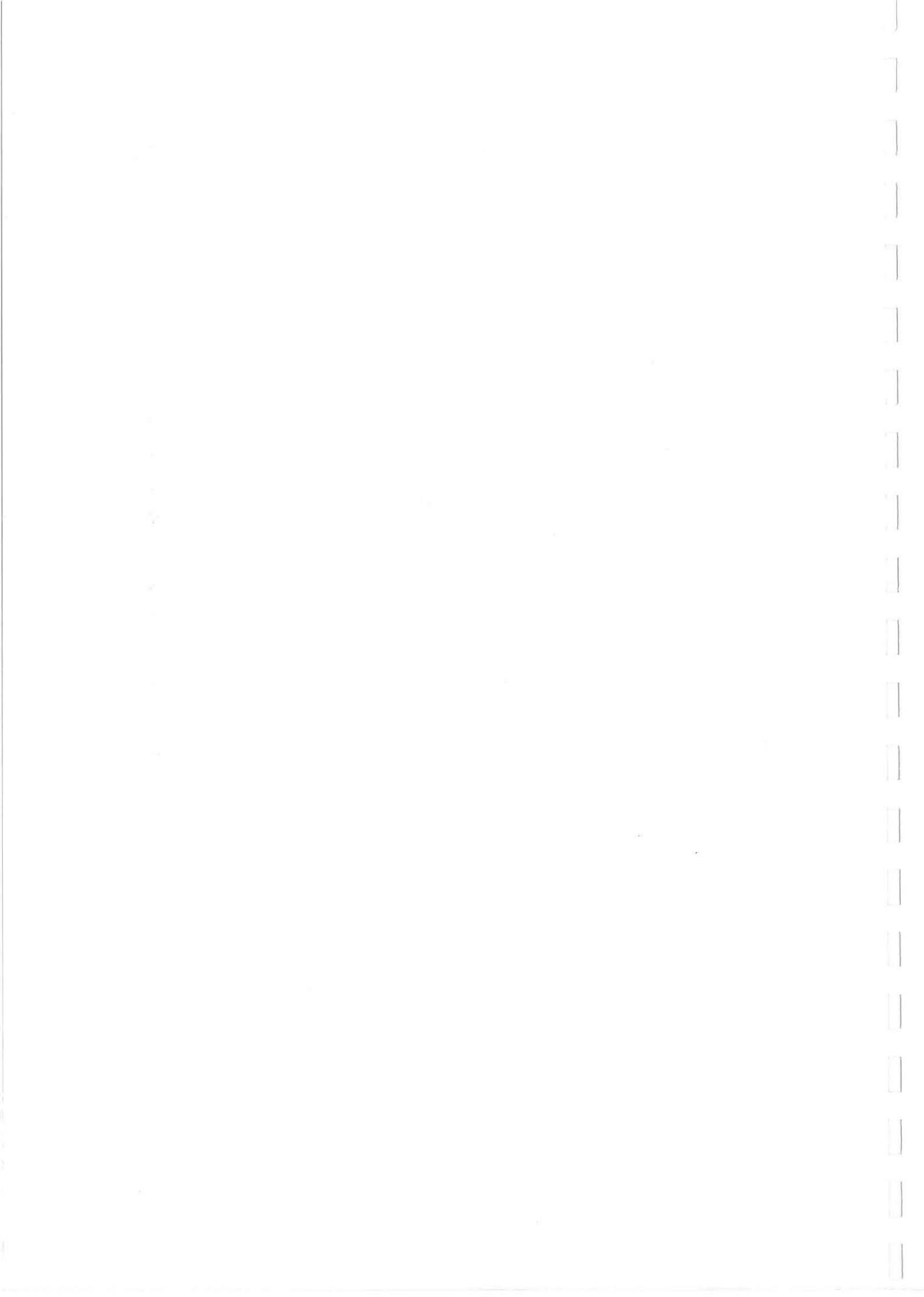
Laboratoire de Bouin
Polder des Champs
85230 Beauvoir-sur-mer

Janvier 1999



SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| I. PRÉAMBULE : PROGRAMME ET OBJECTIFS EXPRIMÉS | 2 |
| 1.1. Contexte du sujet | 2 |
| 1.2. Position du projet par rapport aux actions de recherches en cours à l'IFREMER | 4 |
| 1.3. Etude proposée | 6 |
| II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE | 10 |
| 2.1. Les Bivalves marins : de nombreuses études | 10 |
| 2.1.1. Approche systématique et anatomique | 10 |
| 2.1.2. Approche écologique et physiologique | 11 |
| 2.1.3. Approche génétique des populations | 12 |
| 2.2. Le modèle biologique : l'huître creuse japonaise <i>Crassostrea gigas</i> | 14 |
| 2.2.1. Systématique | 14 |
| 2.2.2. Historique ostréicole | 16 |
| 2.2.3. Etat actuel des connaissances | 17 |
| 2.3. Les marqueurs moléculaires | 23 |
| 2.3.1. Les microsatellites | 23 |
| 2.3.2. Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction (RFLP) | 24 |
| III. RÉSULTATS 1998 | 25 |
| 3.1. Caractérisation moléculaire des populations de <i>Crassostrea gigas</i> | 25 |
| 3.1.1. Echantillonnage | 25 |
| 3.1.2. Les outils moléculaires | 25 |
| 3.1.3. Traitement statistique des données | 27 |
| 3.1.4. Résultats | 28 |
| 3.1.4.1. Marqueurs mitochondriaux | 28 |
| 3.1.4.2. Marqueurs microsatellites | 29 |
| 3.2. Les croisements | 33 |
| 3.2.1. L'outil zootechnique | 33 |
| 3.2.1.1. Protocole de croisement | 33 |
| 3.2.1.2. Croisements | 34 |
| 3.2.2. Résultats | 36 |
| 3.2.2.1. Fécondation | 36 |
| 3.2.2.2. Croissance | 36 |
| 3.2.2.3. Survie | 37 |
| IV. CONCLUSION | 39 |
| BIBLIOGRAPHIE | 41 |
| GLOSSAIRE | 47 |



Ressources génétiques chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : variabilité, différenciation et adaptation des populations aux conditions de production en Charente Maritime.

I. Préambule : Programme et objectifs exprimés

1.1. Contexte du sujet

L'histoire de l'ostréiculture française présente une succession de périodes d'exploitation florissante et de périodes de crise, liées à la surexploitation des sites ou à des maladies. Ainsi, un des principaux faits marquants de l'ostréiculture française est la disparition massive entre 1969 et 1971 de l'huître creuse portugaise (*Crassostrea angulata*) victime d'une maladie virale (Comps *et al.*, 1976). De même, l'introduction successive de deux parasitoses (marteillose et bonamiose) ont très sérieusement réduit l'exploitation de l'huître plate *Ostrea edulis*. Les importations au début des années 1970 de l'huître creuse japonaise (*Crassostrea gigas*) semblent avoir été une bonne réponse à la disparition de l'huître portugaise (Grizel et Héral, 1991), les productions ostréicoles ayant rapidement retrouvé un niveau important, atteignant 80 000 tonnes dès 1976.

Des études scientifiques ont ensuite montré que ces deux huîtres (*C. gigas* et *C. angulata*) étaient une seule et même espèce (Menzel, 1974) : elles se sont révélées complètement interfertiles et aucun caractère morphologique ou génétique ne pouvait les distinguer de manière fiable. Ce point apparaît aujourd'hui indiscutable et il a été confirmé par des études récentes réalisées au laboratoire LGP de La Tremblade (Boudry *et al.*, 1998).

Mais bien que ces deux huîtres soient de la même espèce, elles se distinguent par certains points :

1. Sensibilité de *C. angulata* au virus qui a décimé les stocks entre 1969 et 1971 alors que *C. gigas* n'a pas été affecté par cette maladie lors de son introduction,
2. Croissance plus rapide de *C. gigas*, liée à des performances physiologiques supérieures à celles de *C. angulata* (His, 1972 ; Bougrier *et al.*, 1986).

La situation de l'huître creuse japonaise *C. gigas* en France (et en Europe) n'est pas unique, puisqu'elle a été introduite avec succès dans de nombreux pays et représente aujourd'hui 89%

de la production mondiale d'huîtres, toutes espèces confondues, selon les chiffres fournis par la F.A.O. (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). Le tableau ci-dessous donne la liste des principaux pays producteurs. Elle est ainsi présente sur la côte ouest des USA et du Canada (où son introduction remonte à 1912), en Australie (introduction en 1950) et en Nouvelle-Zélande où son introduction en 1971 fût, semble-t-il, involontaire (Smith *et al.*, 1986).

Principaux pays producteurs de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (données FAO, 1995).

| Pays | Tonnage 1994 |
|----------------------|--------------|
| Afrique du Sud | 24919 |
| Allemagne | 84 |
| Australie | 2991 |
| Canada | 5223 |
| Chili | 1130 |
| Chine | 313476 |
| Corée | 172313 |
| France | 131347 |
| Grande-Bretagne | 357 |
| Hong-Kong | 477 |
| Iles Anglo-Normandes | 1420 |
| Irlande | 1500 |
| Japon | 223481 |
| Maroc | 263 |
| Mexique | 929 |
| Namibie | 35 |
| Nouvelle-Zélande | 2000 |
| USA | 63250 |
| Tous pays confondus | 945804 |

Mais l'introduction d'une espèce d'intérêt économique dans une zone géographique éloignée de son aire d'origine soulève des questions qui peuvent être adressées pour *C. gigas* :

1. Existe-t-il, dans l'aire naturelle de répartition de l'espèce, des races, des origines

- géographiques ou des populations distinctes ? Ou, au contraire, l'espèce représentative un ensemble relativement uniforme ?
2. Les animaux introduits (et leur descendants) sont-ils bien adaptés à leur nouvel environnement ? Il est possible qu'il existe dans l'aire naturelle de répartition de l'espèce d'autres animaux (race, population...) présentant de meilleures caractéristiques.
 3. Suite à une introduction dans une nouvelle zone géographique, la variabilité génétique dans les animaux introduits est-elle suffisante ? Si non, une diminution des performances (liée à la consanguinité) peut apparaître.

Les réponses à ces questions seraient très utiles pour une bonne utilisation des ressources génétiques chez *C. Gigas*. En effet, plusieurs reproches sont faits à *Crassostrea gigas* par les professionnels, notamment par rapport aux caractéristiques que présentait *Crassostrea angulata* :

1. *Crassostrea gigas* présente des problèmes d'affinage en claires (amaigrissement,...).
2. La technique du captage est plus difficile à gérer.
3. Une certaine fragilité en période estivale.

1.2. Position du projet par rapport aux actions de recherches en cours à l'IFREMER

De très nombreuses espèces animales et végétales d'intérêt économique font aujourd'hui l'objet de programmes de sélection ou de conservation des ressources génétiques. Pour les espèces non "domestiquées" (au sens où les individus issus des populations naturelles ne se distinguent pas des individus en élevage d'un point de vue génétique), l'étude comparative des stocks des principaux pays, basée sur des marqueurs génétiques, représente un élément essentiel pour la gestion des ressources génétiques. Ce type d'étude est indispensable pour assurer une protection des stocks existants et développer des programmes de transplantation et de sélection. Cette approche permet d'appréhender à la fois le niveau inter-spécifique (distinction entre espèces proches, niveau de différenciation) et intra-spécifique (structuration génétique des populations, flux géniques).

Face aux risques de développement en France de nouveaux pathogènes pouvant affecter les stocks de *Crassostrea gigas*, le Laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) de La Tremblade a initié en 1992 un programme de conservatoire de souches supporté dans un premier temps par le Conseil Général pour la première espèce *C. virginica* puis par la Région Poitou-Charentes

dans le cadre du contrat de plan Etat-Région 1994-1998 Ce conservatoire a pour objectif d'étudier l'acclimatation de différentes espèces d'huîtres creuses (genres *Crassostrea* et *Saccostrea*) afin d'acquérir des connaissances sur ces espèces et d'évaluer l'intérêt qu'elles pourraient présenter au cas où une épizootie majeure se déclarerait chez *C. gigas*. Il faut souligner que toutes les huîtres importées et les différents croisements réalisés sont strictement confinées au laboratoire dans une "salle de quarantaine" dont l'eau est stérilisée avant rejet en mer afin d'éviter la dissémination des huîtres, des espèces hôtes et celle d'éventuels pathogènes. L'importation d'espèces étrangères ainsi que le transfert d'espèces est désormais strictement réglementée par le Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM, 1994), le testage ou l'implantation d'une nouvelle espèce dans le milieu naturel est soumis à son autorisation. Les retombées d'un tel programme ne peuvent donc être qu'à long terme pour la profession ostréicole.

Mais des retombées plus rapides pour l'ostréiculture sont néanmoins envisageables car il nous est désormais possible, grâce aux prolongements des recherches menées à La Tremblade sur les marqueurs génétiques, de réaliser une étude à une échelle mondiale des populations de l'espèce *Crassostrea gigas*. La notion de "population" n'est pas facile à cerner chez une espèce telle que *Crassostrea gigas* (dispersion larvaire importante, transferts fréquents d'animaux liés à l'activité ostréicole). L'utilisation de marqueurs génétiques permet d'appréhender directement cette notion de population par la description fine de la différenciation génétique. Des marqueurs génétiques, particulièrement bien adaptés à ces problématiques car hyper-variables, ont été mis au point récemment dans notre laboratoire en collaboration avec le laboratoire Génome et Populations de Montpellier (CNRS). Ils permettent désormais l'analyse approfondie et la discrimination fine de populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et de rechercher si certaines d'entre-elles n'auraient pas des caractéristiques intéressantes pour l'ostréiculture locale (croissance, résistance estivale, affinage...). La diffusion de telles populations auprès de la profession serait plus rapide car il s'agit de la même espèce. Selon les recommandations du CIEM, il faut effectuer une mise en quarantaine des huîtres importées (après contrôles sanitaires) et un transfert uniquement dans le milieu naturel de la première génération (F1).

Dans le présent projet, nous nous proposons donc d'étudier la variabilité génétique de populations d'huîtres creuses *C. Gigas* au niveau mondial à l'aide de ces nouveaux marqueurs

moléculaires. La reconnaissance de populations génétiquement distinctes étant désormais possible, nous proposons également de comparer les performances de certaines de ces populations dans les conditions locales d'élevage. L'objectif serait ici d'identifier des populations plus performantes que celle actuellement en élevage. Pendant toute la durée du projet, la profession ostréicole représentée par la Section Régionale de la Conchyliculture de Marennes Oléron sera tenu informée de l'évolution des résultats.

1.3. Etude proposée

1ère partie : Caractérisation des ressources génétiques mondiales chez *Crassostrea gigas*

La caractérisation de différentes populations sera réalisée par marqueurs de l'ADN mitochondrial et de l'ADN nucléaire. Le génome mitochondrial est particulièrement informatif dans la distinction entre espèces proches, ou populations nettement différenciées au sein d'une espèce. Des études récentes réalisées au laboratoire LGP de La Tremblade ont révélé l'existence d'haplotypes spécifiques de *C. gigas* et *C. angulata* (Boudry *et al.*, 1998). Les marqueurs nucléaires qui seront utilisés sont les marqueurs microsatellites (actuellement 5 microsatellites sont utilisés en routine au laboratoire et 3 en cours de mise au point) dont les qualités sont des atouts indiscutables dans une telle étude :

- Ils sont hypervariables c'est-à-dire qu'ils présentent un fort taux de polymorphisme (du à un fort taux de mutation, la littérature cite souvent des taux de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} par génération). Cette caractéristique est essentielle dans l'étude de populations génétiquement proches (populations avec peu de temps de séparation géographique et donc de divergence, populations présentant de forts flux géniques par échanges importants d'individus et/ou de gamètes, ...).
- Ils sont également supposés neutres, c'est-à-dire indépendants de la sélection naturelle et de l'adaptation des populations à l'environnement. Ils donnent donc une image non biaisée de la structuration des populations (ce qui n'est pas le cas d'autres marqueurs nucléaires comme les allozymes).

Calendrier prévisionnel:

1998

- Premières analyses de la différenciation inter-populations à l'aide de marqueurs microsatellites sur les échantillons disponibles et comparaison avec les données

mitochondriales acquises en 1996-1997.

- Recherche de nouveaux marqueurs moléculaires
- Elargissement de l'échantillonnage de populations de *C. gigas* en provenance des zones géographiques où l'espèce est présente naturellement ou a été introduite. Pour avoir une connaissance exacte de la répartition des populations de *C. gigas* et de *C. angulata* en Asie, des échantillons en provenance des côtes japonaises, des îles entre Taïwan et le Japon et de la côte Est de la Chine sont nécessaires.

1999

- Analyse par l'ensemble des marqueurs microsatellites et marqueurs mitochondriaux des populations échantillonnées en 1998.
- Complément de l'analyse effectuée en 1997 avec les marqueurs microsatellites obtenus en 1998.

2000

- Analyse des données génotypiques (microsatellites et ADN mitochondrial).

2ème partie : Adaptation au milieu, recherche d'une nouvelle souche de *Crassostrea gigas*

La recherche de nouvelles populations de *Crassostrea gigas* est nécessaire pour obtenir un échantillonnage représentatif dans cette étude. Il se doit d'être centré principalement sur deux localités : l'Asie (plus précisément le Japon et Taïwan), et l'Europe (en particulier le littoral français ainsi que le Portugal). Le contrôle sanitaire des individus transférés sera effectué par l'équipe des pathologistes du laboratoire LGP de La Tremblade. Les huîtres seront mises en élevage en salle de quarantaine (à effluents stérilisés). Ils serviront de géniteurs pour des croisements intra-populations et inter-populations avec une population de référence (Marennes-Oléron). Quatre croisements inter-populations sont prévus, les populations japonaise, taïwanaise, portugaise (*C. angulata*) et arcachonnaise seront respectivement croisées avec des individus *C. gigas* provenant du bassin de Marennes-Oléron. Les animaux seront testés sur estran et en conditions environnementales contrôlées (nourriture, température) au Laboratoire IFREMER de Bouin (Vendée) et des tests de résistance à des chocs (thermiques) seront effectués. Leurs performances physiologiques seront analysées par des suivis de croissance ainsi que des taux de survie. Les aléas de la production d'huîtres en éclosion (de la reproduction, développement larvaire, fixation jusqu'à la vie adulte) font que certains croisements ne pourront générer d'adulte. Dans ce cas, un croisement à l'identique sera réalisé

ultérieurement dans la même année ou les années suivantes.

La comparaison des résultats entre les différents lots inter-croisements associés à ceux des croisements intra-populations permettra d'estimer la présence d'une éventuelle population plus adaptée au milieu océanique français.

Calendrier prévisionnel:

1998

- Recherche de géniteurs en provenance de populations étrangères identifiées comme potentiellement intéressantes : Sud Japon, Taiwan, Portugal et de 2 populations françaises témoins (Marennes-Oléron et Arcachon).
- Contrôles sanitaires (avant et après transfert) puis stockage des huîtres en salle de quarantaine (La Tremblade), conformément aux règles zoosanitaires instituées par le CIEM.

1999

- Maturation des géniteurs (en salle de quarantaine pour les populations étrangères).
- Croisements intra- et inter-populations de manière à générer 5 lots intra-populations et 8 lots inter-populations (croisements mâles x femelles et femelles x mâles des différentes populations avec la population de référence : Marennes-Oléron) soit un total de 13 lots (l'ensemble des 20 croisements inter-populations ne peut être envisagé pour des raisons d'infrastructure d'élevage).

| | Japon | Taiïwan | Portugal | Marennes-Oléron | Arcachon |
|-----------------|-------|---------|----------|-----------------|----------|
| Japon | ✓ | | | ✗ | |
| Taiïwan | | ✓ | | ✗ | |
| Portugal | | | ✓ | ✗ | |
| Marennes-Oléron | ✗ | ✗ | ✗ | ✓ | ✗ |
| Arcachon | | | | ✗ | ✓ |

✓ croisements intra-populations

✗ croisements inter-populations (mâles d'une population x femelles de l'autre population)

- Elevage larvaire et micro-nursage (La Tremblade), nursage (Bouin) : suivi de

croissance et de survie.

2000

- Testage en élevage intensif (Bouin) : performances de croissance, en fonction du niveau trophique et de la température, et de résistance à des stress expérimentaux (chocs chauds en cours de mise au point à la Station de Bouin pour la recherche de critères de tri sur la rusticité et la résistance aux mortalités estivales du naissain). La mise en évidence de différences entre lots pourra conduire à étudier plus en détails leurs performances pour des caractères physiologiques liés à la croissance (taux de respiration, d'assimilation).
- Simultanément, testage en élevage traditionnel extensif sur plusieurs sites : croissance, survie (sensibilité aux maladies locales et aux stress environnementaux), indices de condition, affinage (en collaboration avec le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes, dirigé par Ph. Gouletquer).
- Conclusion et analyses statistiques, comparaison des expérimentations de testage.
- Réunion d'information avec la profession ostréicole, présentation de l'ensemble des résultats, multiplication des souches présentant des performances intéressantes en fonction des désirs de la profession.

II. Synthèse bibliographique

2.1. Les Bivalves marins : de nombreuses études

Les mollusques et plus précisément les bivalves marins ont fait l'objet de nombreuses études. Les raisons sont multiples. Ils représentent l'un des plus grands phylums après les arthropodes soit environ 110 000 espèces décrites. Le facteur primordial, le milieu marin, les différencie de la majorité des espèces étudiées. Ce milieu de vie modifie les phénomènes biologiques admis en milieu terrestre. Le manque de connaissances et sa complexité en font un sujet passionnant et permettent des approches prometteuses. Les cycles de reproduction, développement, nutrition des bivalves marins proposent aux scientifiques des sujets intarissables d'études approfondies.

2.1.1. Approche systématique et anatomique

La systématique des mollusques est très complexe et sujet à des controverses. La classification originelle repose sur des critères anatomiques discriminant les grands axes taxinomiques auxquels s'ajoutent la distribution macro- et micro-géographique avec la notion d'habitat pour les distinctions plus fines. De tels critères (coquille, charnière, structure des branchies, ouvertures palléales,...) émettent, *a fortiori*, des doutes quand à la pertinence des caractères pris en compte ainsi qu'à leurs méthodes d'observation et d'analyse. La délimitation actuelle de l'embranchement des mollusques a pendant longtemps été remaniée. On comprend alors les problèmes de détermination à une échelle systématique plus fine tel le genre et l'espèce. Les caractéristiques principales des mollusques sont d'une part la mollesse de leur corps non segmenté et d'autre part la rigueur géométrique du test (enveloppe calcaire ou chitineuse) avec ses nombreuses variétés de forme.

Le corps d'un mollusque se compose fondamentalement de 5 régions distinctes :

- la tête comprenant les récepteurs sensoriels et l'appareil buccal formé de la radula,
- le pied, orienté du côté ventral,
- le sac viscéral composé de la partie principale du système digestif (estomac, glande digestive), du centre moteur du système sanguin, des reins et des gonades,
- le manteau, repli tégumentaire entourant le sac viscéral et formant une cavité palléale,

contenant l'anus, les orifices génitaux et rénaux, ainsi que les branchies ou cténidies,

- la coquille ou test, enveloppe calcaire ou chitineuse protégeant le corps de l'animal.

Les lamellibranches ou bivalves marins se distinguent par leurs branchies respiratoires lamelleuses et leur coquille transformée en un système bivalve articulé par une charnière. L'appareil complexe de fermeture est formé de deux muscles adducteurs et d'un ligament élastique reliant les deux valves. Leur mobilité relative est permise par la contraction de ces deux muscles et l'étirement du ligament. Le système nerveux est décentralisé au maximum, la tête ne jouant aucun rôle dans l'organisation, et se résumant à la bouche, d'où leur premier qualificatif d'acéphale.

2.1.2. Approche écologique et physiologique

Les traits d'histoire de vie des lamellibranches soulignent des particularités communes à de nombreux organismes marins. Ils ont évolué vers deux modes de vie sédentaire, soit enfouis dans un fond mou de sable, gravier ou vase, soit fixé à un substrat solide. Les effectifs démographiques des populations sont très conséquents. La fécondation est le plus souvent externe et associée à une fécondité élevée. Leur développement se caractérise par deux phases: la phase larvaire planctonique permettant la dispersion, puis la phase benthique après métamorphose et fixation. La métamorphose est caractérisée par des remaniements importants: développement du manteau (qui synthétise la coquille définitive) et apparition des branchies. Les juvéniles en phase benthique précoce peuvent changer de substrat puis la fixation devient définitive, propre à la vie adulte (exemple de l'huître). Chez d'autres bivalves comme la coquille Saint-Jacques, les déplacements sont toujours présents à l'état adulte. Ce sont des animaux filtreurs qui se nourrissent de phytoplancton. Ils pompent de l'eau ambiante dans la cavité palléale de manière discontinue suivant un rythme dépendant de plusieurs stimulations notamment extérieures comme la photopériode, l'alternance exondation-immersion, les mouvements d'eau, la turbidité et la composition de l'eau. La filtration de l'eau se fait dans les branchies, avec une première filtration au niveau des cils frontaux et du mucus présents à leur surface et une deuxième plus fine grâce aux palpes. Les particules éliminées sont expulsées sous forme de pseudo-fécès. Le reste est acheminé dans le tube digestif.

Le mode primitif de reproduction chez les mollusques est défini par une fécondation hors du corps maternel. L'émission des œufs et des spermatozoïdes dans le milieu externe est commun à beaucoup de classes comme celle des bivalves. L'évolution du type de reproduction a

conduit à des modes très différents de fécondation interne, souvent complexe du fait de la situation primitive des orifices génitaux (Grassé, 1960). L'hermaphrodisme est un mode reproductif très présent chez les mollusques et apparaît sous des formes plus ou moins complexes. Opposé aux espèces gonochoriques voisines, cet embranchement présente un intérêt d'étude indéniable. Alors que Coe en 1945 ne relève que 400 espèces hermaphrodites vraies sur les 10 000 décrites chez les bivalves marins (Grassé, 1960), il apparaît une multitude de variantes plus ou moins complètes et complexes : hermaphrodisme alternatif (huîtres creuses), hermaphrodisme successif (huîtres plates).

2.1.3. Approche génétique des populations

Notion de dispersion larvaire :

Comme nous venons de le voir (paragraphe 2.1.2), l'une des caractéristiques principales de ces animaux est la phase larvaire planctonique. En effet, durant les tous premiers stades de la vie, les larves sont libres dans le milieu ambiant. Elles se déplacent au gré des courants et des marées, c'est la migration passive. Elle a été évaluée par Osaki et Fujio (1985) chez *Crassostrea gigas* à plus de 1000 kilomètres. La migration active (pendant laquelle les larves nagent grâce à leur vélum composé de cils vibratiles) est estimée à 50 kilomètres au maximum (Osaki et Fujio, 1985). Elle est, à mon avis, fort mal définie et on connaît très peu les incidences qu'elle peut avoir chez les bivalves marins. En effet, les déplacements sont de 2 types : horizontaux ou verticaux permettant la mobilité entre les couches d'eau. Les distances parcourues sont soit directement imputables à la larve soit indirectement (les changements de couches d'eau la soumettent à des changements de courants) soit totalement aléatoires fonction du milieu extérieur. La combinaison migration passive/active est donc difficile à appréhender d'autant plus qu'elle est fortement troublée par l'homme.

D'un point de vue génétique des populations, la dispersion larvaire, composante du flux génique, amène à plusieurs notions dont une majeure : l'homogénéité génétique. Le flux génique est une force conservatrice le plus souvent supérieure à la sélection et la dérive (Buroker, 1984). Il est généralement suffisamment fort, en absence de divergence historique, pour conduire à la panmixie.

Variabilité des populations :

De nombreux programmes de recherche sur des espèces de bivalves marins à enjeu économique fort (*Mytilus spp.*, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Mercenaria mercenaria*, *Placopecten magellanicus*,...) sont en cours dans le domaine génétique. Une étude comparative des stocks des principaux pays producteurs et des populations naturelles, basée sur des marqueurs génétiques, représente un élément essentiel pour la gestion des ressources génétiques et la compréhension des relations entre espèces, indispensables pour assurer une protection des stocks existants et développer des programmes de transplantation et de sélection. Cette approche permet d'appréhender plusieurs notions :

- les ressources génétiques à l'échelle mondiale,
- les moyens de distinction entre espèces proches,
- la différenciation génétique inter-spécifique,
- la structuration génétique des populations au niveau intra-spécifique et les flux géniques.

L'estimation de la variabilité globale d'une population peut être représentée par le nombre de combinaisons génotypiques présentes dans cette population. Dans ce cas, plusieurs types d'études sont envisageables, suivant l'outil et le matériel utilisés, et permettent des niveaux résolutifs différents. Les 2 génomes, nucléaire et mitochondrial, sont étudiés et les approches en sont différentes dues à leurs spécificités. En particulier, le génome mitochondrial est une molécule d'ADN circulaire double brin de petite taille présentant le plus souvent une hérédité maternelle, une homoplasie, un taux de mutation plus élevé que le génome nucléaire du aux moindres contraintes exercées par la sélection naturelle et au manque d'enzymes de réparation (Karakousis et Skibinski, 1992).

Chez les bivalves marins, la plupart des études recensées utilisent les allozymes. Elles soulèvent une problématique majeure : la neutralité. Plusieurs études ont montré que la sélection naturelle pouvait agir sur certains loci enzymatiques (Buroker *et al.*, 1979a ; Zouros *et al.*, 1980 ; Hilbish & Koehn, 1985). Son effet est d'autant plus visible sur des populations à effectifs démographiques importants (telles que celles de bivalves marins) pour lesquelles l'action de la dérive est limitée. L'étude la plus importante est celle de Karl et Avise (1992) sur l'huître creuse *Crassostrea virginica*, pertinente du fait de l'utilisation combinée de marqueurs enzymatiques et de marqueurs nucléaires anonymes. Les auteurs concluent à l'action de la

sélection naturelle sur les loci enzymatiques analysés expliquant alors l'uniformité allozymique au regard de la discontinuité des fréquences alléliques nucléaires observées entre les populations Atlantique et Golfe du Mexique.

Un second point, relevé largement dans les études de mollusques, est un déficit en hétérozygotes. La majorité des populations n'est pas à l'équilibre de Hardy-Weinberg et présente des déficits en hétérozygotes communément observés sur des données allozymiques chez les bivalves marins (Singh et Green, 1984 ; Zouros et Foltz, 1984 ; Gaffney, 1994). Les caractéristiques essentielles du cycle de vie des bivalves (populations grandes, fécondité élevée, phase larvaire planctonique) sont néanmoins des conditions idéales à l'état d'équilibre de Hardy-Weinberg. Aucune explication consensuelle n'est, à ce jour, proposée mais elle peut avoir plusieurs origines. Les hypothèses peuvent être classées en 2 types : les effets populationnels (consanguinité, effet Wahlund, sélection) et la non-détection du polymorphisme (aneuploïdie, allèles nuls, artefacts de lecture de gels).

Relation Hétérozygotie-Croissance :

Chez de nombreuses espèces de bivalves marins, une relation positive entre la croissance et l'hétérozygotie aux loci enzymatiques (Foltz et Zouros, 1984) a été démontrée sans connaissance exacte du facteur responsable. C'est le cas notamment chez l'huître creuse *Crassostrea virginica* (Zouros *et al.*, 1980), *Crassostrea gigas* (Fujio, 1982), la moule *Mytilus edulis* (Koehn et Gaffney, 1984), l'huître plate *Ostrea edulis* (Alvarez *et al.*, 1989), la coquille Saint-Jacques *Placopecten magellanicus* (Pogson et Zouros, 1994), la spisule *Spisula ovalis* (David *et al.*, 1995),... Plusieurs explications sont avancées mais aucune n'est unanime. Les allozymes seraient soit directement impliqués dans la relation observée (effet local, superdominance directe), soit marqueurs neutres de mécanismes génétiques eux-mêmes impliqués dans cette relation (effet général, superdominance associative).

2.2. Le modèle biologique : l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*

2.2.1. Systématique

Toutes les études que nous venons de voir soulignent l'originalité du modèle d'étude : les huîtres creuses. Elles se divisent en deux genres : *Crassostrea* présent à l'échelle mondiale et *Saccostrea* dont la répartition est centrée en Australie et Nouvelle-Zélande. A l'intérieur du

genre *Crassostrea*, une vingtaine d'espèces ont été décrites parmi lesquelles *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*, deux espèces aux enjeux économiques majeurs. La première classification présentait l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* et l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* comme deux entités taxinomiques différentes élevées au rang d'espèce. *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* ont été décrites respectivement par Thunberg en 1793 et Lamarck en 1819. La définition en deux espèces s'est faite surtout sur la distinction de leur répartition géographique. De nombreuses études, des années 1970 (His, 1972) jusqu'aux plus récentes (Boudry *et al.*, 1998) insistent sur leurs grandes homologues biologiques et assignent l'huître creuse japonaise et portugaise en une seule et unique espèce. Cette notion sera détaillé ultérieurement mais elle est impérative pour la suite du rapport.

Règne animal

Invertébré

Embranchement :

Mollusque

Classe :

Bivalve - Lamelibranche

Ordre :

Filibranche

Sous-Ordre :

Anisomyaria

Super-Famille :

Oestreoidea

Famille :

Crassostreidea

Genre :

Crassostrea

Espèce :

Crassostrea gigas, Crassostrea angulata



Figure 1. Photographie de *Crassostrea gigas*

2.2.2. Historique ostréicole

La façade atlantique-nord et notamment le littoral français a longtemps été le lieu privilégié d'importants gisements naturels d'huîtres plates *Ostrea edulis*. Ils ont été, pendant des siècles, intensément exploités par simple pêche. Les premiers arrêtés, visant à limiter les récoltes et la surexploitation des gisements pendant la période reproductrice, datent de 1750. Pourtant l'intensification de l'effort de pêche a contribué au déclin des gisements d'huîtres plates, affaiblis par des épisodes de mortalités. Les plus importants ont eu lieu en 1920 et à la fin des années 1960 et 1970 avec respectivement l'apparition des parasites *Marteilia refringens* (protozoaire parasite du système digestif) et *Bonamia ostreae* (protozoaire parasite des cellules sanguines). En 1868, le bateau "Le Morlaisien", transportant des huîtres creuses *Crassostrea angulata* en provenance des côtes du Portugal, s'est réfugié dans l'estuaire de la Gironde au cours d'une tempête l'obligeant à rejeter sa cargaison à la mer. L'expansion de l'huître creuse *Crassostrea angulata* fut ensuite très rapide. Elle domine sur le littoral français (avec une limite Nord dessinée par la Vilaine) jusqu'en 1971, date de sa disparition due à la "maladie des branchies". C'est une infection virale engendrée par un agent pathogène de type iridovirus. Pour faire face à cette disparition, l'huître japonaise *Crassostrea gigas* a été introduite en France. Les stocks importés proviennent du Japon et du Canada (Grizel et Héral, 1991). Son expansion a été très importante, aidée par l'absence de compétiteur pour les ressources trophiques, l'huître portugaise étant restreinte au sud de l'Europe au moment de l'importation massive, et les stocks d'huîtres plates *Ostrea edulis* ayant fortement diminués. La figure 2 retrace l'ensemble de l'historique ostréicole français du 20ème siècle dans lequel chaque taxon affiche une importance économique majeure. Il faut signaler que *Crassostrea gigas* représente aujourd'hui 86% de la production mondiale d'huîtres (données FAO, 1995).

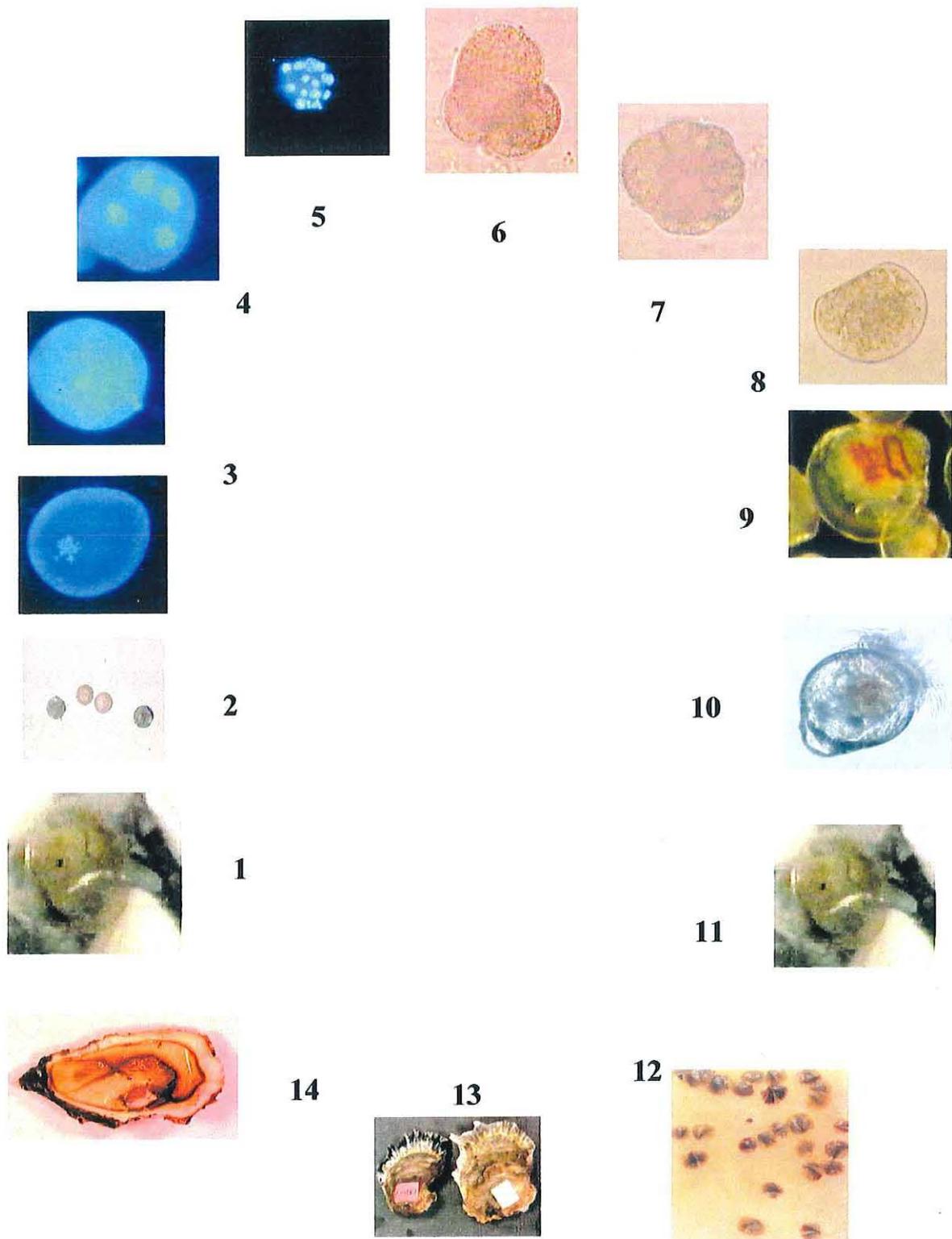


Figure 3. Cycle de développement de *Crassostrea gigas*.

1. Ovocyte en cours de maturation 2, 3 et 4 Ovocyte mature 5. Embryon stade 4 cellules 6. Embryon stade 16 cellules 7. Embryon stade Morula 8. Larve stade D (J8) 9 et 10 Larve J13 11. Larve stade pédiveligère 12. Postlarves fixées sur plaque PVC 13. Juvéniles (6 mois) 14. Géniteur mature

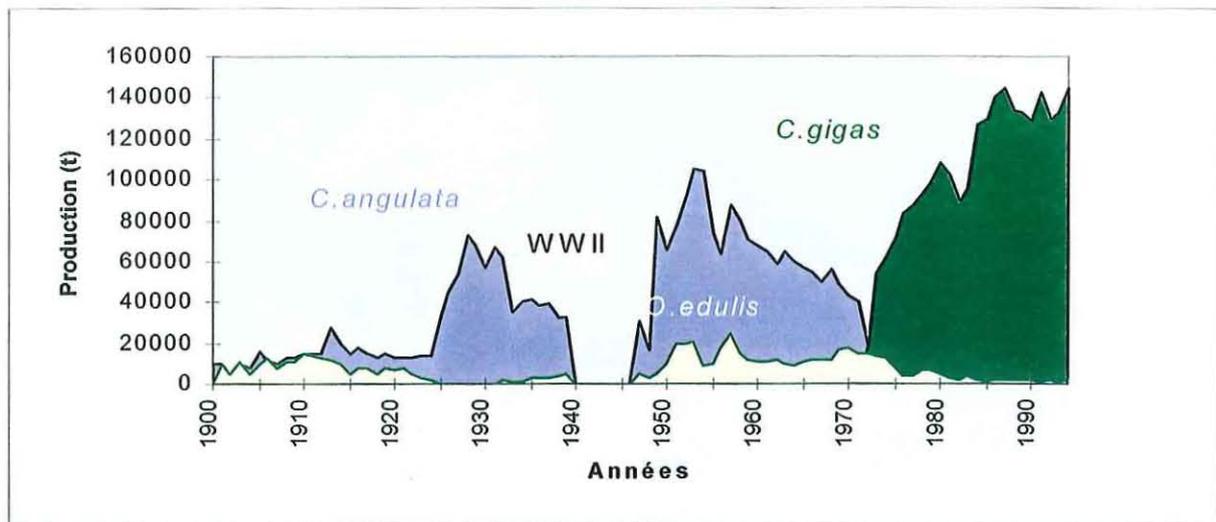


Figure 2. Production ostréicole en France depuis le début du siècle (D'après Gouletquer & Héral, 1997)

2.2.3. Etat actuel des connaissances

Approche écologique et physiologique

Crassostrea gigas a un habitat infralittoral. On peut la localiser jusqu'à 15 mètres de profondeur fixée sur des fonds meubles ou durs. Elle est ovipare, c'est-à-dire que les mâles et les femelles libèrent leurs gamètes laissant les rencontres et la fécondation se faire dans le milieu marin. La fécondité est très élevée puisqu'une femelle peut pondre plusieurs dizaines de millions d'ovocytes et compense la forte mortalité larvaire (assimilable à une stratégie de type r de MAC ARTHUR et WILSON). La phase larvaire dure entre 15 et 20 jours suivant la température extérieure. La ponte a lieu l'été, la reprise de la gamétogénèse est déclenchée par des facteurs extérieurs en particulier la température de l'eau mais aussi le niveau trophique et éventuellement le rythme photopériodique. Le déterminisme de la reproduction est un hermaphrodisme alternatif. En théorie, l'orientation durant la première saison reproductrice est communément mâle suivie d'une alternance femelle/mâle. Le cycle de vie est représenté sur la figure 3.

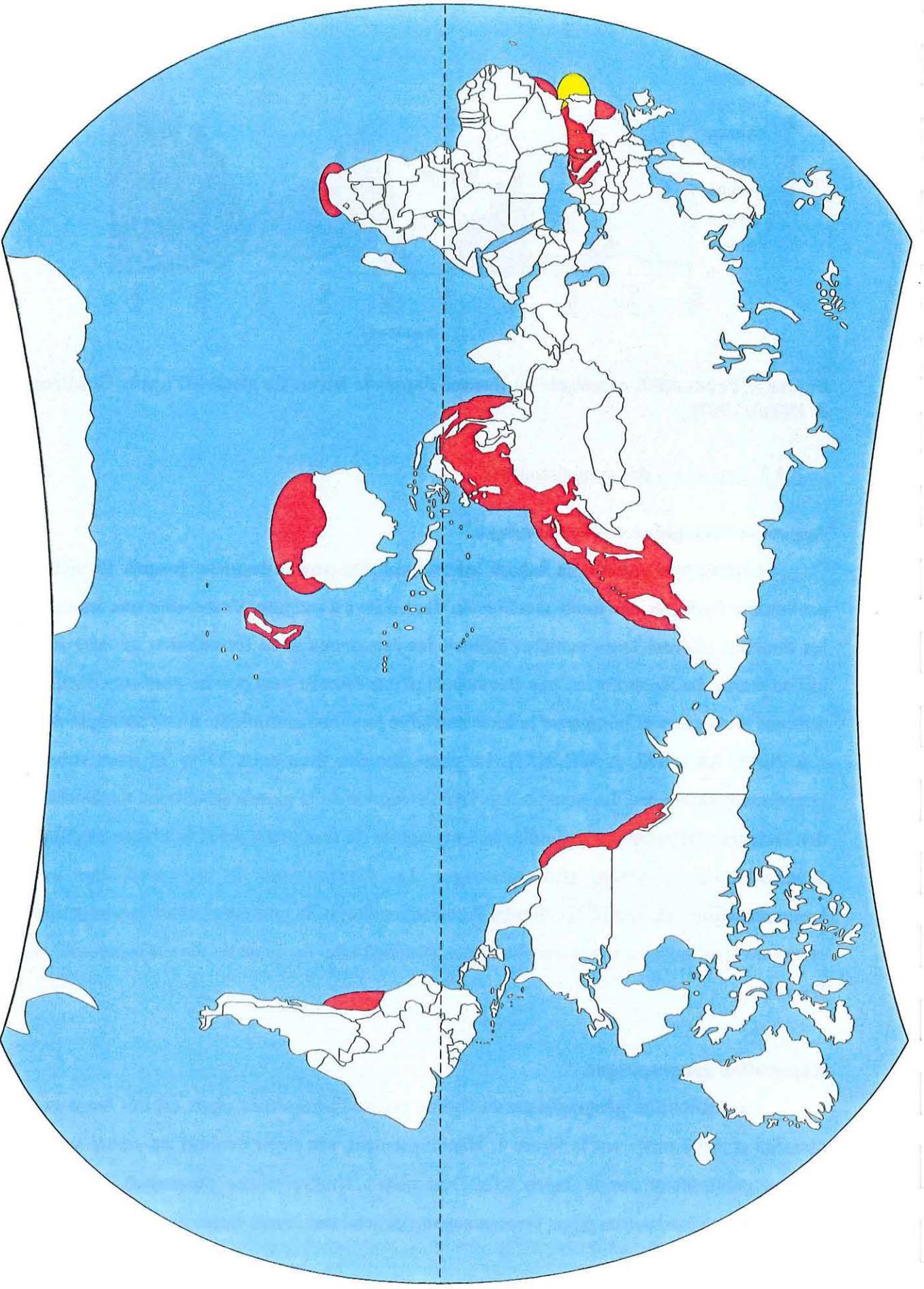
Répartition géographique

La distribution géographique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est très large au plan mondial et représentée sur la figure 4. Historiquement, son foyer évolutif est centré sur l'Asie et plus précisément sur le Japon (d'où son nom : l'huître creuse japonaise). Les qualités reconnues de *Crassostrea gigas* (croissance rapide, résistance aux fortes turbidités et aux

Figure 4. Répartition géographique mondiale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

■ *Crassostrea gigas*

■ *Crassostrea angulata*



variations de températures) ont conduit à son introduction dans de nombreuses régions du monde (Coleman, 1986 ; Grizel, 1996). Elle est maintenant présente en Europe, aux Etats-Unis, au Cap en Afrique du Sud, en Tasmanie, en Nouvelle-Zélande (Smith *et al.*, 1986). *Crassostrea angulata* est présente naturellement sur les côtes de l'Europe du Sud (Espagne, Portugal) et au Nord de l'Afrique, précisément centrée sur le détroit de Gibraltar. Elle avait été définie, en premier lieu, comme une espèce distincte du fait de cette opposition géographique.

Approche génétique

De nombreux programmes de recherche en génétique sont en cours sur l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*. Des études de caryotypage de l'huître creuse japonaise révèlent les 10 paires de chromosomes ($2n=20$) (Thiriote-Quievreux et Ayraud, 1982 ; Thiriote-Quievreux, 1986). Aucun hétéromorphisme sexuel n'a été observé. Seules quelques différences de structure entre chromosomes (position des centromères) permettent des distinctions entre espèces proches.

Il faut noter que ce modèle comporte quelques caractéristiques importantes à prendre en compte en génétique des populations. L'intervention humaine modifie la notion de populations naturelles. Les nombreuses transplantations et importations, l'introduction volontaire ou accidentelle (exemple : *Crassostrea gigas* en Nouvelle-Zélande (Smith *et al.*, 1986)) modifie voire efface l'impact des processus migratoires naturels. Le terme de population naturalisée conviendrait mieux dans bien des cas à celui de population naturelle, seulement pertinent pour des échantillonnages issus de populations indemnes de l'activité humaine. Il faut aussi nuancer la notion de structuration des populations, difficile à interpréter du fait des caractéristiques données précédemment, et entrevoir plus précisément un aspect de différenciation génétique.

Il est nécessaire de compiler l'ensemble des études de génétique des populations portant sur l'espèce *Crassostrea gigas* en respectant une discrimination suivant l'outil utilisé. En premier lieu, une revue bibliographique sera développée sur les résultats obtenus avec des marqueurs allozymiques. Une vingtaine d'études examinent les niveaux de variabilité et de différenciation entre populations de *Crassostrea gigas*. Je rappelle que nous considérons *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas* comme appartenant à la même espèce.

Buroker *et al.* (1979a, 1979b) ont les premiers étudié le polymorphisme de gènes enzymatiques chez l'huître creuse japonaise en 1979. Sur 11 systèmes enzymatiques, 8 loci se

sont révélés polymorphes. Ils présentent au moins 2 allèles dont l'allèle le plus faiblement représenté dans l'espèce atteint au moins une fréquence de 5%. Leur but initial (non atteint) était de caractériser un polymorphisme associé à une résistance ou plutôt tolérance accrue à des maladies telles une vibriose. L'analyse de populations par Aat-2, Adk-1, Est-2, Lap-1b, Mp-1, Pgm, Phi, Sdh a révélé des différences significatives (test χ^2) entre populations. Buroker *et al.* les attribuent à 3 loci Adk-1, Lap-1b et Sdh pour lesquels ils supposent soit une mauvaise visualisation dans leurs manipulations (loci Adk-1, Sdh) soit un phénomène génétique sélectif par mortalité différentielle (Lap-1b).

La même année, Fujio(1979) publie une étude avec 5 loci allozymiques (IDH, PGM, GPI, AAT, LAP). Son échantillonnage s'échelonne sur toute la côte Est du Japon suivant une direction Nord-Sud. Le but de son travail était l'examen des 4 "races" de *Crassostrea gigas* décrites par Imai et Sakai en 1961 sur des critères morphologiques et physiologiques. Fujio conclut à l'existence de populations différenciées le long de la côte Est du Japon avec un groupe Nord Hokkaido, un groupe Sud Kumamoto, et 2 pseudo-groupes sur les côtes de la grande île centrale, Miyagi et Hiroshima. Les 2 derniers présentent des populations "entrecroisées". La cause possible de cette différenciation serait les transplantations ostréicoles. Les fréquences alléliques m'ont permis de recalculer des distances génétiques entre paires de populations, de type Cavalli-Sforza et Edwards (1967), avec le logiciel Phylip. Leurs représentations dessinent un arbre confortant l'analyse de Fujio. Il est fort possible que cette différenciation observée en 1979 sur des populations échantillonnées le long du littoral japonais soient gommées de nos jours. En effet, de nombreux échanges ostréicoles interviennent entre les différentes localités japonaises avec deux origines géographiques privilégiées : la préfecture de Miyagi et celle de Hiroshima (Ogawa, com. pers.).

Récemment, Banks *et al.* (1993) attribuent le groupe Kumamoto à l'espèce *Crassostrea sikamea* en examinant 5 loci enzymatiques. L'existence sympatrique des deux huîtres creuses est connue. Le temps de divergence avec *Crassostrea gigas* serait de l'ordre de 1,5 à 2 millions d'années correspondant au Pléistocène (Banks *et al.*, 1993).

D'autre part, Fujio *et al.* (1979) observent un excès d'hétérozygotes au locus enzymatique Cat. Les 5 loci de sa précédente étude ségrègent conformément à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Il en déduit l'existence d'une sélection balancée maintenue par un avantage sélectif des hétérozygotes. Un tel phénomène fait l'objet de nombreuses études et est toujours controversé (voir paragraphe 2.1.3).

L'étude de génétique des populations par Ozaki et Fujio, en 1985, est réalisée dans le but d'estimer et de comparer la différenciation génétique et la variabilité globale dans les populations japonaises de *Crassostrea gigas*. Elle a été effectuée avec 10 loci enzymatiques sur 5 populations naturelles et 6 cultivées de *Crassostrea gigas*. Leur comparaison possible permet de visualiser un éventuel effet de l'ostréiculture. L'échantillonnage suit toute la côte Est du Japon pour être représentatif des 4 "races" d'huîtres creuses japonaises décrites par Imai et Sakai (1961). Ozaki et Fujio n'observent pas de différence significative entre les populations cultivées quel que soit le site d'élevage. Les individus proviennent du même site pour le recrutement (Miyagi) puis sont dispersés. Il est donc logique qu'il n'apparaisse pas de différence significative. Les populations naturelles présentent un plus faible niveau de différenciation. La distance génétique moyenne (Nei, 1972) entre populations sauvages est de l'ordre de 0.0033 ± 0.0002 . Elle est inférieure à celle obtenue entre populations cultivées (0.0077 ± 0.0015) ainsi qu'entre populations cultivées et sauvages (0.0051 ± 0.0006). L'hétérozygotie moyenne observée et le nombre moyen d'allèles sont respectivement de 0.194 et 26.3 pour les populations cultivées et 0.187 et 26.2 pour les populations sauvages. Il n'apparaît pas de perte de variabilité génétique dans les populations cultivées en regard des populations naturelles. Le recrutement naturel pour les populations mises en culture suffit à l'expliquer. L'observation attendue est l'homogénéité génétique entre la population naturelle et les populations d'élevage recrutées au même site (0.0055).

Une perte de variabilité aurait laissé entrevoir un effet bottleneck ou goulot d'étranglement ou encore effet fondateur. Ces phénomènes correspondent à une réduction drastique du nombre d'individus d'une population. La participation à la génération suivante se fait alors à partir d'un très petit nombre d'individus.

Un exemple de ce phénomène est l'introduction récente (1967-1968) d'huîtres creuses sur les côtes de la Nouvelle-Zélande. L'origine géographique supposée des animaux est le Japon.

Smith *et al.* (1986) ont comparé 2 populations de *Crassostrea gigas* de Nouvelle-Zélande avec une population japonaise sur 8 loci enzymatiques polymorphes. Ils ont observé des différences significatives entre paires de populations à certains loci mais aucun clivage général ne se dégage. Le nombre moyen d'allèles et l'hétérozygotie ne montrent pas de différence significative entre les populations de Nouvelle-Zélande et celle du Japon. La présence d'allèles rares en Nouvelle-Zélande, absents au Japon, permet de rejeter l'hypothèse d'un effet fondateur. Les populations présentes en Nouvelle-Zélande sont issues d'un nombre

suffisant de géniteurs empêchant un phénomène de consanguinité et de dérive génétique. Smith *et al.* concluent également sur les fortes capacités écologiques de *Crassostrea gigas* qu'ils associent à sa forte variabilité génétique. Elle a réussi son installation dans une nouvelle zone colonisée par une autre espèce d'huître creuse *Saccostrea glomerata* et domine, à présent, le littoral néo-zélandais. L'intervention humaine est, dans ce cas, mise en cause pour la migration. Le postulat est le déplacement d'individus sur la coque des bateaux et plus probablement de larves dans l'eau des ballasts. Il faut noter que l'intervention humaine joue un rôle important dans la dynamique des populations des huîtres creuses. La migration et par conséquent le flux génique, définis par l'état planctonique des larves, sont souvent perturbés par des facteurs humains.

L'étude de Liu *et al.* (1995) s'attache à l'aspect naturel de la migration. Sept populations taiwanaises de *Crassostrea gigas* et 2 des îles Penghu, situées à environ une cinquantaine de kilomètres au large de la côte Ouest de Taiwan, sont analysées par 3 loci allozymiques polymorphes. Les populations taiwanaises se localisent en zone de culture alors que l'une des îles Penghu est sauvage. La différenciation génétique entre populations apparaît faible puisque la distance génétique (Cavalli-Sforza et Edwards, 1967) la plus faible est de 0.0015 (entre Dongshi et Budai les deux localités les plus proches, séparées de 10 kilomètres) et la plus forte de 0.045 (entre Yunan et Shunsun, deux localités de Taiwan séparées d'environ 250 kilomètres). Les 2 populations sauvages Penghu présentent, avec les populations Taiwan, des distances intermédiaires. La différenciation génétique limitée entre elles suppose l'existence de flux génique. A noter que Liu *et al.* observent des déficits significatifs en hétérozygotes dans les 7 populations taiwanaises et non dans les 2 autres. Ce phénomène est très fréquent chez les bivalves marins (voir paragraphe 2.1.3). L'hypothèse explicative donnée par les auteurs est une mortalité différentielle dues à des facteurs environnementaux locaux.

La façade atlantique française est totalement colonisée par l'huître creuse japonaise avec une limite nord représentée par la Bretagne. Son introduction remonte à 1971 (Grizel et Héral, 1991) à partir de naissain originaire de Miyagi (Japon) et d'adultes de Colombie britannique eux-mêmes originaires de Miyagi. Il n'existe donc qu'une seule origine géographique pour les populations françaises (voir paragraphe 2.2.2).

Moraga *et al.* (1989) ont échantillonné 16 populations françaises et une population japonaise originaire de Miyagi. L'étude, avec 13 loci enzymatiques, autorise la comparaison de la variabilité génétique entre la population «initiale» et les populations «descendantes» avec 20

ans de divergence allopatrique. Les allèles communs ségrègent, pour chaque locus, aux mêmes fréquences. Deux allèles rares sont présents dans la population Miyagi et absents dans les populations françaises. Les distances génétiques de Cavalli-Sforza et Edwards (1967), calculées entre paires de populations, montrent une faible différenciation génétique avec un minima de 0.014 et un maxima de 0.033. En conclusion, la population japonaise Miyagi ne se différencie pas significativement des populations françaises dont l'origine est commune. Cela suppose l'introduction d'un grand nombre d'individus (Grizel et Héral, 1991), des importations encore existantes ou un manque de temps de séparation pour observer des adaptations à un nouvel environnement. Beaucoup d'auteurs supposent l'existence de phénomènes sélectifs à quelques marqueurs allozymes (voir paragraphe 2.1.3). Dans ce cas, 20 ans de séparation géographique auraient suffi pour observer quelques différences significatives sur au moins un locus enzymatique étudié par Moraga *et al.*(1989). L'hypothèse sélective peut être écartée sur les 13 marqueurs considérés.

Une des dernières études allozymiques sur le statut taxonomique de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* est publiée par Mattiucci et Villani (1983). Elle porte sur 5 populations et 20 loci allozymiques dont 13 sont polymorphes. Leurs conclusions sont qu'il n'y a pas plus de différences (estimées par les distances génétiques de Nei (1972)) entre 2 populations *Crassostrea gigas* qu'entre une population *Crassostrea gigas* et une *Crassostrea angulata*.

Deux articles récents (Boudry *et al.*, 1998 ; O'Foighil *et al.*, 1998) complètent cette problématique avec une nouvelle approche : l'analyse sur l'ADN mitochondrial.

Boudry *et al.* (1998) ont étudié seize populations par PCR-RFLP sur le fragment Cytochrome Oxydase I (COI) de l'ADN mitochondrial. Une matrice de distances entre populations a servi de base à la construction d'un arbre montrant 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...L'appartenance de ces 2 taxons à la même espèce est confirmée par leur proximité génétique, mais ils apparaissent désormais comme deux "races" géographiques distinctes. Les auteurs observent le regroupement des populations portugaises et espagnoles de *C. angulata* avec les populations taiwanaises. L'hypothèse émise, par Boudry *et al.* (1998), est l'origine asiatique des populations Européennes de *C. angulata* confirmée par les résultats obtenus par O'Foighil *et al.* (1998). Leur analyse moléculaire phylogénétique montre un lien génétique fort entre 4 individus *C.angulata* (d'origine portugaise) et des individus *C.gigas*

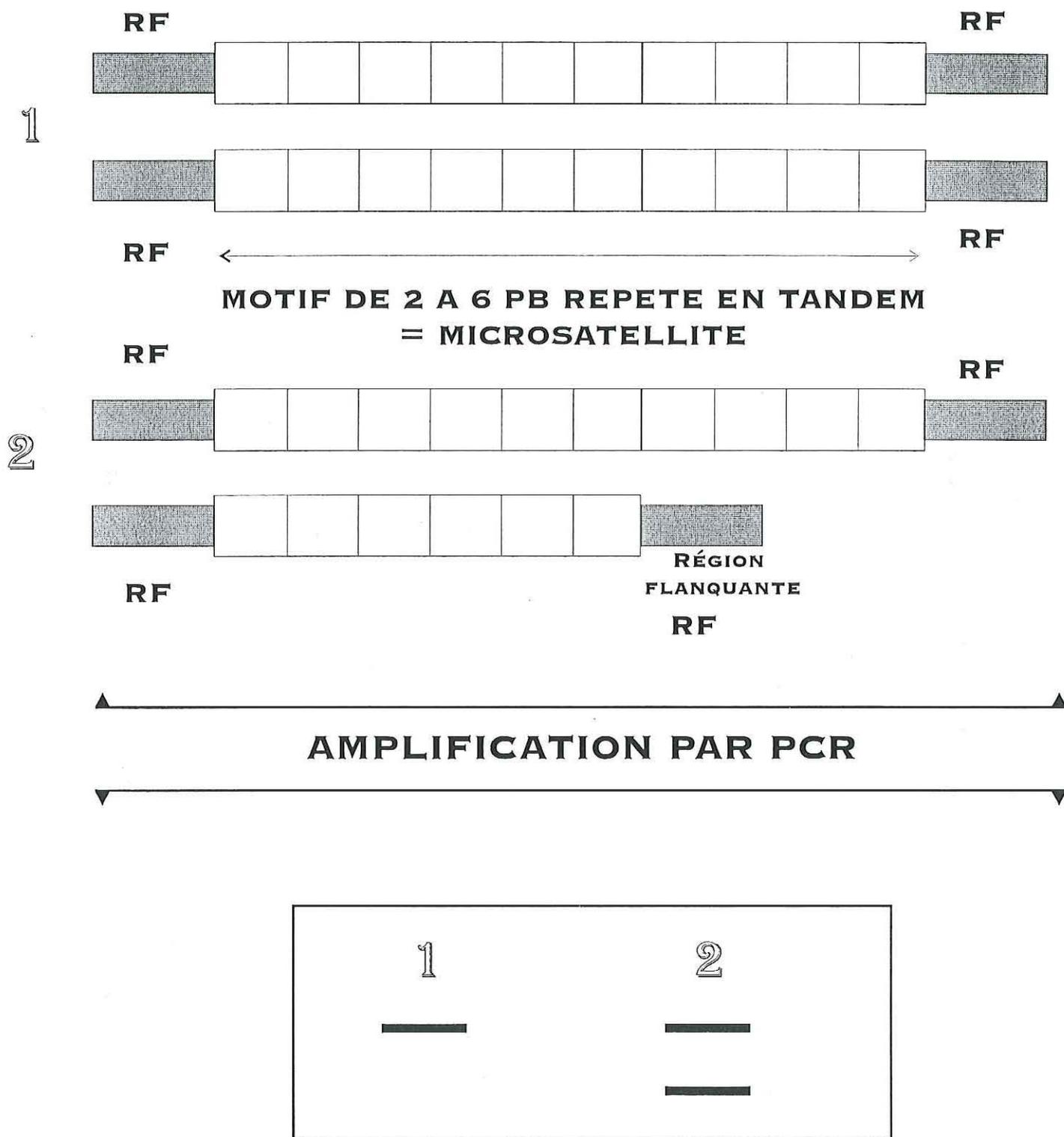


Figure 5. Description schématique d'une séquence microsatellite

grâce au séquençage de 579 paires de bases du fragment Cytochrome Oxydase I de l'ADN mitochondrial.

2.3. Les marqueurs moléculaires

2.3.1. Les microsatellites

L'existence de séquences d'ADN répété dans le génome des Eucaryotes est connue depuis près de 30 ans (Britten et Kohne, 1968). Le nombre et la large distribution de ces éléments répétés ont été découverts dans les années 1980 (Tautz et Renz, 1984). Depuis 1992, les microsatellites sont très utilisés en génétique des populations.

Un marqueur microsatellite (schématisé figure 5) est une séquence d'ADN constituée d'unités nucléotidiques courtes (de 1 à 6 paires de bases) répétées en tandem (Rassman et *al.*, 1991). Un nombre de répétitions correspond à un allèle (témoin de la différence de taille entre allèles), chaque allèle étant séparé d'un autre par une ou plusieurs mutations. Il est admis qu'une mutation survient par un phénomène qualifié de glissement de polymérase. Le modèle de mutation n'est pas encore unanime pour ces marqueurs. Les simulations montrent que les distributions alléliques rencontrées correspondent mieux à un modèle de type SMM (Stepwise Mutation Model) qu'à un modèle IAM (Infinite Allele Model) (Shriver et *al.*, 1993 ; Valdes et *al.*, 1993). Cependant, il a été observé des mutations portant plus d'un motif (Valdes et *al.*, 1993). L'hypothèse actuelle la plus probable semble être le modèle TPM (Two Phase Model) (DiRienzo et *al.*, 1994) qui allie une faible proportion (1-p) du modèle KAM (K Allele Model) avec des mutations vers des états alléliques éloignés à une probabilité de $u/(k-1)$ (u = taux de mutation) et une forte proportion (p) du SMM où un allèle a une probabilité de $u/2$ de muter vers l'état allélique directement supérieur ou inférieur c'est-à-dire seulement séparé d'une répétition. Il se différencie du modèle à nombre fini d'allèles (IAM) admis pour les allozymes. Les études laissent penser que le nombre de répétitions tend à augmenter avec le temps d'évolution mais qu'il existe tout de même une régulation de la taille des loci microsatellites les contraignant à ne pas dépasser une taille "déraisonnable" (Nauta et Weissing, 1996 ; Goldstein et *al.*, 1995).

Les avantages des microsatellites, justifiant leur utilisation grandissante, sont multiples :

- leur présence dans de nombreux génomes animaux et végétaux,
- la neutralité,

- la codominance (distinction des homozygotes et des hétérozygotes),
- le fort taux de polymorphisme (lié au fort taux de mutation de l'ordre de 10^{-4} / 10^{-3}),
- l'analyse par PCR # technique non destructrice
besoin de peu d'ADN et/ou de mauvaise qualité.

Mais quelques problèmes, surtout d'ordre pratique, limitent tout de même l'utilisation de ces marqueurs :

- caractérisation longue (par clonage et séquençage),
- présence d'allèles nuls interférant dans l'analyse des données (Pemberton et *al.*, 1995),
- modèle de mutation non admis et différent de celui des allozymes,
- nombre d'allèles souvent très élevé limitant l'accès à certains logiciels de traitement de données,
- coût d'analyse élevé.

2.3.2. Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction (RFLP)

Ce sont les premiers polymorphismes découverts sur l'ADN génomique grâce à la technique du Southern (1978) et correspondant à des variations individuelles de la séquence de l'ADN. Ils révèlent des variations ponctuelles touchant un site de restriction d'une enzyme de restriction donnée. Une enzyme de restriction coupe en un site spécifique de l'ADN par la reconnaissance d'une séquence de 4 à 6 pb (paires de bases). L'utilisation d'une enzyme à 4 pb offre une possibilité plus grande de découvrir des sites de coupure. Un exemple: le site ADN reconnu par *TaqI* est défini par l'enchaînement de TCGA. Les différences apparaissent donc entre individus dans la taille des fragments de restriction obtenus avec un couple enzyme/sonde donné. Cette technique a été grandement facilitée par la méthode PCR (paragraphe 3.1.2) en permettant un gain de temps et financier. En connaissant les séquences encadrant un site de restriction, on peut définir les amorces amplifiant par PCR la région cible. Le polymorphisme est alors directement analysable par simple électrophorèse de ce produit PCR digéré par une enzyme.

Leurs avantages des marqueurs obtenus par PCR-RFLP sont d'être codominants, le plus souvent neutres puisque leurs localisations sont majoritaires dans de l'ADN non codant, facilement utilisables et facilement décelables puisque actuellement 500 enzymes de

Tableau 1 Populations échantillonnées

| <i>Population</i> | <i>Taxon</i> <i>prédéterminé</i> | <i>Descriptif (lieu de prélèvement)</i> | <i>Effectif</i> | <i>notes</i> |
|-------------------|-------------------------------------|---|----------------------|--------------|
| 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 | <i>C.angulata</i> | Cadix , Chiclana de la Frontera, 150 km au sud de Faro, Espagne | 50 | |
| SET | <i>C.angulata</i> | Setubal , 20 km au sud de Lisbonne, Portugal | 13 | |
| TAH | <i>C.angulata</i> | Tahaddart , 340 km au nord de Casablanca, Maroc | 16 | |
| KEE | <i>C.gigas</i> | Keelung , Sud de Taiwan | 30 | |
| CHU | <i>C.gigas</i> | Chungmu , Corée du Sud | 50 | |
| OUA | <i>C.gigas</i> | Lagune de Oualidia , 175 km au sud de Casablanca, Maroc | 45 | |
| VEN | <i>C.gigas</i> | Venise , Italie | 39 | |
| BAN | <i>C.gigas</i> | Bangor , Pays de Galle, GB (population d'écloserie) | 41 | |
| ROZ | <i>C.gigas</i> | Anse du Roz , Rade de Brest, France | 50 | |
| ARC | <i>C.gigas</i> | Arcachon , France | 50 | |
| SEU | <i>C.gigas</i> | Anse de la Seudre , La Tremblade, France | 49 | |
| MIR | <i>C.angulata</i> | Rio Mira, Portugal | 30 | |
| KAO | <i>C.gigas</i> | Tungkang , Taiwan | 40 | |
| BOU | <i>C.gigas</i> | Vieux-Boucau , Landes, France | 50 | |
| TAL | <i>C.gigas</i> | Talmont , estuaire de la Gironde, France | 50 | |
| PLI | <i>C.gigas</i> | Chine (côte Est) | 40 | |
| OGA | <i>C.gigas</i> | Hiroshima, Japon | 50 | |
| FLO | <i>C.angulata</i> , vivantes | Canio Sancti Pietri , Espagne | ≅ 100 + 50 alcool | Crt |
| GOF | <i>C.gigas</i> | Tavira, Sud du Portugal | 25 | Crt |
| BAN | <i>C.gigas</i> | Population d'écloserie, Conwy (Bangor), Pays de galle | 50 | |
| BOR | <i>C.gigas</i> | Corée du Sud | 34 | |
| HWA | <i>C.gigas</i> | Corée du Sud | 31 | |
| TAÏ | Cg, vivantes | Taiwan | ≅ 45 + 37 alcool | Crt |
| HIR | Cg, vivantes | Hiroshima , Japon | ≅ 150 + 35 alcool | Crt |
| GEN | <i>C.gigas</i> | Géniteurs pour les croisements, Marennes-Oléron, France | 40 | Crt |
| BAY | <i>C.gigas</i> | Bayonne, sud de la France | 60 | |
| TAV | Ca/Cg ? | Tavira, sud du Portugal (Legoff) | 50 | |
| PIT | <i>C.gigas</i> | Pitwater, sud de Hobart, Tasmanie | 32 | |
| DER | <i>C.gigas</i> | D'Entrecasteaux bay, Sud de Hobart, Tasmanie | 52 | |
| SMI | <i>C.gigas</i> | Swithton, Nord Ouest Tasmanie | 52 | |

Crt = animaux utilisés pour les croisements d'avril 1998

restriction sont connues.

III. Résultats 1998

3.1. Caractérisation moléculaire des populations de *Crassostrea gigas*

3.1.1. Echantillonnage

L'ensemble des populations disponibles au laboratoire est répertorié dans le tableau 1 dans lequel est précisé la localisation géographique et le nombre d'individus. L'échantillonnage comprend actuellement 31 populations. Il faut noter que la détermination du taxon est réalisée par des scientifiques de la région d'échantillonnage sur des critères taxinomiques et historiques mais non génétiques.

Les échantillons reçus au laboratoire sont de 2 types : des fragments de branchies conservés dans de l'alcool (18 populations) ou des animaux vivants qui sont mis en élevage en quarantaine au laboratoire puis biopsés (8 populations). Les fluctuations du nombre d'individus entre populations sont dues aux difficultés d'échantillonnage.

Celui-ci devra être complété afin d'élargir le plus possible l'étude des ressources génétiques chez *Crassostrea gigas*. Le but est d'échantillonner des populations centrées sur 2 zones géographiques bien déterminées afin d'obtenir une représentation fine et précise du complexe *Crassostrea gigas* / *Crassostrea angulata* en Europe et en Asie. Nous avons besoin de populations espagnoles et portugaises (Nord Portugal) ainsi que taiwanaise (Nord Taiwan), japonaises et originaires des îles entre le Japon et Taiwan. Cet échantillonnage nous permettrait de disposer d'un cline géographique dans les deux zones où coexistent les 2 taxons d'huîtres creuses. La sympatrie de ces 2 huîtres reste à prouver et l'existence d'un cline ou d'une zone hybride à affirmer ou infirmer. Le problème majeur est la difficulté de développer des contacts en Asie (au Japon notamment) susceptible de nous fournir le matériel biologique dont nous avons besoin.

3.1.2. Les outils moléculaires

Extraction d'ADN :

Les prélèvements non destructifs de fragments de branchies sur huîtres vivantes (anesthésiées par du chlorure de magnésium permettant l'ouverture des deux valves) suffisent à l'extraction d'ADN réalisée à l'aide de deux méthodes : Phénol/Chloroforme (décrite par

Moore, 1993) ou Chélex (Estoup et *al.*, 1996). L'utilisation de la méthode Phénol/Chloroforme est, au final, préférable. Les résultats sont beaucoup plus fiables et constants même si le gain de temps avec la méthode Chélex est important et malgré la forte toxicité des produits phénol et chloroforme.

L'ADN des individus des populations citées dans le tableau 1 est déjà extrait. Les extractions sont réalisées au fur et à mesure des collectes de nouveaux échantillons.

La Polymérase Chain Reaction (PCR) :

La PCR est une réaction d'amplification en chaîne mise au point par K. MULLIS en 1986. Elle permet l'amplification élective de fragments d'ADN par réplication de la séquence située entre les bornes des zones d'hybridation des amorces. Ces amorces oligonucléotidiques ont été construites après connaissance d'une séquence d'amorçage. La PCR suit un cycle strict de travail :

- **dénaturation initiale** : 5 minutes à 94°C
 - **cycle de PCR** :
 - . dénaturation : 1 minute à 94°C
 - . hybridation des amorces ou annealing : 1 minute à une température spécifique à chaque couple d'amorces d'un locus donné variant suivant leur longueur et leur composition.
 - . élongation : 1 minute 45 secondes à 72°C.
- Ce cycle est répété 30 fois et conduit à une amplification exponentielle du fragment sélectionné.
- **élongation finale** : 5 minutes à 72°C.

RFLP sur l'ADN mitochondrial :

L'obtention d'amorces permettant l'amplification de fragments de l'ADN mitochondrial a été menée à partir des données disponibles dans la littérature. Le fragment amplifié (de 710 paires de bases) est de l'ADN mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase C de la sous-unité I (Folmer *et al.*, 1994). Ces amorces sont communes à 80 espèces d'invertébrés.

Les produits d'amplification des fragments mitochondriaux sont directement digérés par les différentes enzymes de restriction. 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 2).

Tableau 2. Caractéristiques des 4 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>MseI</i> | TTAA | 37°C |
| <i>HhaI</i> | GCGC | 37°C |

Le protocole expérimental est celui développé par Boudry *et al.* (1998). Le contrôle des amplifications PCR ainsi que la séparation des fragments digérés sont réalisés sur gel d'agarose à 1% horizontal. Ces fragments sont visualisés sur table U.V. après coloration au bromure d'éthidium.

Les microsatellites :

L'examen des individus est réalisé avec 3 marqueurs microsatellites (CG44, CG49, CG108) mis au point par l'équipe grecque de E. Zouros (Institute of Marine Biology of Crete) et un quatrième marqueur L10 dont la séquence est fournie par l'équipe de F. Bonhomme (laboratoire Génome et Populations). Les données concernant ces 3 premiers marqueurs ainsi que leur utilisation sont répertoriées dans l'article de Magoulas *et al.* (1998). La séparation des fragments digérés est réalisée sur gel d'acrylamide 8% vertical. 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.

3.1.3. Traitement statistique des données

Le traitement des données est réalisé avec les logiciels suivants : Genetix version 3.0 (Belkhir *et al.*, 1996) et Genepop version 3.1 (Raymond et Rousset, 1995) pour le calcul des F-statistiques ; Phylip et Treeview (Page, 1996) pour la réalisation de l'arbre de distances par la méthode de "neighbor-joining" (Saitou et Nei, 1987).

Un test non paramétrique de Wilcoxon (proche du test U de Mann-Whitney (Sokal et Rohlf, 1995)) est réalisé sur les distributions des fréquences alléliques dans les haplotypes A et C.

3.1.4. Résultats

3.1.4.1. Marqueurs mitochondriaux

L'ensemble des populations étudiées par les marqueurs microsatellites avaient été au préalable analysées, sur une dizaine d'individus, par PCR-RFLP sur le fragment COI de l'ADN mitochondrial afin de déterminer l'appartenance taxonomique de chaque individu (Boudry *et al.*, 1998).

La totalité des dix populations (tableau 3) a ensuite été analysée avec cette même méthode. Les six haplotypes mis en évidence ont été précédemment décrits par Boudry *et al.* (1998). Les fréquences des haplotypes par population sont données dans le tableau 3. Deux haplotypes majeurs A et C caractérisent respectivement les populations *C.angulata* et taiwanaises et les populations *C.gigas*.

Tableau 3. Fréquences des haplotypes COI 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* résumé en une lettre majuscule.

| pays d'origine | Population | Taxon | N | Haplotypes | | | | | |
|----------------|--------------|-------------------|----|------------|------|------|------|------|------|
| | | | | A | B | C | D | E | J |
| | | | | ccab | cdab | dcad | dcab | dcbd | acab |
| France | Seudre | <i>C.gigas</i> | 49 | | | 0.98 | | 0.02 | |
| | Arcachon | <i>C.gigas</i> | 50 | | | 0.98 | | 0.02 | |
| | Vieux-Boucau | <i>C.gigas</i> | 49 | 0.08 | | 0.90 | | 0.02 | |
| | Bayonne | <i>C.gigas</i> | 22 | | | 1 | | | |
| Japon | Hiroshima | <i>C.gigas</i> | 49 | | | 0.96 | | 0.04 | |
| Taiwan | Keelung | <i>C.gigas</i> | 30 | 0.88 | 0.04 | | | | 0.08 |
| | Tungkang | <i>C.gigas</i> | 40 | 0.90 | 0.08 | | | | 0.02 |
| Portugal | Ria Formosa | <i>C.angulata</i> | 35 | 0.86 | 0.03 | 0.11 | | | |
| | Rio Mira | <i>C.angulata</i> | 30 | 1 | | | | | |
| Spain | Cadiz | <i>C.angulata</i> | 50 | 0.96 | 0.02 | | | 0.02 | |

Les travaux en cours sont de 2 types : compléter les analyses par marqueurs mitochondriaux des populations déjà étudiées pour atteindre le niveau d'échantillonnage obtenu dans les

Tableau 5. Polymorphisme intra-population

| pop | CG44 | | | CG108 | | | CG49 | | | L10 | | |
|------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|------|
| | nb all | Ho | He | nb all | Ho | He | nb all | Ho | He | nb all | Ho | He |
| RFAG | 24 | 0,857 | 0,942 | 23 | 0,823 | 0,935 | 25 | 0,411 | 0,939 | 27 | 0,971 | 0,94 |
| CAD | 21 | 0,54 | 0,906 | 28 | 0,8 | 0,948 | 33 | 0,96 | 0,957 | 33 | 0,857 | 0,95 |
| SET | 12 | 0,692 | 0,896 | 13 | 0,769 | 0,887 | 11 | 0,545 | 0,892 | 17 | 1 | 0,91 |
| KEE | 26 | 0,766 | 0,944 | 26 | 0,966 | 0,943 | 26 | 0,666 | 0,942 | 30 | 0,896 | 0,94 |
| TAH | 27 | 0,875 | 0,908 | 32 | 0,937 | 0,918 | 33 | 0,4 | 0,904 | 37 | 1 | 0,93 |
| OUA | 14 | 0,571 | 0,942 | 15 | 0,822 | 0,955 | 30 | 0,727 | 0,956 | 27 | 1 | 0,96 |
| BAN | 26 | 0,658 | 0,879 | 33 | 0,756 | 0,887 | 33 | 0,575 | 0,937 | 38 | 0,951 | 0,94 |
| ROZ | 30 | 0,7 | 0,943 | 28 | 0,791 | 0,948 | 36 | 0,775 | 0,963 | 35 | 0,755 | 0,96 |
| VEN | 23 | 0,631 | 0,949 | 38 | 0,891 | 0,947 | 30 | 0,714 | 0,949 | 37 | 0,871 | 0,94 |
| ARC | 27 | 0,88 | 0,943 | 27 | 0,8 | 0,954 | 30 | 0,836 | 0,938 | 31 | 0,98 | 0,96 |
| CHU | 15 | 0,38 | 0,904 | 16 | 0,869 | 0,960 | 15 | 0,765 | 0,951 | 20 | 0,84 | 0,95 |
| SEU | 30 | 0,791 | 0,943 | 34 | 0,755 | 0,955 | 35 | 0,652 | 0,948 | 40 | 0,918 | 0,96 |

nb all=nombre total d'allèles par population et par locus, Ho=hétérozygotie observée, He=hétérozygotie attendue

analyses microsatellites, et intégrer les populations nouvellement reçues à cette même étude au fur et à mesure de leur collecte. Toutes les populations figurant dans le tableau 1 sont soit analysées soit en cours d'analyse et seront ensuite intégrées dans les traitements statistiques des données collectées par Boudry et *al.* (1998).

3.1.4.2. Marqueurs microsatellites :

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 Fit.

On constate une grande variabilité (tableau 4) 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 4. Données 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 |

Variabilité intra-population

- **Variabilité** : Le tableau 5 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. He (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 (CG44) et un maximum de 31 (L10). La population CHU (Corée du Sud) 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).

- **Conformité à Hardy-Weinberg** : L'indice F_{is} (tableau 6) de Weir et Cockerham (1984), dérivé du F de Wright (1951) mesurant les écarts à Hardy-Weinberg de chaque population, est calculé à partir de l'hétérozygotie observée et attendue (tableau 5).

Table 7. Matrice de FST (Weir et Cockerham, 1984) par paires de populations et test statistique

| Population | N | RFA | CAD | SET | KEE | TAH | OUA | BAN | ROZ | VEN | ARC | CHU | SEU |
|------------|----|-----|------------|--------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|------------|
| RFAG | 35 | 0 | 0.01504 ** | 0.0019 | 0.0054 | 0.0075 | 0.0137 ** | 0.0368 ** | 0.0141 ** | 0.01535 ** | 0.02424 ** | 0.0209 ** | 0.01869 ** |
| CAD | 50 | | 0 | 0.0113 | 0.00735 | 0.0192 ** | 0.0181 ** | 0.041 ** | 0.023 ** | 0.0164 ** | 0.03253 ** | 0.022 ** | 0.02679 ** |
| SET | 13 | | | 0 | | 0.0058 | 0.0213 ** | 0.041 ** | 0.0236 ** | 0.022 ** | 0.0316 ** | 0.027 ** | 0.0231 ** |
| KEE | 30 | | | | 0 | 0.0167 ** | 0.0121 ** | 0.034 ** | 0.0139 ** | 0.0116 ** | 0.01857 ** | 0.0181 ** | 0.01878 ** |
| TAH | 16 | | | | | 0 | 0.0149 ** | 0.044 ** | 0.0123 | 0.0142 | 0.026 ** | 0.0211 ** | 0.0178 ** |
| OUA | 45 | | | | | | 0 | 0.0214 ** | 0 | 0.0056 | 0.0102 ** | 0.0086 ** | 0.007 ** |
| BAN | 41 | | | | | | | 0 | 0.0252 | 0.028 ** | 0.0303 ** | 0.0263 ** | 0.0261 ** |
| ROZ | 50 | | | | | | | | 0 | 0.00082 ** | 0.007 ** | 0.0006 ** | 0.0045 |
| VEN | 39 | | | | | | | | | 0 | 0.0085 ** | 0.0170 ** | 0.008 ** |
| ARC | 50 | | | | | | | | | | 0 | 0.0141 ** | 0.0023 |
| CHU | 50 | | | | | | | | | | | 0 | 0.0136 ** |
| SEU | 49 | | | | | | | | | | | | 0 |

La significativité des valeurs observées de Fst est évaluée par permutations (1000) sur les génotypes.

Tableau 6. Fis de Weir et Cockerham (1984) et significativité

| POP | Localité | CG44 | CG108 | CG49 | L10 |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Fis W&C | Fis W&C | Fis W&C | Fis W&C |
| RFAG | Faro | 0,105 * | 0,134 * | 0,572 *** | -0,013 NS |
| CAD | Cadix | 0,413 *** | 0,166 *** | 0,007 NS | 0,118 *** |
| SET | Setubal | 0,265 ** | 0,172 * | 0,429 *** | -0,054 NS |
| KEE | Keelung | 0,205 ** | -0,008 NS | 0,308 ** | 0,073 * |
| TAH | Tahaddart | 0,069 NS | 0,011 NS | 0,581 *** | -0,039 NS |
| OUA | Oulidia | 0,404 *** | 0,15 *** | 0,25 *** | -0,027 NS |
| BAN | Bangor | 0,263 *** | 0,16 ** | 0,398 *** | 0,009 NS |
| ROZ | Brest | 0,267 *** | 0,176 *** | 0,205 *** | 0,225 *** |
| VEN | Venise | 0,347 *** | 0,073 * | 0,262 *** | 0,091 NS |
| ARC | Arcachon | 0,077 *** | 0,172 *** | 0,12 *** | -0,006 NS |
| CHU | Chungmu | 0,587 *** | 0,106 * | 0,173 *** | 0,133 * |
| SEU | Seudre | 0,171 ** | 0,22 *** | 0,322 *** | 0,058 NS |

Fis W&C=Fis selon Weir et Cockerham (1984) ; quand $P \geq 0,05$ NS non significatif, quand $P < 0,05$ * significatif, $P < 0,01$ ** très significatif, $P < 0,001$ *** hautement significatif.

Le Fis est quasiment toujours positif révélant un déficit en hétérozygotes significatif dans 11, 10, 11 et 4 populations respectivement aux loci CG44, CG108, CG49 et L10. De plus, les déficits observés au locus L10 sont beaucoup moins forts qu'aux autres loci. La valeur maximale de Fis à ce locus est 0,225 alors qu'il peut atteindre 0,58 (populations CHU et TAH respectivement aux loci CG44 et CG49).

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 (tableau 7). Les F_{st} entre populations *Crassostrea gigas* (sans KEE) et *Crassostrea angulata* sont tous significatifs. Les populations européennes de *Crassostrea angulata* et Taiwan présentent pour la plupart des valeurs soit faiblement significatives soit non significatives. La population Tahaddart (*C. angulata*) montre une valeur significative avec l'autre population marocaine (Oualidia,

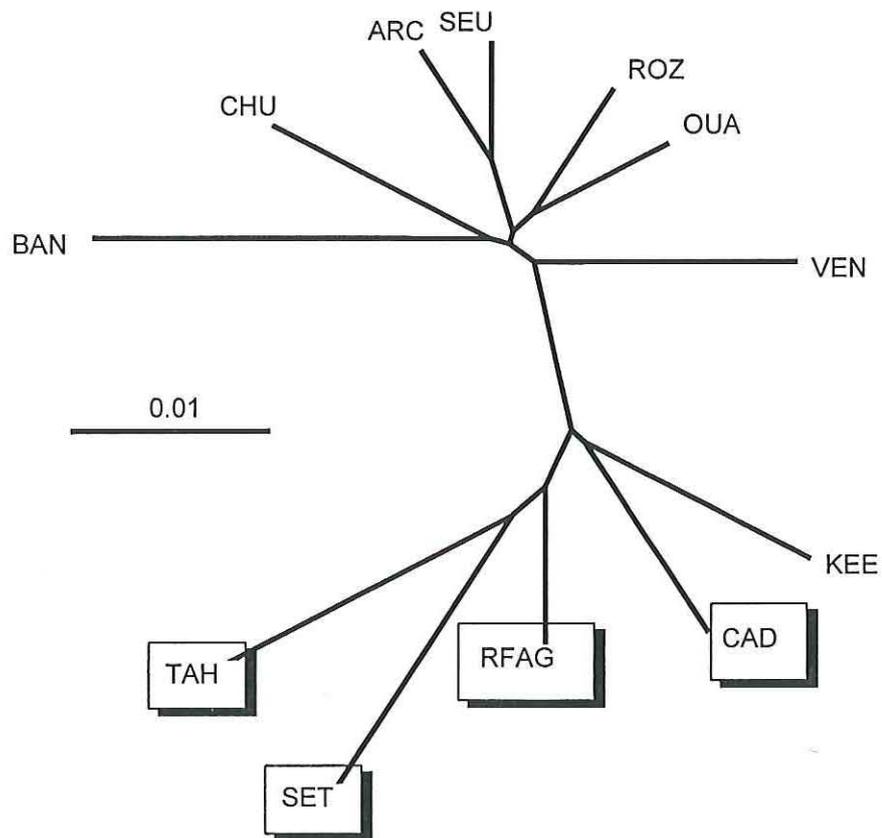


Figure 6. Arbre obtenu par neighbor-joining à partir des données microsatellites.

Les populations encadrées sont des populations *Crassostrea angulata* les autres sont des populations *Crassostrea gigas*.

C. gigas) mais non significative avec les populations Brest et Venise (*C. gigas*).

Les Fst 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, Brest et Seudre ainsi que la population Oualidia avec Venise et Brest présentant une valeur quasi-nulle, résultat surprenant étant donné la situation des deux populations. Des transferts d'huîtres du Maroc vers Brest et Venise pourraient expliquer ce résultat.

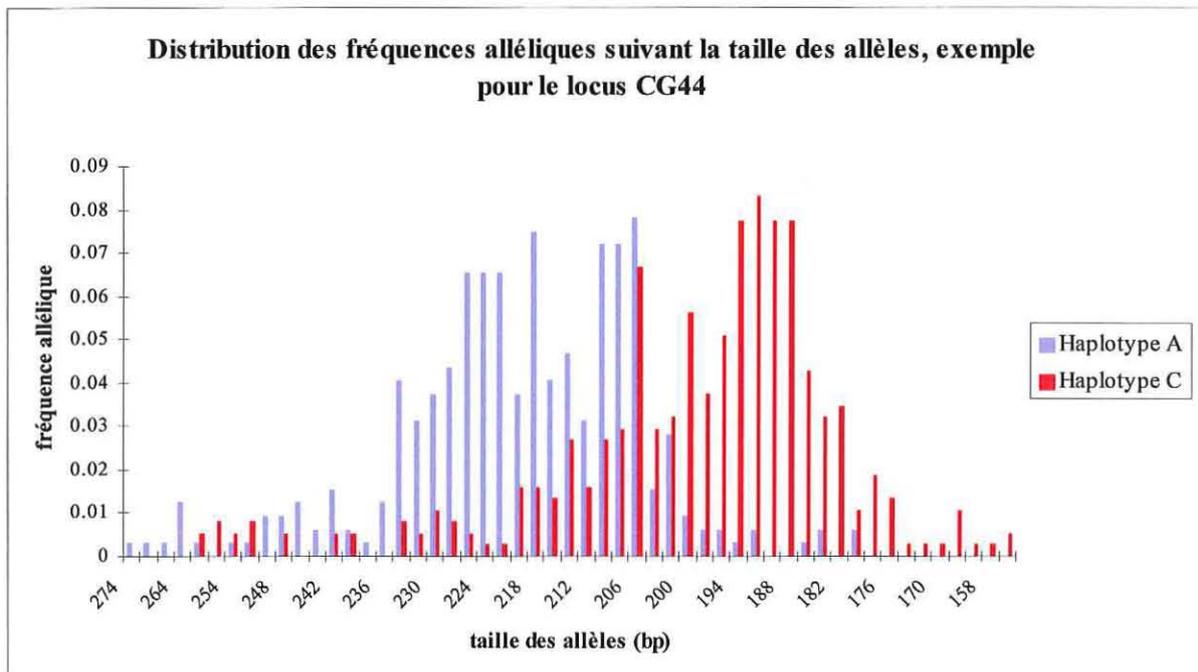
Une distance génétique quantifie le degré de divergence génétique entre unités taxonomiques (populations, espèces) prises deux à deux. Une matrice de distance de Cavalli-Sforza (1967) a été calculée sur ces populations à partir du logiciel Genetix et a permis la réalisation d'un arbre de distances par neighbor-joining (figure 6).

Différenciation Crassostrea gigas - Crassostrea angulata

L'étude des fréquences alléliques à chaque locus chez *Crassostrea gigas* puis *Crassostrea 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 7.

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 (figure 6, Boudry *et al.* (1998)), la population KEE (Taiwan) est insérée dans le regroupement *C. angulata*. On constate que sur un loci (CG44) une nette différenciation dans la taille des allèles apparaît entre les deux taxons (figure 7) : 38% des allèles présents chez *Crassostrea gigas* sont absents chez *Crassostrea angulata* et 15% dans le sens inverse. *Crassostrea angulata* ne présente que des allèles grands comparativement à *Crassostrea gigas* dont les allèles se répartissent sur toute la courbe avec une prédominance au niveau des petites tailles alléliques. Sur le locus CG108, les résultats vont dans le même sens avec 24% des allèles présents chez *Crassostrea gigas* et absents chez *Crassostrea angulata*. Par contre sur les deux autres loci, à savoir CG49 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 7. 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 haplotypes. 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 l'haplotype A et l'haplotype C aux loci CG44, CG108 et CG49 (mais pas au locus L10).

3.2. Les croisements

3.2.1. L'outil zootechnique

3.2.1.1. Protocole de croisement

Après une période de maturation de 2 mois, les géniteurs sont ouverts et sexés. Les produits génitaux sont obtenus par scarification de la gonade, méthode dite du « stripping ». Après leur filtration sur tamis (maille de 60 μm), les gamètes sont comptés (les spermatozoïdes sont colorés à l'éosine puis comptés sur cellule de Thoma par analyse d'image,

système Alcatel/Samba). Les gamètes femelles sont comptés directement sur cellule de Mallassez avec le même système. Une concentration identique en ovocytes (selon les résultats souhaités en nombre de larves) est répartie dans des récipients de 400 ml auxquels on ajoute les spermatozoïdes à raison de 100 par ovule. Quatre à 5 heures après mélange des gamètes, des prélèvements sont effectués pour estimer le taux de fécondation (stade embryon 16 cellules). La procédure habituelle est la mise en incubation d'un maximum de 15 millions de larves (100 larves par ml) dans des bacs cylindro-côniques de 150 litres d'eau de mer filtrée maintenue à 21°C et 32‰ de salinité. Vingt-quatre heures plus tard, le taux d'éclosion est estimé par dénombrement du nombre de larves D.

Durant l'élevage larvaire, les larves sont comptées toutes les 48 heures (prélèvement de 100 µl et dénombrement sur cellule quadrillée) et mesurées avec un projecteur de profil (avec une interface de saisie sous Windows). Les densités sont réajustées à chaque comptage et diminuées au fur et à mesure du grossissement des larves (suivant une échelle zoosanitaire prédéfinie). A J1, les larves sont remises en élevage à raison de 10 par ml soit un maximum de 1 500 000 dans une jarre de 150 litres.

Après l'élevage larvaire, la fixation est réalisée dans des tamis rectangulaires (maille de 150 µm) sur de la brisure de coquille. Pendant le micronursage, les suivis de l'état sanitaire et de la croissance des huîtres sont effectués. Au fur et à mesure de la croissance des huîtres, les tamis sont changés permettant d'éliminer la brisure excédentaire et les coquilles vides. Les huîtres sont transférées à la nurserie IFREMER de Bouin quand elles atteignent une taille suffisante pour rester sur un maillage de 1 mm. Le suivi est assuré par le personnel de cette station et des mesures de poids sont toujours périodiquement effectuées.

3.2.1.2. Croisements

Huit populations naturelles vivantes (tableau 1) ont été collectées dont 5 utilisées pour les croisements prévus. La population GEN est la population échantillonnée dans le bassin de Marennes-Oléron. Ces individus serviront de géniteurs de référence.

Cinquante individus des populations FLO (*C. angulata*, Espagne), GEN (*C.gigas*, Marennes-Oléron) et 25 de la population ALG (*C.gigas*, Portugal) ont été disposés dans des bacs de maturation. L'eau de mer est chauffée artificiellement à 18-18.5°C et enrichie par l'apport de phytoplancton (algues *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Pavlova lutheri* et

Skeletonema costatum) dans le but de provoquer et d'accélérer la maturation des animaux. Le croisement factoriel 2x2 entre la population *Crassostrea angulata* FLO (Espagne) et la population *Crassostrea gigas* GEN (Marennes-Oléron) et un croisement intra-population supplémentaire ALG (Portugal) ont ainsi été réalisés mi-avril 1998 (tableau 8).

Tableau 8. Croisement RSGA 9807 du 14/4/98

| | Dénomination femelle x mâle | Nb de parents | Types de ponte |
|------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Lot 1 - 2 | Cg GEN x Cg GEN | 21 femelles, 10 mâles | Stripping, en masse |
| Lot 3 - 4 | Cg GEN x Ca FLO | 21 femelles, 15 mâles | Stripping, en masse |
| Lot 5 - 6 | Ca FLO x Cg GEN | 21 femelles, 10 mâles | Stripping, en masse |
| Lot 7 - 8 | Ca FLO x Ca FLO | 21 femelles, 15 mâles | Stripping, en masse |
| Lot 9 - 10 | Ca Alg x Ca Alg | 11 femelles, 12 mâles | Stripping, en masse |

Conformément à la législation, les populations taiwanaises (TAI) et japonaises (HIR) sont dans des bacs quarantaine dont les effluents sont stérilisés à l'ozone. Une cinquantaine d'individus par population a été examinée par les pathologistes du laboratoire LGP de La Tremblade qui n'ont pas décelé de présence d'agent pathogène. Pour les populations étrangères récemment acclimatées, une maturation naturelle a été préférée à une maturation artificielle. La ponte a eu lieu spontanément dans les bacs quarantaines pour les populations TAI et HIR. L'eau de mer des bacs a été prélevée puis filtrée afin de récupérer les gamètes et les œufs. Ils ont ensuite été mis en élevage en bacs cylindro-côniques de 150 litres. Trois croisements ont ainsi été générés (avec un réplicat à chaque croisement, soit un total de 6 lots). Ils correspondent aux 3 croisements intra-population HIR, TAI et GEN (tableau 9). Pour ce dernier, les gamètes ont été obtenus par « stripping ».

Tableau 9. Croisement RSGJ 9809 du 12/05/98

| | Dénomination femelle x mâle | Nb de parents | Types de ponte |
|-----------|--------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Lot 1 - 2 | Cg GEN x Cg GEN | 10 femelles, 10 mâles | Stripping, en masse |
| Lot 3 - 4 | Cg HIR x Cg HIR | ? | Naturelle |
| Lot 5 - 6 | Cg TAI x Cg TAI | ? | Naturelle |

La ponte ayant eu lieu naturellement dans les bacs pour les populations HIR et TAI, le nombre

Figure 9 : Suivi de croissance avant J50 sur les lots RSGA9807

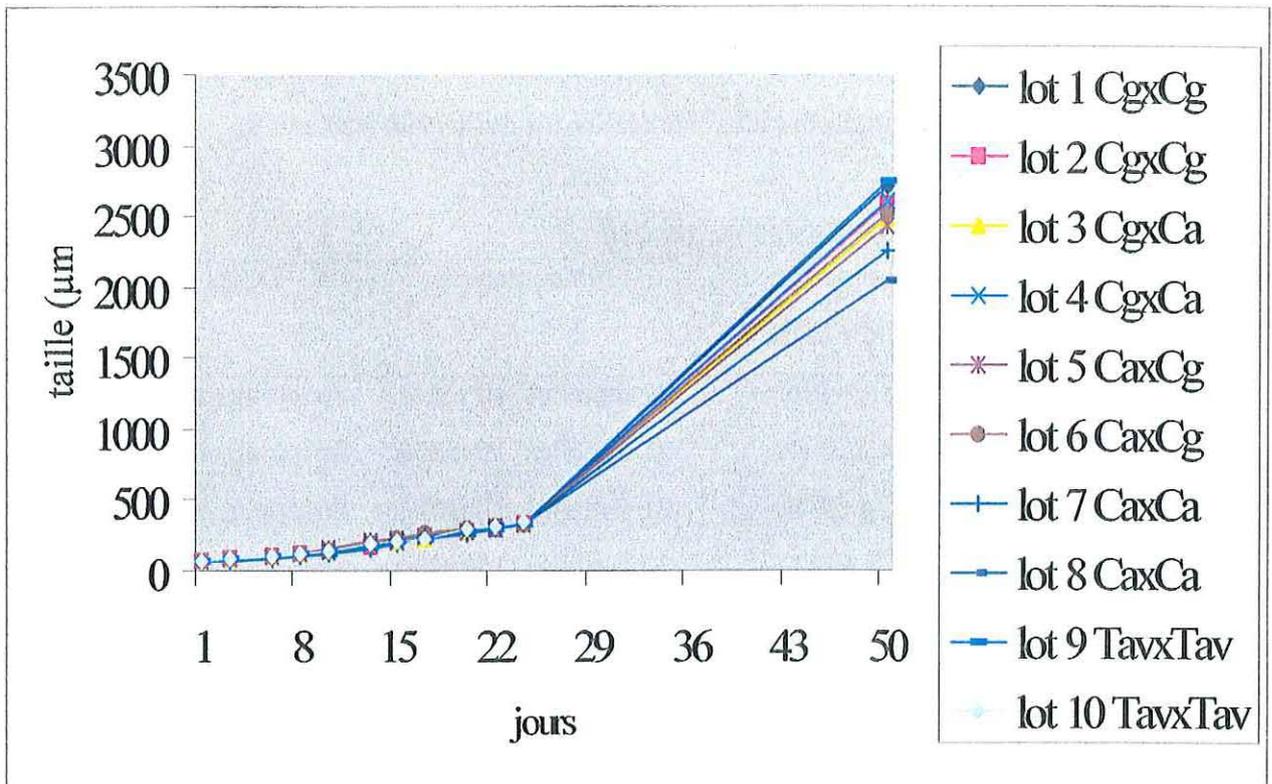
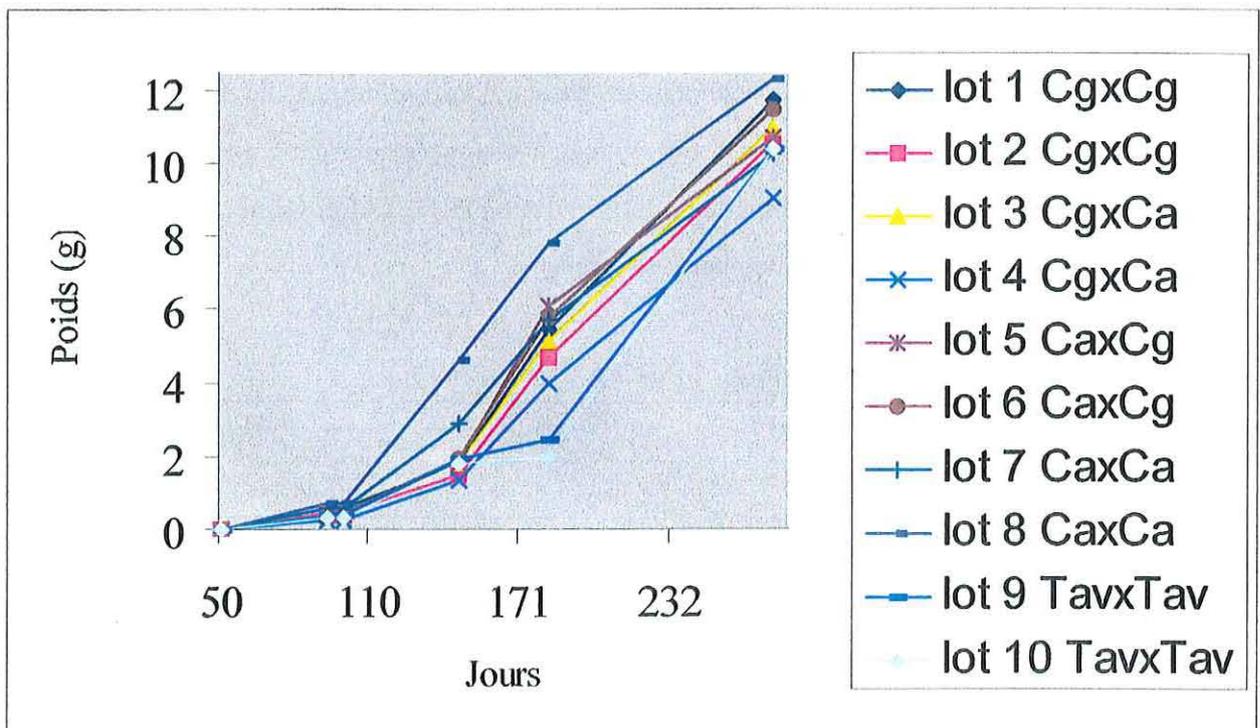


Figure 10: Suivi de croissance après J50 sur les lots RSGA9807



de parents des 2 sexes est donc inconnu.

3.2.2. Résultats

3.2.2.1. Fécondation

Les taux de fécondation ont seulement été estimés sur le croisement RSGA9807 du fait de la ponte naturelle des géniteurs du croisement RSGJ9809. Nous n'avons aucun renseignement sur l'heure de la ponte et avons rapidement transféré les œufs dans des bacs d'élevage.

Les résultats sur les lots RSGA9807 sont hétérogènes. Pour les *C.gigas* x *C.gigas* (77%, lots 1 et 2), il est quasiment le double des *C.angulata* x *C.angulata* (45%, lots 7 à 10). Les hybrides issus de femelles *C.gigas* montrent des valeurs intermédiaires (66%, lots 3 et 4) alors que ceux issus de femelles *C.angulata* affichent les valeurs les plus faibles (40%, lots 5 et 6).

3.2.2.2. Croissance

Le suivi de croissance de ces huîtres a été réalisé périodiquement depuis leur premier jour d'élevage. La première partie du suivi est une mesure de la longueur des larves et des juvéniles après la fixation. La deuxième est une mesure du poids des jeunes animaux au stade du nursage. Une mesure double de la taille et du poids a été effectuée entre le micronursage et le nursage afin de corréliser les 2 types de mesures et donc la croissance en phases micronursage et nursage.

Les figures 8,9 et 10,11 représentent les suivis de croissance avant et après J50 respectivement pour les lots du croisement RSGA9807 et RSGJ9809.

Croisement RSGA9807 :

Jusqu'à la fixation, les courbes de croissance sont homogènes entre tous les lots. Les tailles des larves entre lots sont très semblables le jour de la fixation. Le stade pédivéligère est apparu au même jour (J22) sur les têtes de lots (sauf lots 2 et 7). La fin de la fixation (corps et queue de lot) a été faite à J24. A J50, deux tendances se dégagent. Une croissance plus forte apparaît sur les lots 9 et 10 et une plus faible sur les lots 7 et 8. Le reste des lots semble homogène. A partir de J100, des différences plus marquées apparaissent. Les lots 9 et 10 montrent une plus faible croissance attendue du fait de la densité double de ces 2 lots par

Figure 10 : Suivi de croissance avant J50 sur les lots RSGJ9809

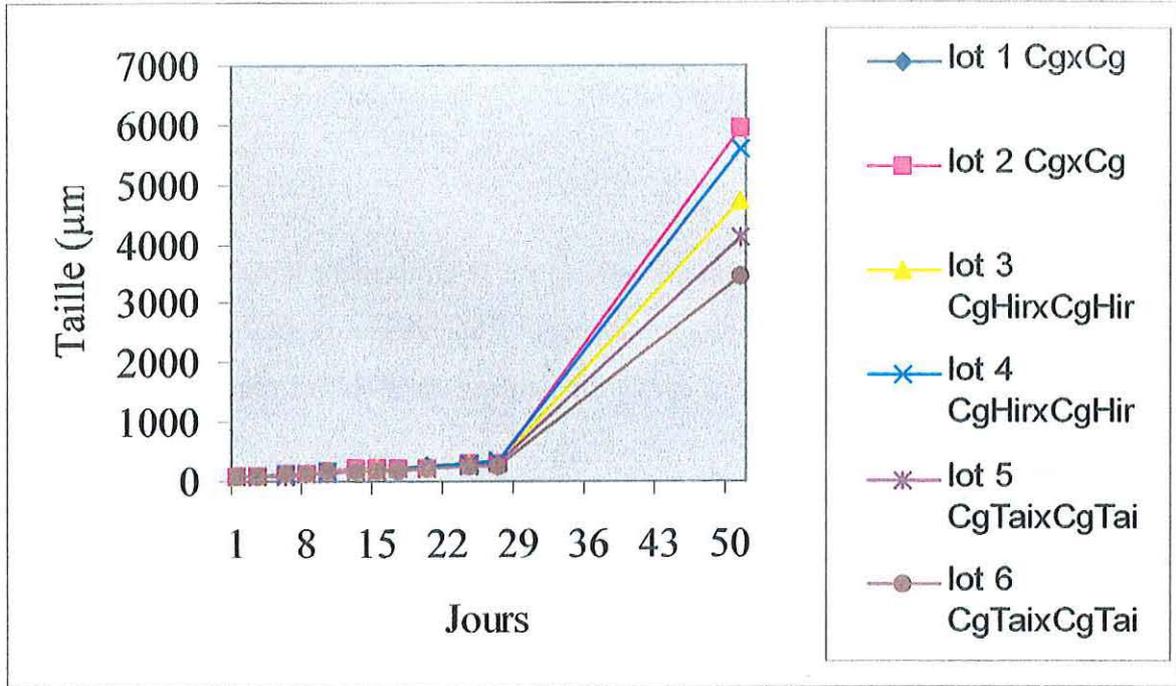
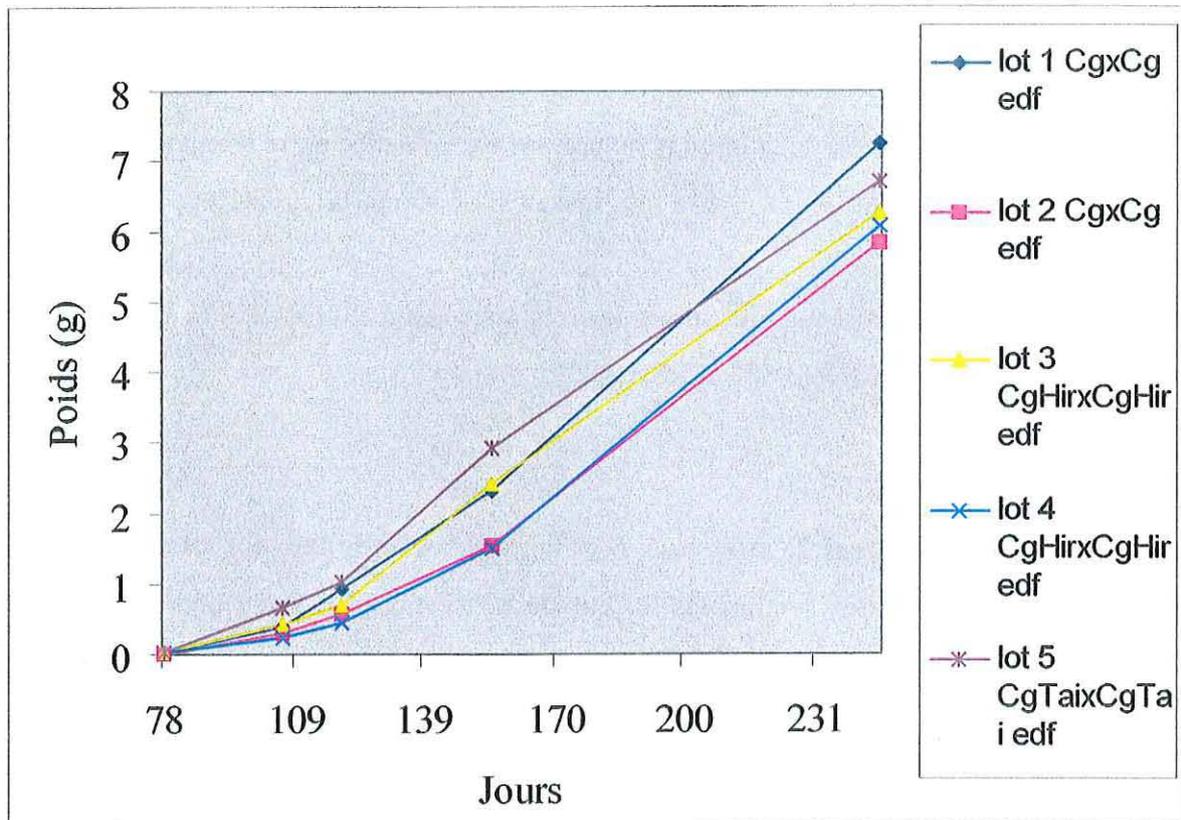


Figure 11 : Suivi de croissance après J50 sur les lots RSGJ9809



rapport aux autres lots (2000 individus par tamis contre 1000). A l'inverse, la croissance plus forte du lot 8 est expliquée par la faible densité des individus dans les tamis. Dans ce lot, seulement 1500 individus restaient alors que dans les autres lots, la densité a été diminuée périodiquement de 6000 à 3000 à 2000 et enfin à 1000 individus par tamis. Les courbes de croissance des autres lots sont proches mais montrent des différences non négligeables. Les animaux les plus petits sont les descendants du croisement CgxCa (moyenne sur les réplicats= 4,5g), puis CgxCg (5,1g) et enfin CaxCa et CaxCg (5,9g). Les individus issus de femelles *C.angulata* sont en moyenne plus gros mais cette différence n'est apparue qu'au cours du nursage.

Croisement RSGJ9809 :

Les courbes de croissance des lots 1,2,3 et 4 sont superposables. La pente est à peu près similaire. Les comparaisons de croissance à plusieurs jours montrent des différences inférieures à 5% de la taille maximale.

La fixation des lots 1 et 2 (GenxGen) a eu lieu entre J21 et J26, celles des lots 3 et 4 (HirxHir) entre J23 et J28 et celles des lots 5 et 6 (TaixTai) entre J30 et J33. Il y a un décalage de la durée de l'élevage larvaire entre des individus issus de localités géographiques différentes. Si on observe le jour où le maximum de larves est prêt à fixer, les lots 1,2,3 et 4 sont très proches avec un maximum le 26^{ième} jour. Par contre, les *C.gigas* issus de parents TAI (lots 5 et 6) montrent le maximum de fixation le 30^{ième} jour. Les tailles sont très homogènes entre lots 1,2,3 et 4 mais l'œil (stade pré-fixation) est apparu plus tardivement sur les lots 3 et 4. Les lots 5 et 6 montrent des tailles plus faibles à J27 (277 µm contre 324 et 327 µm respectivement pour les lots 1,2 et 3,4). Cinq jours, en moyenne, ont été nécessaires pour compenser le retard de croissance par rapport aux autres lots, expliquant leur retard à la fixation.

Le suivi en nurserie montre des poids assez homogènes entre lots (J246). Le lot 5 a rattrapé son retard de croissance mais cette comparaison n'est pas pertinente puisque les densités étaient nettement moindres (1600 individus durant tout le nursage contre 4000, 2000 et 1400 individus par tamis pour les autres lots).

3.2.2.3. Survie

Un suivi de mortalité a été réalisé simultanément au suivi de croissance.

Croisement RSGA9807 :

L'élevage larvaire n'a pas subi d'épisode de mortalité. Les premières mortalités (excepté les échecs à la fixation) sont apparues vers le 72^{ème} jour après la ponte. De fortes mortalités sont notées avec environ 80% de coquilles vides dans le lot 1, 50% dans les lots 8 et 9, 30% dans les lots 3 et 6. Un prélèvement de chaque lot a été analysé par des pathologistes du laboratoire LGP de la Tremblade. Les tests sont tous négatifs. Les taux de mortalité ont été estimés à J79 par comptage des animaux vivants et morts (tableau 10).

Tableau 10. Survie des lots du croisement RSGA9807 à J79

| | Lot 1 | Lot 2 | Lot 3 | Lot 4 | Lot 5 | Lot 6 | Lot 7 | Lot 8 | Lot 9 | Lot 10 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| % de survie | 28.1 | 41.7 | 41.5 | 32.1 | 10.7 | 26.5 | 22.7 | 4.1 | 48.9 | 36.5 |

De fortes différences apparaissent entre réplicats, difficilement explicables. La moyenne du pourcentage de survie sur les 2 réplicats montre des différences entre type de croisements :

- 37% pour les descendants hybrides (*C.gigas* x *C.angulata*)
- 35% pour les descendants (*C.gigas* x *C.gigas*)
- 19% pour les descendants hybrides (*C.angulata* x *C.gigas*)
- et 13% pour les descendants (*C.angulata* x *C.angulata*).

Il faut noter la très faible survie sur le lot 8.

Une plus forte mortalité est notée sur les lots issus de femelles *C.angulata*.

Au cours du nursage, dans la nurserie IFREMER de Bouin, l'ensemble des lots du croisement RSGA9807 montre une survie proche de 100%. Par contre, une fois mis en mer ou en marais (quelques milliers d'individus), ils ont montré des mortalités différentielles. En parcs dans le bassin de Marennes-Oléron, alors que les lots 1 et 2 ne subissaient que très peu de mortalité (4%), les lots 5 et 6 et surtout 3 et 4 atteignaient des pourcentages importants, respectivement 25 et 40% (données fournies par le CREAA). D'autres individus, en particulier des lots 5 et 6, n'ont pas supporté le retrempage en marais avec une mortalité proche de 100%.

Croisement RSGJ9809 :

L'élevage larvaire s'est déroulé normalement pour les 4 premiers lots. A l'inverse, le nombre de larves vivantes dans les lots 5 et 6 chutait régulièrement au cours de l'élevage larvaire. Entre J12 et J14, plus de la moitié des larves sont mortes.

A partir de la fixation, deux parcours différents étaient utilisés pour le micronursage : l'eau de mer et l'eau de forage. Le lot 1 en eau de mer et le lot 6 en eau de forage affichent une survie proche de 0%.

Les résultats de survie de tous les lots du parcours eau de mer sont répertoriés dans le tableau 11.

Tableau 11. Survie des lots du croisement RSGJ9809 à J56 (parcours eau de mer)

| | Lot 1 | Lot 2 | Lot 3 | Lot 4 | Lot 5 | Lot 6 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| % de survie | 0.00 | 25.9 | 44 | 46.8 | 82.4 | 75 |

Tous les lots ont été examinés par des pathologistes du laboratoire LGP de La Tremblade et sont tous négatifs pour les tests Herpès.

Les lots 5 et 6 (issus de géniteurs TAI) montrent une survie plus de 4 fois supérieure aux lots 1 et 2 (issus de géniteurs GEN). Les lots 3 et 4 (issus de géniteurs HIR) ont une position intermédiaire (environ 45%).

Au cours du nursage dans la nurserie de Bouin (IFREMER), à l'instar du croisement RSGA9807, l'ensemble des lots du croisement RSGJ9809 montre une survie proche de 100%.

IV. Conclusion

Trois idées directrices se dégagent pour la suite de ce travail.

L'ensemble des résultats des études précédentes (revue bibliographique) ainsi que nos premiers résultats concluent à l'existence d'une seule et unique espèce regroupant *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*. L'hypothèse première est l'importation d'animaux originaires d'Asie au Portugal qui serait donc à l'origine des populations d'huîtres portugaises. Nos résultats le confirment et semblent identifier Taiwan comme origine de *C. Angulata*.

L'effort d'échantillonnage des populations mondiales (conservées en alcool) est maintenu pour compléter l'analyse moléculaire des ressources génétiques chez *Crassostrea gigas*. Les échantillons d'origine asiatiques posent problème. Il serait très intéressant d'étudier plus en détails la zone géographique entre le Japon et Taiwan où sont présentes *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*. Nous devons concentrer nos efforts dans le but de développer des contacts avec des scientifiques japonais afin d'obtenir du matériel d'étude.

La mise au point d'un nouveau marqueur moléculaire est à développer afin d'appréhender au mieux la problématique énoncée. Ce marqueur se doit d'être nucléaire et spécifique de chaque taxon. Plusieurs idées sont envisageables comme l'utilisation de DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism) mise au point par Desmarais *et al.* (1998).

Le dernier point est le testage des individus issus des croisements effectués en 1998. En premier lieu, un important suivi en système contrôlé (croissance, mortalité, biochimie, gamétogénèse,..) est programmé à la station IFREMER de Bouin de mars à octobre 1999. Un second suivi est programmé dans le milieu naturel. Le testage de ces individus devrait être réalisé en plusieurs sites en mer ainsi qu'en marais. L'ensemble de ces données devraient nous permettre à la fois de cerner mais aussi d'affiner tous les aspects de la comparaison des deux taxons d'huîtres creuses.

Bibliographie

- BANKS M.A, D. HEDGEOK and C. WATERS, 1993. Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2 : 129-136.
- BELKIR K., P. BORSA, J. GOUDET, L. CHIKHI and F. BONHOMME, 1996. Genetix, logiciel sous windows™ pour la génétique des populations.
- BRITTEN R.J. and D. KOHNE, 1968. Repeated sequences in DNA. *Sciences*, 161 : 529-540.
- BROOKFIELD J.F.Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455.
- BOOM J.D.C., E.G. BOULDING and A.T. BECKENBACH, 1994. Mitochondrial-DNA variation in introduced populations of pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in British-Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 1608-1614.
- BOUDRY P., S. HEURTEBISE, B. COLLET, F. CORNETTE and A. GERARD, 1998. Genetic differentiation between Portuguese [*Crassostrea angulata* (Lamarck)] and Pacific [*Crassostrea gigas* (Thunberg)] oyster populations, as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226: 279-291.
- BOUGRIER S., G. RAGUENES, E. BACHERE, G. TIGE and H. GRIZEL, 1986. Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France, résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. Angulata* - *C. Gigas*. Conseil international pour l'exploitation de la mer. Comité Mariculture: F:38.
- BUROKER N.E., 1984. Gene flow in mainland and insular populations of *Crassostrea* (Mollusca). *Biological Bulletin*, 166 : 550-557.
- BUROKER N.E., W.K. HERSHBERGER and K.K. CHEW, 1975. Genetic variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of the fisheries research board of Canada*, 32(12) : 2471-2477.
- BUROKER N.E., W.K. HERSHBERGER and K.K. CHEW, 1979. Populations genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology*, 54 : 157-169.
- BUROKER N.E., W.K. HERSHBERGER and K.K. CHEW, 1979. Populations genetics of the family Ostreidae. II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and

- Saccostrea*. Marine Biology, 54 : 171-184.
- CAVALLI-SFORZA L.L. and A.W.F. EDWARDS, 1967. Phylogenetic analysis : models and estimation procedures. Amer. J. Hum. Genet, 19 : 233-257.
- CHAKRABORTY R., M. DE ANDRADE, S.P. DAIGER and B. BUDOWLE, 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. Annals of Human Genetics, 56 : 45-57.
- CHILD A.R., P. PAPAGEORGIOU, A.R. BEAUMONT, 1995. Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) of possible french origin in natural spat in the british-isles. Aquatic Conservation - Marine and Freshwater Ecosystem, 5 : 173-177.
- COLEMAN N. (1986). A review of introductions of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around the world and a discussion of the possible ecological consequences of introducing the species into Victoria, Australia. Technical report N°56, Marine Resources Management Branch, Fisheries and Wildlife Service, Department of Conservation, Forests and Lands, Queescliff, Victoria, Australia. 39 pp.
- COMPS M., BONAMI J.R., VAGO C. et A. CAMPILLO, 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). C. R. Acad. Sci., Paris, Sciences de la vie, 282 : 1991-1993.
- DAVID P., 1996. Structures génétiques et relation génotype-phénotype en milieu marin : le cas du bivalve *Spisula ovalis*. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, 76 pp.
- DESMARAIS E., I. LANNELUC and J. LAGNEL, 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. Nucleic Acids Research, 26 : 1458-1465.
- DI RIENZO A., A.C. PETERSON, J.C. GARZA, A.M. VALDES, M. SLATKIN and N.B. FREIMER, 1994. Mutational process of simple sequence repeat loci in human populations. Proceeding of the National Academy of Sciences, 91 : 3166-3170.
- ESTOUP A., C.D. LARGIADER, E. PERROT and D. CHOURROUT, 1996. Rapid one-tube extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. Molecular Marine Biology and Biotechnologie, 5(4) : 295-598.
- FELSENSTEIN J. 1993. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package, version 3.5c). Departement of Genetics, SK, University of Washington, Seattle, WA.
- FOLMER O., M. Black, W. Hoech, R. Lutz and R. Vrijenhoek, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase c subunit from diverse metazoan

- invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech*, 3 (5) : 294-299.
- FOLTZ D.W. and E. ZOUROS, 1984. Enzyme heterozygotie in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin) in relation to age and size. *Marine Biology Letter*, 5 : 255-263.
- FUJIO Y., 1979. Enzyme polymorphism and population structure of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 30(1) : 32-42.
- FUJIO Y. (1982). A correlation of heterozygosity with growth rate in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agriculture Research*.33: 66-75.
- FUJIO Y., Y. NAKAMURA and M. SUGITA, 1979. Selective advantage of heterozygotes at catalase locus in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Japan J. Genetics*, 54(5) : 359-366.
- GAFFNEY P.M., 1994. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves : More light ? In *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, Ed A.R. Beaumont. Chapman & Hall, London, 146-153.
- GOLDSTEIN D.B., A.R. LINARES, L.L. CAVALLI-SFORZA and M.W. FELDMAN, 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139 : 463-471.
- GOULLETQUER P. And M. HERAL, 1997. Marine molluscan production trends in France : from fisheries to aquaculture. *U.S. Dep. Commer., NMFS 129*, p137-164.
- GRASSE P., 1960. *Traité de Zoologie*. Tome V. Masson et Cie, Paris, 2219 pp.
- GRIZEL H., 1996. Some examples of the introduction and transfer of mollusk populations. *Rev. Sc. Tech. Office Int. Epizooties*, 15: 401-408.
- GRIZEL H. and M. HERAL, 1991. Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 47 : 399-403.
- HARE M.P. and J.C. AVISE, 1996. Molecular genetic analysis of a stepped multilocus cline in the american oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution*, 50(6) : 2305-2315.
- HARE M.P., S.A. KARL and J.C. AVISE, 1996. Anonymous nuclear-DNA markers in the american oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. *Mol. Biol. Evol.*, 13 : 334-345.
- HILBISH T.J. and R.K. KOEHN, 1985. Dominance in physiological phenotypes and fitness at an enzyme locus. *Science*, 229 : 52-54.
- HIS E., 1972. Premiers éléments de comparaison entre l'huître portugaise et l'huître japonaise. *Bull. Inst. Pêches Marit.*, 219, 10 pp.

- IMAI T. And S; SAKAI, 1961. Study of breeding of japanese oyster, *Crassostrea gigas*.
Tohoku Journal of Agricultural Research, 12(2) : 125-171.
- KARAKOUSIS Y. and D.O.F. SKIBINSKI, 1992. An analysis of allozyme, mitochondrial DNA and morphological variation in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) populations from Greece. *Experientia*, 48 : 878-881.
- KARL S.A. and J.C. AVISE, 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters : implications from nuclear RFLPs. *Science*, 256 : 100-102.
- LIU L.L., K. SOONG and C.P. CHEN, 1995. Allozyme variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* along the coast of Taiwan. *Zoological Studies*, 34(3) : 177-182.
- MAGOULAS A., B. GJETVAJ, V. TERZOGLU and E. ZOUROS, 1998. Three polymorphic microsatellites in the japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thuenberg). *Animals Genetics*, 29 : 63-72.
- MARIN F. and Y. DAUPHIN, 1991. Diverse alteration in the amino-acid content of the nacreous organic matrices in the black lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) in French-Polynesia affected by an epizootic disease. *C. R. Acad. Sci. , Paris, Sciences de la vie.*, 312 : 483-488.
- MATHERS N.F., N.P. WILKINS and P.R. WALNE, 1974. Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. Gigas*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2 : 93-96.
- MATTIUCCI S, and F. VILLANI, 1983. Studio elettroforetico dei sistemi gene-enzima in ostriche classificate come *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca : Ostreidae). *Parassitologia*, 25 : 21-27.
- MENZEL R.W., 1974. Portuguese and Japanese oysters are the same species. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 31 : 453-456.
- MOORE D., 1993. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1. Ed F.M. Ausubel, New York, unit 2-2 : 1-2.
- MORAGA D., M. OSADA, A. LUCAS et T. NOMURA, 1989. Génétique biochimique de populations de *Crassostrea gigas* en France (côte atlantique) et au Japon (Miyagi). *Aquatic Living Resources*, 2 : 135-143.
- NACIRI Y., Y. VIGOUROUX, J. DALLAS, E. DESMARAIS and C. DELSERT, 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.

- NAUTA M.J. and F.J.WEISSING, 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci : implications for genetic differentiation. *Genetics*, 143 : 1021-1032.
- O'FOIGHIL D., P.M. GAFFNEY and 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. *Journal of Experiment Marine Biology and Ecology*, 192 : 211-220.
- OHRESSER M., P. BORSA and C. DELSERT, 1997. Intron-length polymorphism at the actin gene locus *mac-1* : a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. Edulis* L. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(2) : 123-130.
- OZAKI H. and Y. FUJIO, 1985. Genetic differentiation in geographical populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 36(1) : 49-61.
- PAGE R. D. M., 1996. TREEVIEW : An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12 : 357-358.
- PEMBERTON J.M., J. SLATE, D.R. BANCROFT and J.A. BARRETT, 1995. Non amplifying alleles at microsatellites loci : a caution for parentage population studies. *Molecular Ecology*, 4 : 249-252.
- RASSMAN K., C. SCHLOTTERER and D. TAUTZ, 1991. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction base DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12 : 113-118.
- RAYMOND R. And F. ROUSSET, 1995. GENEPOP (version 1.2) : population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86 : 248-249.
- SAITOU N. and M. NEI, 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4) : 406-425.
- SHRIVER M.D., L. JIN, R. CHAKRABORTY and E. BOERWINKLE, 1993. VNTR allelic frequency distributions under the stepwise mutation model - a computer simulation approach. *Genetics*, 134 : 983-993.
- SINGH S.M. and R.H. GREEN, 1984. Excess of allozyme homozygoty in marine molluscs and its possible biological significance. *Malacologia*, 25(2) : 569-581.
- SMITH P.J., H. OZAKI and Y. FUJIO, 1986. No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *New Zealand*

- Journal of Marine and Freshwater Research, 20 : 569-574.
- SOKAL R.R. and F.J. ROHLF, 1995 . Biometry, third edition. Ed. W.H. FREEMAN and Compagny, New York, 887 pp.
- TAUTZ D. and M. RENZ, 1984. Simple sequences are ubiquitous components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids research, 12 : 4127-4138.
- THIRIOT-QUIEVREUX C., 1986. Etude de l'aneuploïdie dans différents naissains d'Ostreidae (Bivalvia). Genetica, 70 : 225-231.
- THIRIOT-QUIEVREUX C. et N. AYRAUD, 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. Marine Biology, 70 : 165-172.
- THIRIOT-QUIEVREUX C. G.H. POGSON and E. ZOUROS, 1992. Genetics of growth-rate variation in bivalves - aneuploidy and heterozygosity effects in a *Crassostrea gigas* family. Genome, 35: 39-45.
- VALDES A.M., M. SLATKIN and N.B. FREIMER, 1993. Allelic frequencies at microsatellite loci : the stepwise mutation model revisited. Genetics, 133 : 737-749.
- WEIR B.S. and C.C. COCKERHAM, 1984. Estimating F -statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38(6), 1358-1370.
- WRIGHT S., 1951. The genetical structure of populations. Annals of eugenics, 15 : 323-354.
- ZOUROS E., 1987. On the relationship between heterozygosity and heterosis : an evaluation of the evidence from marine mollusks. Isozymes: Current Top. Biol. Med. Res., 15: 255-270.
- ZOUROS E. and D.W. FOLTZ, 1984. Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oyster populations. Developmental Genetics, 4 : 393-405.
- ZOUROS E., S.M. SINGH and H.E. MILES, 1980. Growth rate in oysters : an overdominance phenotype and its possible explanations. Evolution, 34 : 856-867.

Glossaire

ADN : molécule d'acide désoxyribonucléique porteur de l'information génétique dans les organismes vivants

ADN mitochondrial : ADN présent dans les mitochondries et contribuant à l'hérédité cytoplasmique

Allèle : forme particulière prise par un gène, déterminant l'un des états possibles du caractère codé par ce gène

Allopatrie : populations ou espèces qui ont des aires géographiques de répartition différentes

Allozymes : enzymes ayant une même fonction catalytique

Aneuploidie : état d'une cellule dont la garniture chromosomique ne correspond pas au nombre de base de l'espèce

Caryotype : représentation ordonnée des chromosomes d'un noyau

DALP : Amplification Directe de Polymorphisme de Longueur, technique permettant de mettre en évidence du polymorphisme de longueur sur des fragments d'ADN

Espèce gonochorique : espèce présentant des animaux à sexes séparés

Fis : coefficient F-statistique de Wright mesurant les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg de chaque population

Fit : coefficient F-statistique de Wright mesurant les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg sur l'ensemble des populations

Fst : coefficient F-statistique de Wright mesurant la différenciation entre populations

Gamétogénèse : ensemble des processus contribuant à la formation des gamètes mâles et femelles

Génotype : identité individuelle sur un ou plusieurs locus de la garniture diploïde révélée par une analyse moléculaire

Haplotype : identité individuelle sur un ou plusieurs locus de la garniture haploïde révélée par une analyse moléculaire

Hardy-Weinberg (Équilibre de): les fréquences génotypiques sont stabilisées en des proportions données si les conditions établies sont respectées (panmixie, effectif illimité, pas de mutation ni de sélection)

Hétérozygote : individu présentant des allèles différents à un même locus

Homozygote : individu présentant les mêmes allèles à un même locus

Lamellibranche : Classe de mollusques aquatiques acéphales, bivalves, aux branchies en

forme de lamelles

Locus : correspond à un gène sur un chromosome

Neighbor-joining : méthode de représentation des liaisons génétiques à partir de distances génétiques, méthode dite du plus proche voisin

Nucléotide : ester phosphorique qui l'élément de base de l'ADN

Panmixie : le fait que des individus dans une populations se reproduisent au hasard et participent de façon équiprobable à la reproduction

PCR : Polymerase Chain Reaction, technique d'amplification exponentielle de fragment d'ADN

Polymérase : enzyme de réparation de l'ADN

Polymorphisme : existence de différente forme d'un locus donné

Pseudo-fécès : ensemble des particules non ingérées et rejetées au niveau des palpes labiaux

RFLP : Polymorphisme de Longueur de Fragment de Restriction, fragments obtenus par coupure grâce à des enzymes de restriction et montrant plusieurs morphes dues à des différences de longueur des fragments d'ADN

Stripping : technique de scarification des gonades afin de récupérer les gamètes

Sympatrie : populations ou espèces qui occupent les mêmes aires géographiques de répartition

Taxon : unité de classification du monde vivant

Wahlund (Effet): existence de groupes génétiquement différenciés à l'intérieur d'une population échantillonnée