

Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les apports de la génétique

Convention 2000 RPC-A-530



CREMA L'Houmeau
BP 7
17137 - L'Houmeau
Tél. : 05 46 50 94 40
Fax. : 05 46 50 06 00

Station IFREMER
B.P. 133
17390 La Tremblade
Tél. : 05 46 36 98 36
Fax. : 05 46 36 37 51

~ SOMMAIRE ~

Action 1: Etude des ressources génétiques chez les huîtres creuses		2
1.	Problématique générale et objectifs scientifiques.....	3
2.	Différenciation génétique et hybridation entre les populations d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> et <i>Crassostrea angulata</i>	4
2.1.	INTRODUCTION.....	4
2.2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	6
	<i>Biologie de l'espèce étudiée</i>	6
	<i>Echantillonnage</i>	6
	<i>Amplification des fragments d'ADN</i>	7
	<i>Analyse du polymorphisme de longueur</i>	8
	<i>Locus oIKK</i>	8
	<i>Fragment anonyme obtenu par DALP</i>	9
	<i>Analyse du polymorphisme de restriction</i>	9
	<i>Locus microsatellite CG44</i>	10
	<i>Traitement de données</i>	10
2.3.	RÉSULTATS	11
	<i>Le marqueur mitochondrial</i>	11
	<i>Les marqueurs nucléaires</i>	12
2.4.	DISCUSSION.....	17
	<i>Structuration génétique des populations de C. gigas et de C. angulata</i>	18
	<i>Hybridation naturelle entre C. gigas et C. angulata</i>	19
	<i>Hypothèses sur l'évolution du marqueur CG44R</i>	21
2.5.	CONCLUSIONS	22
2.6.	BIBLIOGRAPHIE	23
Action 2: Etude des anomalies chromosomiques chez <i>Crassostrea gigas</i>		26
1.	Contexte des études menées en 2000.....	28
2.	Le captage 1999	28
2.1.	ECHANTILLONNAGE.....	28
2.2.	MÉTHODE D'ÉTUDE.....	33
2.3.	RÉSULTATS	35
2.4.	CONCLUSION	36
3.	Le captage 2000	36
4.	Annexes	39
4.1.	FICHIER DES POIDS INDIVIDUELS DE 200 ANIMAUX PAR SITE	40
4.2.	PROTOCOLES.....	45
	4.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques	45
	4.2.2. Préparation des lames microscopiques.....	49
4.3.	RÉSULTATS BRUTS DES TAUX D'ANEUPLOÏDIE OBSERVÉS	53

Action 1: Etude des ressources génétiques chez les huîtres creuses

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

**IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie**

**BP 133, 17390 La Tremblade
Tél. 05 46 36 98 36
Fax. 05 46 36 37 51**

1. Problématique générale et objectifs scientifiques

L'étude de la variabilité génétique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est un point essentiel dans la mise en place de programmes de gestion des ressources génétiques et de sélection chez cette espèce. *C. gigas*, originaire du Japon, a été introduite dans de nombreuses régions du monde et représente aujourd'hui plus de 95 % de la production mondiale d'huîtres. Introduite en France au début des années 1970 pour remplacer l'huître portugaise *Crassostrea angulata*, c'est aujourd'hui une ressource de première importance pour notre région. Malgré la maîtrise du cycle de reproduction de l'espèce et son importance commerciale, elle n'a pas été génétiquement améliorée et on peut donc considérer les stocks comme « sauvages » ou « non domestiqués ». De plus, la très grande majorité du naissain mis en élevage en France est issue du milieu naturel. Le développement d'écloseries, visant principalement à approvisionner les producteurs en naissain, permet désormais d'envisager des programmes de sélection ou la diffusion de souches d'origines différentes de celle introduite au début des années 1970. Une meilleure connaissance des ressources génétiques disponibles est donc un élément essentiel au choix des stratégies de gestion et de sélection chez cette espèce. Cette connaissance nécessite :

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

Dans le cadre du plan Etat-Région 1994-1998, un programme de conservatoire de souches a été initié au Laboratoire IFREMER de La Tremblade. Ce conservatoire a pour objectif d'acclimater différentes espèces ou souches d'huîtres creuses (genres *Crassostrea* et *Saccostrea*) afin d'acquérir des connaissances sur ces espèces et d'évaluer l'intérêt qu'elles pourraient présenter pour l'ostréiculture locale. L'importation d'espèces étrangères sur les côtes françaises est désormais strictement réglementée: la dissémination d'une nouvelle espèce peut se révéler néfaste d'un point de vue écologique et nuire aux productions existantes. De plus, ces huîtres peuvent être porteuses de pathogènes qui, s'il venaient à se répandre dans le milieu, pourraient toucher les stocks locaux. En conséquence, les huîtres importées sont strictement confinées au laboratoire dans une « salle de quarantaine » dont l'eau est traitée à l'ozone avant rejet afin d'éviter à la fois la dissémination des huîtres et d'éventuels pathogènes. Au sein même de l'espèce *Crassostrea gigas*, certaines populations sont susceptibles de présenter des caractéristiques différentes de celles actuellement produites en France. Ces différences pourraient être liées à des conditions environnementales particulières à chaque zone géographique. L'identification de telles populations représenterait un intérêt immédiat pour l'ostréiculture locale, puisqu'elles pourraient être rapidement diffusées auprès des producteurs (après les contrôles sanitaires indispensables). Suite à l'introduction et la reproduction au sein du conservatoire de différentes souches, nous a permis ces dernières années, de réaliser ce type d'expérimentations, en collaboration avec le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC, IFREMER La Tremblade) et le Laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (LCPL, IFREMER Bouin). D'autre part, le développement de marqueurs moléculaires permettant de différencier ces souches reste une étape essentielle dans ces études. Ainsi, en 2000, les travaux ont essentiellement porté sur la mise au point de nouveaux marqueurs moléculaires pour l'étude des populations de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* et de leur hybridation en Europe.

2. Différenciation génétique et hybridation entre les populations d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*

2.1. Introduction

Les huîtres sont des invertébrés marins appartenant à l'embranchement des mollusques et à la classe des bivalves. Ce phylum est l'un des plus complexes et des plus hétérogènes du règne animal. Il est formé de huit classes, de plus de quatre-vingt familles et les animaux qui le composent, présentent une grande diversité structurale et écologique. Au sein de la famille des Ostréidés, les genres *Crassostrea* et *Saccostrea* regroupent une vingtaine d'espèces d'huîtres creuses. De nombreuses études sont réalisées sur des espèces d'intérêt aquacole comme, pour l'Europe, l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (Lamarck, 1819), l'huître creuse portugaise *Crassostrea angulata* (Thunberg, 1793) ou l'huître plate *Ostrea edulis* (Linné, 1758).

Un bref historique de l'ostréiculture française permet de comprendre la répartition actuelle de ces trois espèces. Seule l'huître plate est indigène des côtes françaises. Elle fut cultivée à partir du 17^{ème} siècle dans des bassins aménagés de la côte Atlantique. Mais dès le début du 18^{ème} siècle, une surexploitation des stocks menaça la survie de l'espèce. A partir de 1860, pour pallier cette pénurie, des huîtres creuses portugaises venant de l'embouchure du Tage ont été importées dans le bassin d'Arcachon. "Le Morlaisien", l'un des navires transportant ces huîtres, fut pris dans une tempête et dut vider sa cargaison dans l'embouchure de la Gironde où il s'était réfugié. Cet événement marqua le début de l'implantation de *Crassostrea angulata* sur les côtes françaises. Cette espèce rustique proliféra rapidement ce qui permit une exploitation intense. Mais, de 1966 à 1973, deux épidémies successives provoquèrent une mortalité massive de l'huître portugaise. La première dite "maladie des branchies" fut causée par un iridovirus (Comps, 1970) et la seconde par un virus hémocytaire. Pour relancer l'activité ostréicole, des géniteurs de *Crassostrea gigas* furent importés de Colombie britannique (Canada), eux-mêmes originaires du Japon, et du naissain arriva directement du Japon (Grizel et Héral, 1991). Cette espèce, moins sensible au virus (Comps, 1972), remplaça totalement *Crassostrea angulata* et domina *Ostrea edulis* dans les zones ostréicoles. A l'heure actuelle, l'existence de populations naturelles de *Crassostrea angulata*, en Atlantique nord, serait limitée aux seules côtes espagnoles et portugaises (Boudry et al., 1998). Les caractéristiques de *Crassostrea gigas*, telles ses capacités d'adaptation et sa résistance aux virus, en font une espèce tout à fait adaptée pour l'ostréiculture. Introduite dans le monde entier, elle représente aujourd'hui plus de 95% de la production mondiale d'huîtres (données FAO, 1996).

Des études comparatives entre les deux taxons ont été réalisées depuis l'introduction de *Crassostrea gigas* en Europe. Les observations faites ont remis en question leur classification taxonomique. Thunberg (1793) et Lamarck (1819) ont décrit deux espèces distinctes. En effet, leurs répartitions géographiques étaient très éloignées, Japon pour *Crassostrea gigas* et Portugal pour *Crassostrea angulata*, et l'isolement géographique est l'une des causes majeures de spéciation. Pourtant, ces deux taxons sont indiscernables en terme de morphologie, que ce soit au stade larvaire ou adulte (Ranson, 1948 ; Menzel, 1974), en terme de polymorphisme enzymatique, estimé par des études sur les allozymes, (Mathers et al., 1974 ; Buroker et al., 1979 ; Mattuicci et Villani, 1983) ainsi qu'en terme de caryotype (Menzel, 1974 ; Leitão et al., 1999). L'éloignement de leurs aires de répartitions était, a priori, contradictoire avec leurs similitudes génétique, morphologique et écologique et une question persistait quant à l'origine de ces deux taxons. Plusieurs hypothèses avaient été avancées à ce sujet. La première proposait l'existence d'un ancêtre commun fossile *Crassostrea gryphoides* (Stenzel, 1971). Mais l'absence de divergence au cours du temps malgré l'isolement géographique exclut cette hypothèse. La seconde était l'origine portugaise de l'espèce et son introduction accidentelle au Japon mais ceci

était peu probable car des espèces apparentées à *Crassostrea gigas*, telle *Crassostrea sikamea*, ont été trouvées en Asie, ce qui indiquerait une présence de *Crassostrea gigas* dans cette zone. Ainsi, la dernière hypothèse proposait l'introduction de *Crassostrea angulata* au Portugal depuis l'Asie, sa région d'origine (Buroker et al., 1979). Des outils moléculaires, ont permis de répondre à cette question et de confirmer l'origine asiatique de *Crassostrea angulata* (Boudry et al., 1998). En particulier, un marqueur mitochondrial (un fragment de 710 paires de bases (pb) du gène mitochondrial de la sous-unité I de la Cytochrome Oxydase) a servi à étudier le polymorphisme au sein de populations naturelles, échantillonnées en Europe et en Asie. Une analyse phylogénétique basée sur du polymorphisme de longueur a mis en évidence le regroupement de populations portugaises et taïwanaises. L'introduction en Europe daterait du 16ème siècle lors des traversées des vaisseaux de commerce portugais. Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux obtenus, dans le même temps par ÓFoighil et al. en 1998. Parallèlement, des calculs de Fst (Indice de Wright qui estime la différenciation génétique entre les populations) faits à partir de résultats obtenus avec des marqueurs microsatellites (séquence nucléotidique courte répétée en tandem dans une partie du génome nucléaire) donnent des valeurs significatives mais faibles (Huvet et al., 2000). Au vu de ces résultats, il était intéressant d'étudier davantage les différences qui existent entre les informations fournies par les marqueurs mitochondriaux et nucléaires.

Un autre axe d'étude était la question de l'existence ou de l'absence de barrières reproductives entre ces deux taxons. Des croisements intertaxons donnent des hybrides viables avec des taux de fertilisation et de développement en première génération identiques à ceux obtenus dans les croisements intrataxons (Menzel, 1974 ; Gaffney et Allen, 1993). De même, des hybrides fertiles ont été obtenus au LGP en 1999, ce qui confirme les résultats de Menzel en 1974. Ces données conduisent à la conclusion que *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* sont deux sous-espèces et non deux espèces distinctes.

Les présents travaux s'inscrivent dans ce contexte de recherche. Ils consistent en l'analyse de populations naturelles de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* à partir d'échantillons récoltés dans des régions où les deux taxons sont supposés être en sympatrie. Le but est de déterminer si les deux sous-espèces s'hybrident dans la nature, s'il existe des zones d'introggression d'un taxon par rapport à l'autre et quelle est la composition génétique des différentes populations. Les deux seules régions au monde où il existe des zones potentielles de sympatrie sont, d'une part, les îles entre le Japon (*C. gigas*) et Taiwan (*C. angulata*), et d'autre part, la côte atlantique de l'Espagne, intermédiaire entre la France (*C. gigas*) et le Portugal (*C. angulata*). Etant donné la difficulté d'obtenir des huîtres venant d'Asie, l'échantillonnage a été fait sur des populations européennes, au sud de la France, en Espagne et au Portugal. Ce travail de recherche a été décomposé en deux grands axes. Le premier est la recherche et la mise au point de nouveaux marqueurs moléculaires à partir de séquences de gènes, oIKK (Escoubas *et al.*, 1999) et amylase (Moal *et al.*, 2000), à partir de tout le génome nucléaire par la technique de DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism) et à partir de séquences microsatellites. En effet, une condition nécessaire à l'étude de l'hybridation dans les populations est de pouvoir distinguer les hybrides. Or, ils n'étaient pas repérables par des méthodes classiques d'analyses morphologiques ou enzymatiques à cause de la similarité des deux sous-espèces. La deuxième partie consiste à utiliser les marqueurs nucléaires et un marqueur mitochondrial sur les échantillons. Cette étude permettra de connaître la composition actuelle des populations d'huîtres creuses en Europe, de la comparer avec les données antérieures et d'envisager un scénario retraçant l'histoire de ces deux taxons. De plus, on pourra comparer l'information apportée par le locus mitochondrial et les locus nucléaires sur lesquels les pressions évolutives agissent différemment.

2.2. Matériel et méthodes

Biologie de l'espèce étudiée

Crassostrea gigas et *Crassostrea angulata* sont deux taxons d'huîtres creuses ayant des caractéristiques biologiques et écologiques similaires. Ils sont présents dans les océans tempérés (et subtropical pour *C. angulata*) sur les fonds meubles ou durs depuis le médiolittoral jusqu'à quinze mètres de profondeur dans l'infralittoral, ainsi que dans des lagunes. Ces bivalves, de forme allongée dont la taille peut atteindre 30 cm à l'âge adulte, sont accrochés au substrat par leur valve gauche. C'est dans cette valve creuse que se développe la masse viscérale alors que l'autre valve est plate. La coquille est formée de dépôts crayeux feuilletés. Les huîtres creuses sont des hermaphrodites alternatifs. En milieu naturel, en Europe, la reproduction a lieu en juillet – août. De la fécondation externe sont issus de 20 à 100 millions d'œufs qui vont se transformer en larves trocophores d'environ 50 µm. Les larves évoluent jusqu'à atteindre un diamètre de 300 µm et se transforment ensuite en larves pédivelligères. Ce stade est marqué par l'apparition d'un œil sur la future coquille et d'un pied. Ensuite, la larve se fixe et perd son pied. Ce développement larvaire dure entre 21 et 28 jours suivant la température de l'eau. Dans les zones les plus chaudes, il y a deux cycles de reproduction par an. La grande plasticité morphologique de ces animaux explique les variations phénotypiques observées entre des huîtres vivant dans des régions différentes.

Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué dans sept populations naturelles des côtes atlantiques de France, d'Espagne et du Portugal. La carte de la répartition des populations échantillonnées est donnée en figure 1. Cinquante individus ont été prélevés à chaque fois, excepté sur quelques sites où des difficultés d'échantillonnage ont été rencontrées. La localisation et l'effectif des populations échantillonnées sont indiqués dans le tableau I.

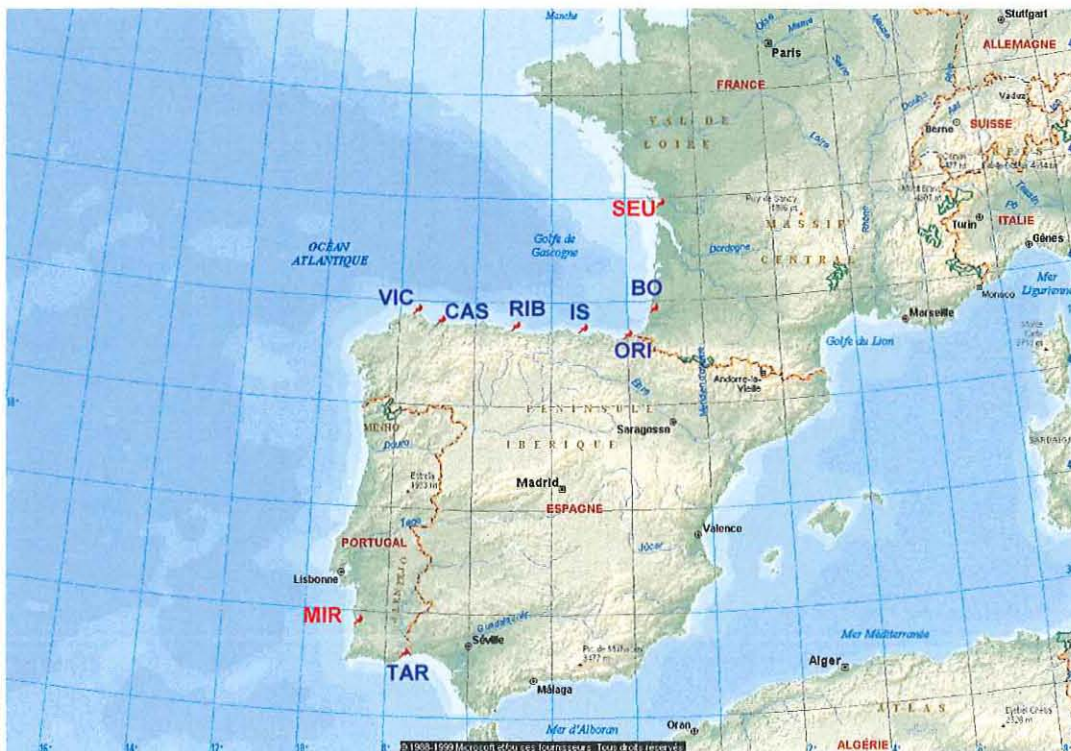


Figure 1. Répartition des populations échantillonnées en Europe.

Tableau I. Présentation des populations échantillonnées.

Population	Lieu de prélèvement	Effectif
SEU	Anse de la Seudre , La Tremblade, France	48
BOU	Vieux Boucau , Landes, France	50
ISL	Islares , Pays Basque, Espagne	48
ORI	Orio , Pays Basque, Espagne	50
RIB	Ribadesella , est de Gijon, Espagne	50
CAS	Castropol , limite Asturie-Galice, Espagne	45
VIC	Ria del Barquero- Vicedo , Galice, Espagne	50
MIR	Rio Mira , Portugal	30
TAR	Tavira , sud du Portugal	50
OGA	Hiroshima , Japon	50
KAO	Tungkang , Taiwan	46

Amplification des fragments d'ADN

Extraction d'ADN

L'ADN de 345 individus a été extrait selon la méthode phénol-chloroforme (Moore, 1993) à partir d'extraits de branchies conservés dans de l'alcool absolu. Après extraction, l'ADN est dilué (généralement à 5%) après quantification sur gel d'agarose, conservé dans une solution de TE 1 : 10 et placé à -20°C.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une réaction de polymérisation exponentielle d'un fragment d'ADN, à partir d'une paire d'amorces spécifiques de la région du génome à amplifier. Cette méthode, décrite pour la première fois par Mullis en 1987, se décompose en trois étapes :

- La dénaturation de l'ADN double brin,
- L'hybridation des amorces avec la région complémentaire de l'ADN,
- La polymérisation des oligonucléotides grâce à l'enzyme *Taq* polymérase.

Chaque étape, basée sur des variations de température, est répétée sur trente cycles, automatisés grâce à un thermocycleur programmable (PTC 100™, MJ Research, USA). Les amorces sont choisies en fonction de la région du génome à amplifier et les programmes sont adaptés à chaque type de réaction. Les réactions de PCR sont faites dans un volume de 20 ou 50 µl, avec de l'ADN, les amorces, des dNTPs, du MgCl₂, l'enzyme *Taq* polymérase et son tampon de réaction. Les différentes parties du génome amplifiées grâce à la technique de PCR sont utilisés comme marqueurs moléculaires pour cette étude. Le tableau II présente les données générales sur les marqueurs qui ont été utilisés.

Tableau II. Noms des marqueurs utilisés pour l'étude des populations de *C. gigas* et *C. angulata*, parties du génome ciblées, techniques d'analyses et références.

Fragment amplifié Nom du marqueur	Génome	Techniques d'analyses	Références
1-Cytochrome Oxydase I COI	mitochondrial	PCR-RFLP Gel d'agarose	Folmer <i>et al.</i> , 1994 Boudry <i>et al.</i> , 1998
2-Introns du gène amylase Amylase	nucléaire	PCR radioactive Gel d'acrylamide	Moal <i>et al.</i> , 2000
3-Introns du gène oIKK oIKK	nucléaire	PCR radioactive Gel d'acrylamide	Escoubas <i>et al.</i> , 1999
4-Région anonyme DALP233	nucléaire	PCR radioactive Gel d'acrylamide	Desmarais <i>et al.</i> , 1998 Huvet <i>et al.</i> , in prep.
5-Insertion dans séquence microsatellite CG44 CG44R	nucléaire	PCR-RFLP Gel d'agarose	Magoulas <i>et al.</i> , 1998 Huvet <i>et al.</i> , in prep.

Analyse du polymorphisme de longueur

Afin de repérer des différences de taille d'allèles allant de quelques pb à quelques dizaines de pb, les locus amylase, oIKK, "DALP233" et "DALP235" sont analysés sur gel d'acrylamide à 6% après un marquage radioactif des amorces de PCR au P³³. Cette technique fournit une très bonne résolution puisqu'elle permet de séparer des fragments qui ne diffèrent que d'une base azotée mais elle est lourde à mettre en œuvre.

Locus Amylase

A partir de la séquence du gène nucléaire de l'amylase de l'huître creuse (Moal *et al.*, 2000), plusieurs couples d'amorces ont été dessinés en respectant quelques règles. Les amorces doivent faire environ 20 pb, avoir une T_m (Température optimale d'hybridation) comprise entre 62°C et 68°C et un pourcentage en bases C (Cytosine) et G (Guanine) compris entre 40% et 60%. De plus, il est préférable que les amorces correspondent à des régions codantes du génome, plus soumises à la sélection et donc plus conservées de génération en génération. L'un des couples testés, bH/Amy4bisBB, permet d'amplifier une zone intronique du gène de l'amylase d'environ 500 pb, qui est choisie comme marqueur nucléaire. Ces amorces sont d'abord utilisées sur quelques individus échantillonnés afin de mettre au point les conditions expérimentales optimales (température d'hybridation pour la PCR, temps de migration en gel de polyacrylamide...) puis elles sont utilisées sur tous les individus.

Locus oIKK

Le gène oIKK (Escoubas *et al.*, 1999) est un gène homologue du gène IKK (IkB Kinase) existant chez les mammifères qui intervient dans des réactions de défense immunitaire. Sa séquence a permis de tester, sur quelques échantillons d'ADN, différents couples d'amorces. L'un d'eux, appelé D9T3/D9AP10, encadre une région intronique du gène de 700 pb environ. Après mise au point des conditions expérimentales sur un petit échantillonnage, la manipulation est faite sur tous les individus comme pour le locus amylase.

Fragment anonyme obtenu par DALP

Une nouvelle technique a servi à la mise au point d'un troisième marqueur. Cette technique appelée DALP (Direct Amplification of Length Polymorphism) (Desmarais *et al.*, 1998) permet de trouver des marqueurs polymorphes, de les isoler et de les séquencer, le tout sans avoir recours à une banque génomique. Le principe général de la méthode est décrit ci-après. Des échantillons d'ADN des deux taxons sont amplifiés avec des couples d'amorces arbitraires (une amorce et sa séquence réverse), dessinées à partir d'une séquence universelle M13 identique pour chaque couple et d'une terminaison propre à chaque amorce. Les produits PCR migrent en gel de polyacrylamide. Les bandes qui présentent un polymorphisme de longueur ou de présence / absence entre les échantillons des deux taxons sont ensuite récupérées directement sur le gel et réamplifiées par PCR avec les mêmes amorces mises en quantité double. La température d'hybridation est augmentée pour obtenir plus de spécificité. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés, purifiés puis séquencés et des amorces permettant l'amplification de cette région du génome sont dessinées en respectant les contraintes citées dans la partie 2.4.1. Pour notre étude, six pools (trois de *C. gigas* et trois de *C. angulata*) de huit individus chacun ont été testés avec huit amorces universelles. Deux d'entre elles, DALP233 et DALP235 (les amorces et les marqueurs portent le nom de la technique utilisée pour les mettre au point), ont donné des profils avec des bandes présentant du polymorphisme entre les deux taxons. Les bandes intéressantes ont été récupérées, réamplifiées puis clonées grâce au kit "TA Cloning Kit" (Invitrogen, Netherlands). L'ADN à cloner a été inséré dans un vecteur plasmidique *pCRII*. Ensuite, des bactéries ont été transformées avec ce plasmide puis mises en culture. Un test PCR permet de sélectionner celles qui ont intégré l'ADN. Elles sont alors digérées par l'enzyme *EcoRI* pour vérifier si la bande a bien la taille attendue. Enfin, le fragment est séquencé. Deux paires d'amorces ont été dessinées à partir de la séquence, DALP233Q1/DALP233Q2 et DALP235Q1/DALP235Q2.

Analyse du polymorphisme de restriction

Fragment mitochondrial, COI

Le premier marqueur analysé sur les échantillons est un fragment de 710 pb du gène mitochondrial de la Cytochrome Oxydase. L'analyse est faite par la méthode de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Elle consiste en un diagnostic des différences de longueur de fragments, d'une séquence d'ADN digérée par des enzymes de restriction après amplification par PCR (Botstein *et al.*, 1980). Quatre enzymes polymorphes (Boudry *et al.*, 1998) sont utilisées : *TaqI*, *MseI*, *Sau3A* et *HhaI*.

Les produits de digestion sont ensuite visualisés sur gel d'agarose à 1% ou 1,5% grâce à du bromure d'ethidium (BET) qui s'intercale entre les bases d'ADN et devient fluorescent sous UV. L'électrophorèse en gel d'agarose est bien adaptée à la révélation des produits de digestion car elle offre un bon compromis entre le niveau de résolution, de 300 à 15000 pb, le pouvoir de séparation de 50 pb, et la grande simplicité de mise en pratique. Les fragments obtenus après digestion par les quatre enzymes diffèrent d'au moins 70 pb (Boudry *et al.*, 1998) et sont donc séparés et visibles sur gel d'agarose.

Il faut noter que chez les huîtres comme chez la plupart des eucaryotes, la transmission de l'information mitochondriale haploïde est maternelle et le génome ne recombine pas (Boursot et Bonhomme, 1986). Par conséquent, une analyse génétique basée sur l'ADN mitochondrial ne permet pas d'analyser les phénomènes d'hybridation potentiels. Ainsi, il est indispensable de disposer de marqueurs nucléaires.

Locus microsatellite CG44

L'utilisation du microsatellite CG44 lors d'une étude de population (Huvet, 1997) a mis en évidence l'existence d'une différence de taille d'environ 24 pb entre la distribution moyenne de la taille des allèles de *C. gigas* et de *C. angulata*. Après clonage et séquençage de deux allèles (un de *C. gigas* et un de *C. angulata*), une confrontation des séquences montre que cette différence de taille n'est pas explicable par une variation du nombre de répétitions du motif "CA" du microsatellite. Par contre, on observe une insertion de 24 pb chez *C. angulata*, située en amont de la séquence microsatellite et absente chez *C. gigas* pour les deux individus séquencés. De plus, cette insertion contient un site de coupure enzymatique pour l'enzyme *BsrGI*. Ainsi, cette séquence pourrait se révéler être un marqueur codominant spécifique (appelé CG44R), si la spécificité était confirmée pour l'ensemble des individus. La méthode de PCR - RFLP, avec les amorces CG44S/CG44AS et l'enzyme *BsrGI*, ainsi que la technique de migration en gel d'agarose décrites dans le paragraphe précédent conviennent aussi pour ce marqueur. La température d'hybridation du cycle PCR initialement à 58°C, trop stringente, a été descendue à 57°C pour obtenir de meilleures amplifications.

Traitement de données

Estimation du taux d'hétérozygotie

Le taux d'hétérozygotie est estimé par population pour chaque marqueur grâce à l'indice de Nei (1987). Les résultats sont donnés par les deux indices suivant : "*Ho*" est l'hétérozygotie observée et "*Hnb*" est un estimateur de l'hétérozygotie attendue, dans les conditions de Hardy Weinberg, corrigé pour le biais d'échantillonnage.

Analyse de la variabilité génétique intrapopulation et interpopulation

Un calcul des fréquences alléliques par marqueur et par population donne une première estimation de la variabilité. Ensuite, les données obtenues pour chaque locus sont analysées avec des outils mathématiques mis au point par Wright en 1951, les *F* statistiques. L'indice *F* mesure l'approche à la fixation d'un allèle, c'est aussi la perte d'hétérozygotie dans le cas d'organismes diploïdes. Pour des populations structurées en sous-populations, trois paramètres, décrits ci-dessous, permettent d'estimer la structuration des peuplements :

- *Fis* mesure les écarts à l'équilibre de Hardy Weinberg à l'intérieur d'une sous-population,
- *Fst* mesure le déficit total en hétérozygote dû à la structure en sous-populations,
- *Fit* représente l'indice de fixation d'un allèle pour la population totale.

Ces trois paramètres sont liés entre eux par la relation suivante :

$$(1 - Fit) = (1 - Fis) (1 - Fst)$$

Les indices de fixation de Wright sont calculés d'après les formules de Weir et Cockerham (1984) qui donnent un estimateur sans biais, *thêta*, de *Fst* dans un modèle de populations en îles. *Thêta* est calculé à partir de l'analyse des composantes intrapopulations et interpopulations de la variance (*V*) des fréquences alléliques.

$$Thêta = \sum(A_i) / \sum(A_i + B_i + C_i) \quad \text{où } A_i + B_i + C_i = V_i$$

A_i est la composante de la variance des fréquences alléliques due à la structure en sous populations, *B_i* est celle due à l'existence de différences interindividuelles et *C_i* est la composante de la variance due aux corrélations entre les gamètes au niveau individuel.

La significativité des valeurs de F_{is} ($F_{is} \neq 0$) et de θ ($\theta \neq 0$) est testée par ré-échantillonnage aléatoire des allèles pour F_{is} et des individus pour F_{st} , pour 1000 permutations avec pour hypothèse nulle $\theta = 0$. Cette technique permet de construire un intervalle de confiance des valeurs de F_{is} et de F_{st} significatives. Dans les tableaux de résultats, trois seuils de significativité sont indiqués : $p < 0,005$ * ; $p < 0,001$ ** et $p < 0,001$ ***. Les valeurs non significativement différentes de zéro ne portent pas d'indication.

Estimation du déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison entre deux locus a été calculé en reprenant les algorithmes du programme "LinkDisk" de Black et Krafusur (1985). Soit D_0 la valeur du déséquilibre de liaison entre les deux locus à la première génération, soit r la probabilité de recombinaison entre les locus et $(1-r)$ la probabilité qu'il n'y ait pas recombinaison, on a la relation suivante :

$$D_1 = (1-r) D_0$$

Par récurrence on obtient la relation ci-dessous :

$$D_t = (1-r)^t D_0$$

D_t est le déséquilibre de liaison à la génération t .

Tous les calculs et les tests décrits ont été réalisés à l'aide du logiciel GENETIX 3.3 (Belkhir *et al.*, 1996).

2.3. Résultats

Le marqueur mitochondrial

La technique de PCR-RFLP appliquée au fragment d'ADN du gène de la Cytochrome Oxydase I, permet d'associer à chaque individu, quatre couples "enzyme/fragment de restriction" désignés par des lettres minuscules sur la figure 2 (les lettres correspondent, dans l'ordre, aux résultats des digestions par *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI*). La combinaison des différents profils obtenus permet de définir six haplotypes désignés par une lettre majuscule sur la figure 2.

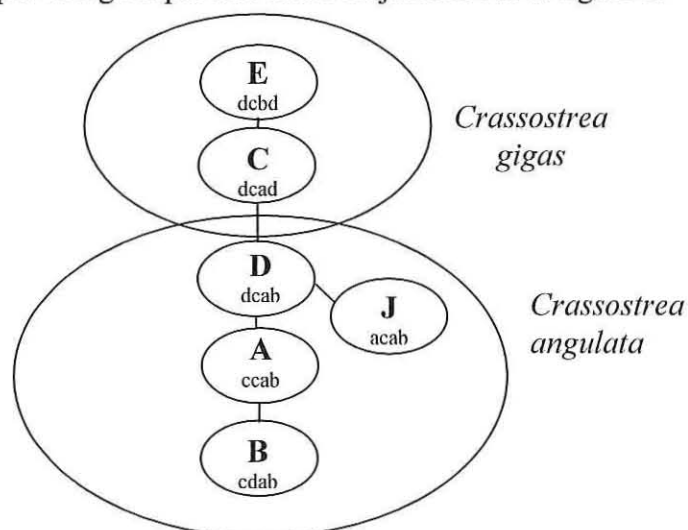


Figure 2. Schéma présentant les haplotypes obtenus par PCR-RFLP à partir des produits d'amplification de COI avec quatre enzymes de restriction *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI* et taxon associé aux haplotypes (d'après Boudry *et al.*, 1998)

Une relation a été établie (Boudry *et al.*, 1998) entre ces haplotypes et les deux taxons d'huîtres creuses. Ainsi, les types A, B, D et J semblent associés à *C. angulata* et les haplotypes C et E correspondraient à *C. gigas*, comme indiqué sur la figure 2. Les huîtres prélevées sur le terrain sont classées provisoirement dans l'un ou l'autre des taxons, avant toute analyse, en fonction de leur provenance géographique et des connaissances recueillies sur les populations. La référence taxonomique prise dans la suite de ce rapport correspond à celle établie à partir de ce marqueur mitochondrial. Les populations SEU, de la côte ouest de la France, et MIR, au sud du Portugal, serviront de référence pour la suite de l'étude car on connaît leur composition génétique grâce à des études antérieures. SEU, avec 97% d'haplotype C et 3% d'haplotype E est composée de 100% de *C. gigas*, alors que MIR, monomorphe pour l'haplotype A, est *C. angulata*.

Le tableau III présente les fréquences de chacun des six haplotypes par population. L'un des haplotypes domine dans chaque population. L'haplotype C est majoritaire sur l'ensemble des populations avec, par exemple, 98% pour ORI et 94% pour VIC. TAR, RIB et BOU sont les populations les plus polymorphes avec trois ou quatre haplotypes différents alors qu'il y a en moyenne, deux haplotypes par population. Les fréquences supérieures à 0,75 sont en gras dans le tableau III. Les deux populations en gras sont les populations de référence.

Tableau III. Fréquences des différents haplotypes par population au locus COI

Population	Haplotypes						Effectif
	A	B	C	D	E	J	
SEU			0,97		0,03		42
OGA			0,96		0,04		46
ORI			0,98		0,02		50
ISL			1				47
RIB	0,04		0,93		0,03		45
CAS			1				43
VIC			0,94		0,06		50
BOU	0,06		0,89		0,03	0,01	95
TAR	0,75		0,15			0,05	40
MIR	1						30
KAO	0,9	0,07				0,03	40

La structuration génétique des populations pour le locus COI a été étudiée avec l'indice *thêta*. Le *Fst* intrataxon est 0,03 pour les populations *C. gigas* et 0,044 pour les populations *C. angulata*. Le *Fst* intertaxon (*Fst* = 0,687) est beaucoup plus élevé que ceux calculés intrataxon. Ces valeurs de *Fst* confirment le fait que ce locus constitue un bon marqueur diagnostique des taxons *C. gigas* et *C. angulata*. Cependant, pour étudier la variabilité des populations de deux taxons aussi proches, il faut des marqueurs plus variables.

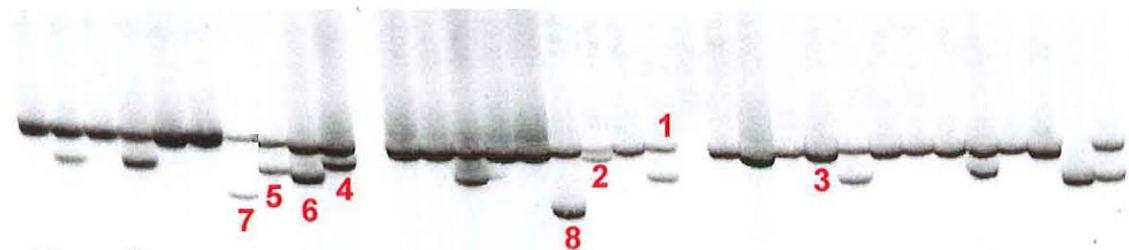
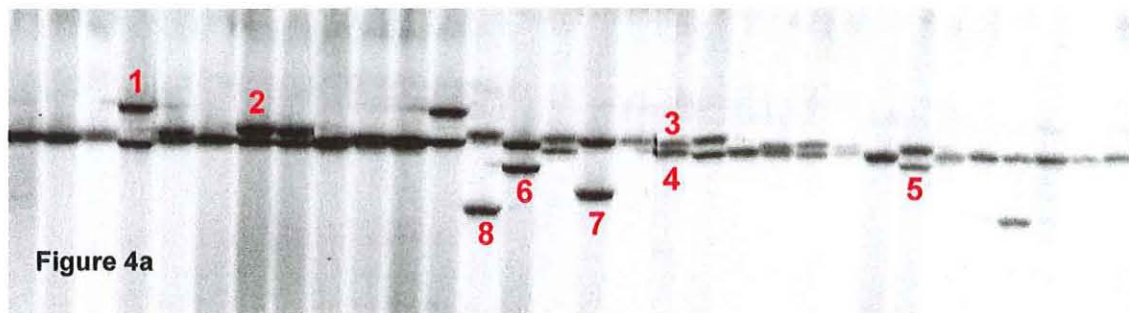
Les marqueurs nucléaires

Les quatre marqueurs suivants n'avaient jamais été utilisés sur des huîtres creuses *C. gigas* ou *C. angulata*. Après une phase technique de mise au point, une première analyse de ces locus a été faite sur les deux populations de référence SEU et MIR. Suivant le degré de spécificité de chaque marqueur et l'information apportée, l'étude a été étendue à l'ensemble des populations ou non.

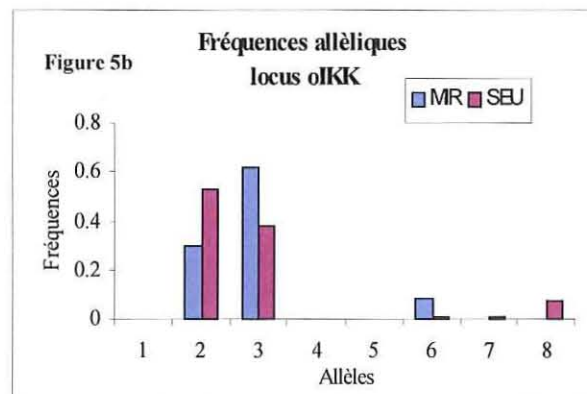
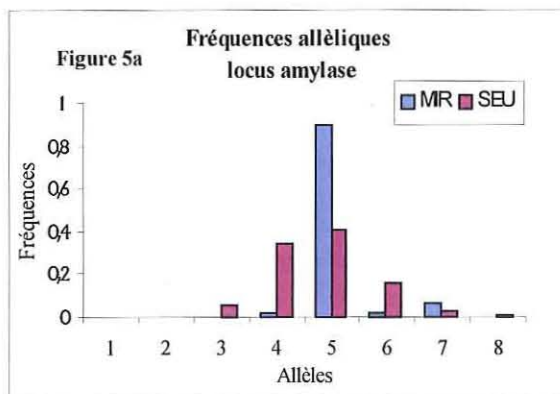
Marqueurs introniques, amylase et oIKK

Tous les allèles d'un locus donné sont répertoriés grâce à la lecture des photos de gel de polyacrylamide (figures 4a et 4b). Les allèles sont numérotés en commençant par le numéro un pour l'allèle le plus haut et en incrémentant d'une unité à chaque nouvel allèle rencontré. Les numéros des allèles sont indiqués en rouge sur la figure.

Figures 4a et 4b. Photos de gel de polyacrylamide 6% après migration des allèles du locus amylase (a) et oIKK (b). Les numéros des allèles sont indiqués en rouge.



La seconde étape consiste à analyser la distribution des fréquences alléliques dans les populations de référence (figures 5a et 5b) pour savoir s'il existe des allèles spécifiques de *C. gigas* (SEU) ou de *C. angulata* (MIR).



Figures 5a et 5b. Répartition des fréquences alléliques aux locus amylase (a) et oIKK (b) dans les populations de référence SEU (N=46) et MIR (N=30)

Les distributions obtenues pour les locus amylase et oIKK ne permettent pas de séparer les deux populations. En effet, les allèles dominants sont les mêmes dans les deux populations pour chaque locus, l'allèle 5 est dominant pour amylase et les 2 et 3 le sont pour oIKK.

Le taux de polymorphisme, représenté par le nombre moyen d'allèles par population, est de 6 au locus amylase et 7 au locus oIKK. Ces locus sont plus variables que le marqueur mitochondrial

mais moins polymorphes que les microsatellites, très informatifs car hypervariables. Par exemple, le locus microsatellite CG44 (Magoulas *et al.*, 1998) compte en moyenne 23 allèles par population (Huvet, soumis). Il était donc intéressant de savoir quelle information ces marqueurs introniques allaient fournir sur la structure nucléaire des populations. Les deux locus ont été analysés dans sept autres populations pour estimer la variabilité intrapopulation et interpopulation.

Tableau IV. Fréquences alléliques aux locus amylase et oIKK

	Locus amylase										Locus oIKK										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
RIB			0,05	0,25	0,6		0,06	0,02		0,01	0,01	0,02	0,44	0,41	0,03	0,01	0,03	0,04	0,01	0,01	
ORI		0,02		0,06	0,71		0,1	0,03	0,01		0,01		0,17	0,62	0,02	0,01	0,02	0,03	0,11	0,01	
ISL				0,18	0,76	0,01	0,04						0,3	0,5	0,04	0,03	0,02	0,04	0,01	0,04	
CAS			0,05	0,23	0,53	0,1	0,06	0,03				0,01	0,33	0,48	0,02	0,04	0,02	0,04	0,04		
VIC			0,03	0,13	0,67		0,02	0,11		0,02	0,01		0,23	0,61			0,06	0,02	0,04	0,01	0,02
BOU		0,03	0,02	0,09	0,78		0,06			0,01	0,01	0,01	0,27	0,54	0,01	0,02	0,02	0,02	0,06		0,04
TAR	0,01		0,05	0,19	0,66		0,07	0,01					0,36	0,48	0,01	0,01	0,07	0,02	0,04		

La distribution des fréquences alléliques répertoriées dans le tableau IV indique que ces locus ont un ou deux allèles fréquents alors que les autres allèles sont rares. Les fréquences supérieures à 0,25 sont indiquées en caractères gras. Les valeurs d'hétérozygoties attendues et observées ainsi que l'écart aux conditions d'équilibre de Hardy Weinberg (*Fis*) et un test de significativité, avec hypothèse nulle $Fis = 0$, sont donnés par population dans le tableau V.

Tableau V. Hétérozygoties moyennes attendues (*Hnb*) et observées (*Ho*); écart type (\pm); calcul de *Fis* aux locus amylase et oIKK ; probabilité associée au test de significativité

Population	<i>Hnb</i>	<i>Ho</i>	Valeur de <i>Fis</i>		
			Amylase	oIKK	Amylase + oIKK
RIB	0,61 \pm 0,05	0,37 \pm 0,05	0,308***	0,487***	0,400***
ORI	0,53 \pm 0,06	0,38 \pm 0,05	0,295**	0,274**	0,280***
ISL	0,52 \pm 0,19	0,24 \pm 0,07	0,502**	0,565***	0,540***
CAS	0,65 \pm 0,02	0,33 \pm 0,04	0,440***	0,558***	0,500***
VIC	0,54 \pm 0,03	0,31 \pm 0,06	0,335***	0,537***	0,440***
BOU	0,51 \pm 0,18	0,33 \pm 0,04	0,217*	0,443***	0,360***
SEU	0,64 \pm 0,08	0,26 \pm 0,17	0,449***	0,757***	0,590***
TAR	0,57 \pm 0,09	0,38 \pm 0,16	0,004	0,577***	0,320***
MIR	0,36 \pm 0,24	0,19 \pm 0,02	-0,064	0,679***	0,490***

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, pas d'indication : $p > 0,05$

Toutes les populations ont un taux d'hétérozygotie observé inférieur à celui calculé sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy et Weinberg. Le test statistique sur le déficit en hétérozygotes réalisé avec le calcul de *Fis* selon la méthode de Weir et Cockerham (1984) met en évidence des valeurs extrêmement fortes. Les *Fis* pour les deux locus réunis sont comprises entre 0,590 (SEU) et 0,280 (ORI). En calculant les *Fis* par locus, on observe les mêmes résultats au locus oIKK avec un déficit en hétérozygotes significatif pour l'ensemble des populations et des valeurs comprises entre 0,274 (ORI) et 0,757 (SEU). Par contre, les résultats sont plus nuancés pour le locus amylase avec deux *Fis* non significativement différents de zéro pour TAR et MIR et une valeur négative pour MIR indiquant un excès en hétérozygotes. Le calcul du *Fst*,

indice de fixation qui indique le niveau de structuration des populations est en moyenne de 0,035 par paire de populations avec des valeurs allant de 0 à 0,176. Cependant, ces valeurs doivent être biaisées par des *Fis* trop importants et ne sont donc pas réellement informatives.

Marqueur nucléaire anonyme, DALP 233

Ce marqueur a été étudié sur les deux populations de référence SEU et MIR afin d'avoir des éléments de comparaison avec les résultats obtenus sur les autres marqueurs. Sur les deux paires d'amorces testées, seule DALP233 a été utilisée. Les premières amplifications ont permis de faire la mise au point des conditions expérimentales. Le couple d'amorces DALP235 n'a donné aucun résultat d'amplification. Deux des raisons pouvant expliquer cette absence d'amplification sont soit des conditions de PCR trop sélectives, soit la séquence récupérée sur le gel d'acrylamide et utilisée pour faire les amorces n'était pas assez conservée pour permettre l'accrochage des amorces. Aucun essai supplémentaire n'a été fait avec ces amorces. La diversité génétique estimée par le nombre moyen d'allèles au locus DALP233 est de 7,5 allèles par population. Leur répartition est représentée sur la figure 6.

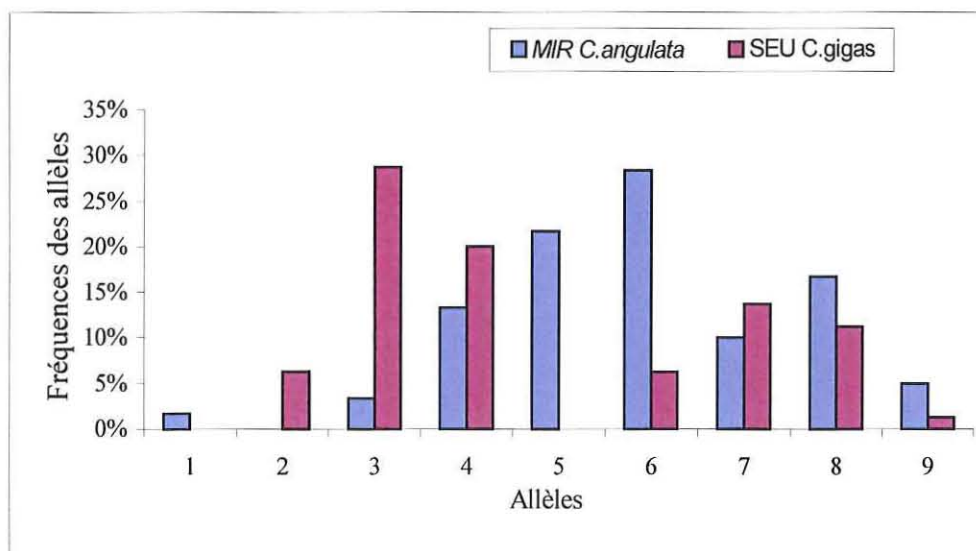


Figure 6. Fréquences alléliques au locus DALP233 dans les populations SEU (N = 46) et MIR (N =30)

Dans les deux populations testées, l'allèle 4 est spécifique de *C.angulata* mais tous les autres sont présents dans les deux taxons. Les hétérozygoties attendues et observées sont respectivement 0,83 et 0,42 pour SEU et 0,82 et 0,43 pour MIR. Le calcul du *Fis* montre un écart à l'équilibre de Hardy et Weinberg significatif égal à 0,49 pour SEU et à 0,48 pour MIR et un *Fst* faible mais également significatif de 0,055.

Insertion dans une séquence microsatellite, marqueur nucléaire CG44R

Les individus des populations MIR et SEU, dont on connaît le taxon, sur la base de l'analyse mitochondriale, ont servi à la mise au point des conditions expérimentales et à vérifier s'il y avait ou non spécificité du marqueur CG44R.

Les individus "témoins" ont confirmé l'existence d'une relation entre le génotype au marqueur CG44R et le taxon défini par le marqueur mitochondrial. Trois phénotypes sont observés sur gel d'agarose : NC pour "non coupé", il correspond à une bande haute de 250 à 350 pb, C pour "coupé" représenté par deux bandes basses d'environ 175 pb (correspondant à la coupure du fragment par l'enzyme *BsrGI*) et enfin "NC/C" car le marqueur étant codominant, les individus hétérozygotes présentent une bande haute et une bande basse. Les trois génotypes sont visibles sur la figure 7, photo sous rayons UV du résultat d'une migration en gel d'agarose (pendant 30 min à 150V) après digestion par *BsrGI*. La longueur de la séquence microsatellite amplifiée peut varier dans un intervalle de 86 pb, ces différences de taille sont visibles en gel d'agarose, notamment pour les allèles "NC".

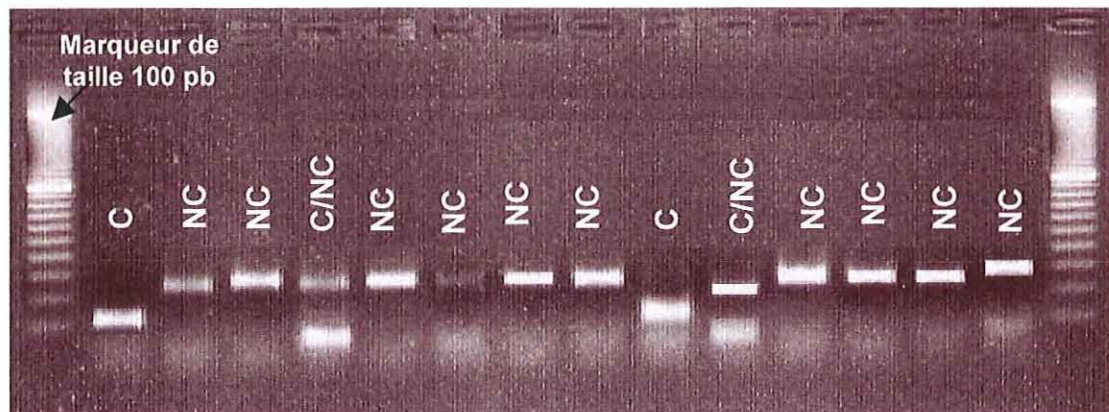


Figure 7. Photo de gel d'agarose après migration de fragments amplifiés de CG44R et digestion par *BsrGI*.

Cinq populations définies comme "pures", *C. gigas* ou *C. angulata*, au locus mitochondrial, et deux en mélange ont alors été étudiées. La répartition des fréquences alléliques est représentée sur la figure 8 pour chaque population.

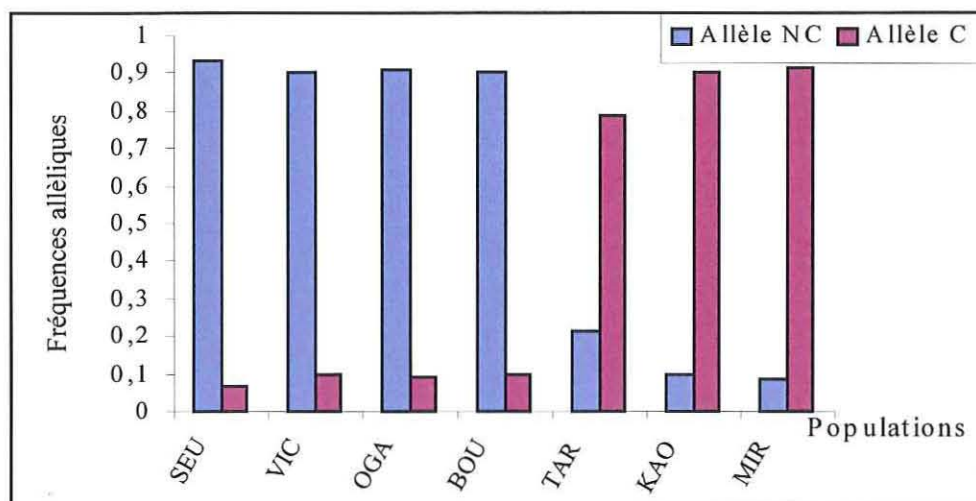


Figure 8. Diagramme populations / fréquences alléliques au locus CG44R

Les populations VIC, SEU, BOU et OGA sont composées à 90% d'allèles NC et à 10% d'allèles C et la répartition est inversée pour les populations MIR et KAO. La seule population dont les

fréquences alléliques varient est TAR avec 21% pour l'allèle C et 79% pour l'allèle NC. C'est aussi la seule en mélange non négligeable au locus COI.

L'insertion CG44R se trouvant juste en amont de la séquence microsatellite CG44, un calcul de déséquilibre de liaison a été estimé entre ces deux marqueurs (CG44 et CG44R) sur cinq populations. Dans ce cas, le déséquilibre de liaison calculé n'est pas physique mais génétique. Ainsi, deux allèles physiquement liés peuvent devenir génétiquement indépendants si le taux de recombinaison entre les deux est important. Le taux de recombinaison entre deux allèles liés augmente avec le nombre de générations, c'est-à-dire avec le nombre de méioses. Le tableau VI résume les valeurs obtenues.

Tableau VI. Coefficients de corrélation associés aux tests de déséquilibre de liaison entre les allèles de CG44 et CG44R

Population	SEU	OGA	BOU	MIR	KAO
Déséquilibre de liaison	0,16	0,16*	0,14	0,21*	0,15

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, pas d'indication : $p > 0.05$

Les valeurs des coefficients de corrélation sont faibles et significatives seulement pour deux populations. La valeur calculée pour l'ensemble des populations est 0,12. Elle n'est pas significativement différente de zéro. On ne peut donc pas conclure à l'existence d'un déséquilibre de liaison entre les allèles de la séquence microsatellite et les allèles de l'insertion. Comme pour les autres marqueurs, les taux d'hétérozygotie (H_o et H_{nb}), l'écart des populations à l'équilibre de Hardy et Weinberg (F_{is}) ont été calculés et un test de significativité a été réalisé. Les valeurs sont répertoriées dans le tableau VII.

Tableau VII. Hétérozygoties moyennes observées (H_o) et attendues (H_{nb}) par population et indice F_{is} au locus CG44R

Population	H_o	H_{nb}	F_{is}
VIC	0.17	0.19	0.141
SEU	0.10	0.19	0.452*
OGA	0.16	0.25	0.380**
BOU	0.14	0.17	0.184
TAR	0.30	0.34	0.116
MIR	0.17	0.16	-0.074
KAO	0.22	0.20	-0.114

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, pas d'indication : $p > 0.05$

Les valeurs de F_{is} observées sont en moyenne plus faibles que pour les autres marqueurs nucléaires et seulement deux populations présentent des valeurs significativement différentes de zéro.

2.4. Discussion

Les études sur le polymorphisme enzymatique, sur les allozymes ou de caryotype réalisées sur *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* ne mettent pas en évidence de différences significatives entre les deux taxons. Les marqueurs nucléaires, amylase, oIKK et DALP233,

utilisés au cours de cette étude, montrent une faible différenciation entre les différentes populations échantillonnées. Des flux de gènes naturels ou créés par les activités ostréicoles pourraient être à l'origine de la faible différenciation observée. Cependant, l'homogénéité révélée par les marqueurs pourrait aussi être due à une absence de signal dans les régions du génome étudiées. Les résultats obtenus avec le marqueur mitochondrial spécifique COI sont, à priori, contradictoires avec les précédents car ils mettent en évidence une forte structuration des populations. Le marqueur pseudo-spécifique nucléaire, CG44R, fournit des résultats concordants avec l'analyse mitochondriale et ils permettent d'étudier les phénomènes d'hybridation entre les deux taxons. Ainsi, seuls les marqueurs des régions génomiques présentant une divergence entre *C. gigas* et *C. angulata* permettent de mettre en évidence une structuration des populations. Les autres marqueurs ne révèlent aucun signal. L'analyse des résultats obtenus avec les deux marqueurs spécifiques ont permis de formuler des hypothèses concernant l'histoire des populations européennes.

Structuration génétique des populations de *C. gigas* et de *C. angulata*

La variation génétique entre les différentes populations européennes échantillonnées a été étudiée par des marqueurs introniques polymorphes, amylase et oIKK et par le marqueur anonyme DALP233. Le polymorphisme auquel on s'intéresse est par conséquent un polymorphisme supposé neutre suivant la théorie de Kimura, c'est-à-dire que les locus ayant des mutations silencieuses ne sont pas sélectionnés et qu'ils évoluent sous l'influence de la dérive. Les valeurs moyennes de F_{st} observées (F_{st} (amylase, oIKK) = 0,035 et (DALP233) = 0,055) ne mettent pas en évidence une structuration génétique significative entre les différentes populations. Ces résultats sont concordants avec les études faites sur des marqueurs microsatellites hypervariables (Huvet *et al*, soumis) et sur des locus enzymatiques (Mattiucci et Villani, 1983 et Moraga, 1989). L'observation de cette homogénéité génétique entre des populations distantes au minimum de 70 km (entre VIC et CAS en linéaire côtier) et au maximum de 2000 km (entre SEU et TAR) pourrait être expliquée par des flux géniques entre les différentes populations européennes.

L'existence d'un flux génique implique des événements de migration des huîtres d'une population à l'autre. Deux types de flux peuvent être envisagés (Ozaki et Fujio, 1985). Le premier est un flux génique naturel entre les populations et le second est un flux génique artificiel créé par le transport d'huîtres creuses d'une région ostréicole à l'autre. La dispersion se fait par les gamètes et les larves dans le premier cas et par des individus adultes dans le second. La capacité de dispersion des larves de mollusques est très importante (Cameron, 1986 et Butman, 1987), elle peut dépasser la centaine de kilomètres. Ces deux hypothèses sont valables pour les populations françaises et espagnoles car la disposition des populations échantillonnées est régulière et la distance maximale entre deux populations est de 225 km (entre Seudre et Vieux Boucau). Par contre, l'existence d'un flux génique entre les populations du nord de l'Espagne et du sud du Portugal est peu envisageable. En effet, une zone qui s'étend de La Corogne (pointe nord est de l'Espagne) jusqu'à Porto (ouest du Portugal) est dépourvue d'huîtres creuses et il semble peu probable que les larves passent cette zone sans jamais s'y établir. De plus, la distance entre Vicedo et Rio Mira, supérieure à 800 km est à la limite de la capacité migratoire, connue, des larves. Des phénomènes hydrodynamiques ou écologiques pourraient être à l'origine de cette absence d'huître. Ainsi, des courantstidaux ou de surface empêchent peut-être l'installation des larves dans cette zone ou le substrat pourrait ne pas convenir à la fixation des larves. Cette dernière explication est peu satisfaisante car des huîtres plates (*Ostrea edulis*) ainsi que des moules (*Mytilus edulis*) sont présentes dans cette région. Les conditions écologiques ne semblent donc pas défavorables à l'installation des bivalves. En résumé, s'il existe actuellement un flux génique entre le nord de l'Espagne et le sud du Portugal, il n'est pas naturel.

Un troisième cas de figure envisageable pour expliquer l'homogénéité des populations est un flux de gènes ancestral, en Asie, antérieur à l'importation des huîtres creuses en Europe (Grizel, 1996). Introduites en Europe, ces huîtres auraient ensuite formé des populations isolées. Nous pouvons penser que la dérive qui s'est opérée depuis est trop faible pour que la divergence créée entre les populations soit mise en évidence par les marqueurs moléculaires utilisés.

Outre la faible différenciation génétique révélée par ces marqueurs, nous observons de forts déficits en hétérozygotes pour l'ensemble des échantillons. Les déficits en hétérozygotes sont couramment observés dans les populations de bivalves marins (Zouros et Foltz, 1984). Pourtant, ce phénomène paraît étonnant quand on considère les caractéristiques biologiques et écologiques de ces animaux. En effet, l'importance des effectifs des populations, le grand nombre de gamètes et de zygotes produits, ainsi que l'existence de formes de dispersion gamétiques et larvaires sont autant de propriétés qui pourraient permettre de remplir les conditions nécessaires pour parvenir à l'équilibre de Hardy et Weinberg. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces observations. Tout d'abord, nous pouvons envisager l'existence d'un effet Wahlund (mélange de populations de fréquences alléliques différentes) mais dans ce cas, les valeurs moyennes de F_{is} ($F_{is} = 0,43$) seraient proches des valeurs moyennes de F_{st} ($F_{st} = 0,035$) or, elles sont plus de dix fois supérieures. L'effet Wahlund ne doit donc pas jouer un rôle majeur dans cette situation. Nous pouvons également envisager des phénomènes de consanguinité mais les déficits en hétérozygotes seraient alors aussi importants pour tous les locus. Or, ils sont beaucoup plus faibles, voire inexistant, pour le locus CG44R. L'existence d'allèles nuls ou non visibles (Pemberton *et al.*, 1995) pourrait expliquer une partie du déficit en hétérozygotes. Les allèles nuls sont générés soit par des mutations dans les séquences des régions homologues aux amorces de PCR, soit par des artefacts expérimentaux. On peut aussi émettre l'hypothèse d'une liaison génétique du marqueur avec les exons des gènes proches qui seraient sélectionnés mais il est rare que les hétérozygotes soient contre sélectionnés. Ces valeurs de F_{is} anormalement élevées peuvent introduire un biais dans les calculs de F_{st} .

Cette première série de marqueurs ne révèle pas de signal interpopulations car les populations ont trop peu divergé depuis leur séparation malgré leur isolement géographique. Etant donné la similitude génétique entre *C. gigas* et *C. angulata*, seuls des marqueurs spécifiques nucléaires permettent d'étudier la composition taxonomique intrapopulation et de révéler la présence d'hybrides.

Hybridation naturelle entre *C. gigas* et *C. angulata*

L'une des principales questions que nous nous sommes posées sur les populations européennes d'huîtres creuses de l'espèce *Crassostrea gigas* concerne les phénomènes d'hybridation entre les deux sous-espèces *C. gigas* et *C. angulata*. Les deux populations de références Seudre (SEU) et Rio Mira (MIR) ont une composition haplotypique pure, toujours déterminée par l'analyse mitochondriale. En effet, tous les individus provenant de la Seudre appartiennent au taxon *C. gigas* et tous ceux récoltés à Rio Mira au taxon *C. angulata*. Leur répartition géographique correspond respectivement aux limites nord et sud de la zone d'échantillonnage. Ainsi, il était intéressant d'étudier la composition des populations géographiquement intermédiaires. Nous pouvions nous attendre à observer des mélanges entre les deux taxons. Des études menées sur les moules révèlent la présence de zones d'hybridation en patchs entre *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* le long des côtes françaises (Cousteau *et al.*, 1991).

Les résultats obtenus avec le marqueur mitochondrial COI sont forts différents de ceux envisagés par l'analyse des marqueurs nucléaires précédents. En effet, ils indiquent qu'à l'exception de Tavira (TAR) qui est en mélange conséquent ; de Ribadessella et de Vieux Boucau qui montrent des "traces" de mélange, le reste des échantillons n'ont que des haplotypes associés à *C. gigas*. Cette absence de mélange est inattendue étant donné les capacités de dispersion des mollusques

évoquées dans la partie précédente, avec des phases de dispersion larvaires importantes. De plus, *C. angulata*, l'huître portugaise était présente au sud de l'Europe dès le 16^{ème} siècle et il est surprenant de ne pas en trouver davantage en Espagne alors qu'elle est présente au Portugal.

Les fréquences haplotypiques calculées montrent des "traces" de *C. angulata* au travers des haplotypes "A" dans la population espagnole de Ribadessela (RIB) et dans la population basque de Vieux Boucau (BOU) aux fréquences respectives de 0,04 et 0,06. Nous pouvons nous demander si l'absence des haplotypes associés à *C. angulata* dans les autres populations est réellement due à leur absence dans le milieu naturel ou si c'est un biais causé par un effectif d'échantillonnage trop faible pour mettre en évidence la présence sporadique de ces allèles. Dans les deux cas, ces résultats sont en accord avec l'absence de flux génique actuel entre le sud du Portugal et le nord de l'Espagne car s'il existait, les individus *C. angulata* seraient plus nombreux au nord de l'Espagne. Par contre, ils semblent révéler l'existence d'un polymorphisme ancestral. Les quelques individus ayant des haplotypes associés à *C. angulata* indiquent que cette sous-espèce était présente dans le passé.

Dans l'interprétation des résultats, nous devons souligner le fait que nous travaillons sur un marqueur mitochondrial aux propriétés particulières. En effet, le génome mitochondrial est haploïde, sa transmission est maternelle et il ne recombine pas (Boursot et Bonhomme, 1986). Pour toutes ces raisons, sa taille effective est réduite par rapport à celle du génome nucléaire, ce qui le rend plus sensible aux phénomènes de dérive génétique, de goulot d'étranglement ou de mutation. Ces propriétés font de ce locus mitochondrial un bon outil de comparaison entre deux taxons proches. Mais du fait de l'haploïdie, il ne permet pas d'étudier les phénomènes d'hybridation. Ainsi, si l'analyse du génome cytoplasmique met en évidence la coexistence des deux sous-espèces dans trois des sept populations étudiées, il ne permet pas de savoir s'il existe de l'hybridation dans ces populations en mélange. Seule l'étude du génome nucléaire permettait de répondre à cette question.

L'analyse faite par la suite avec le nouveau marqueur pseudo-spécifique CG44R met en évidence le même schéma taxonomique que celui obtenu précédemment, à savoir une séparation nette entre les populations décrites comme *C. gigas* ou *C. angulata* par le marqueur COI. On parle de marqueur pseudo-spécifique car les populations définies comme pures *C. gigas* au niveau mitochondrial ont des fréquences alléliques de 0,9 pour l'allèle "NC" et 0,1 pour l'allèle "C" et les populations définies comme pures *C. angulata* au niveau mitochondrial ont des fréquences alléliques inverses, à savoir 0,1 pour l'allèle "NC" et 0,9 pour l'allèle "C". Comme pour le marqueur mitochondrial, la population de Tavira a des fréquences alléliques intermédiaires entre les deux distributions décrites ci-dessus. Ces fréquences sont 0,25 pour l'allèle "NC" et 0,75 pour l'allèle "C". Ainsi, les analyses du génome mitochondrial et celle du génome nucléaire sont concordantes et indiquent qu'il existe une seule population réellement en mélange parmi les neuf échantillonnées en Europe. Ces données permettent de conclure à des phénomènes d'hybridation et plus seulement à de la sympatrie car ils mettent en évidence la présence d'individus hétérozygotes *C. gigas* / *C. angulata*. Avant l'introduction de *C. gigas*, *C. angulata* était le taxon majoritairement présent au Portugal. Depuis quelques années, une activité ostréicole se développe dans la région de Tavira. L'hybridation observée dans ce site est certainement le résultat de la mise en présence des *C. gigas* de culture avec les *C. angulata* déjà présentes dans cette zone. Ainsi, des croisements ont lieu entre les deux taxons lorsqu'ils sont mis en contact. D'autres populations échantillonnées se trouvent près de zones ostréicoles comme Castropol (CAS) ou Seudre (SEU) mais dans ces cas là, l'activité est plus ancienne qu'au sud Portugal et le taxon *C. angulata* semble être absent de ces populations. L'omniprésence actuelle des individus *C. gigas* dans presque toutes les populations échantillonnées doit être mise en relation avec l'importance de l'activité ostréicole. Il ne faut pas perdre de vue que les huîtres *C. gigas*, à la base des cultures, ont été introduites du Japon à partir de 1971 (Grizel et Héral, 1991) et que ce sont aussi ces huîtres que l'on retrouve dans les populations étudiées. *C. angulata* est présente depuis plus longtemps en Europe mais c'est aussi une espèce introduite. Le terme populations naturelles

n'est donc pas approprié ici, il serait préférable d'employer le terme semi-naturelles ou pseudo-naturelles ou encore naturalisées. Une des hypothèses qui pourrait expliquer la dominance des *C. gigas* dans les populations serait un phénomène de fertilisation préférentielle par les individus *C. gigas*, par rapport à *C. angulata*. Des études menées sur des embryons (Huvet *et al.*, in press) révèlent une contribution plus importante que celle attendue des mâles *C. gigas*, pour la fécondation des femelles *C. angulata*. Ajouté à cela sa rusticité et son fort potentiel biologique, *C. gigas* semble réunir des caractères qui pourraient en faire une espèce proliférante. Tavira serait alors dans une situation intermédiaire entre la phase initiale du début de la colonisation de la population *C. angulata* par des individus *C. gigas* et la dominance totale de ces dernières entraînant la disparition des *C. angulata* dans les populations.

Pour comprendre la situation actuelle des populations européennes nous pouvons émettre des hypothèses sur l'évolution du marqueur CG44R.

Hypothèses sur l'évolution du marqueur CG44R

Nous supposons que l'insertion de la séquence CG44R, en amont du microsatellite CG44, est un événement unique qui s'est produit dans un seul taxon. La mutation se serait produite chez un individu *C. angulata* car 90% des individus définis comme *C. angulata*, au niveau mitochondrial, portent l'allèle "C". La constance dans les fréquences alléliques, 0,1 et 0,9 pour toutes les populations définies comme pures par le marqueur COI est surprenante. Ces résultats suggèrent plusieurs hypothèses. Pour expliquer que les deux allèles soient présents dans toutes les populations, il faut envisager l'existence d'un mélange. Cependant, s'il existait un flux génique actuellement en Europe, nous pouvons penser que le mélange des allèles serait plus important, comme c'est le cas pour Tavira. De plus, il serait révélé par le marqueur COI, excepté si ce flux est trop faible pour être mis en évidence. Mais cette dernière hypothèse est peu probable étant donné les caractéristiques biologiques des huîtres. Nous pouvons envisager l'existence d'un flux génique ancestral, antérieur à l'introduction des huîtres en Europe. Cette idée est soutenue par l'analyse du locus CG44R dans deux populations asiatiques. Les fréquences des allèles "C" et "NC" sont respectivement 0,9 et 0,1 pour KAO (Taiwan) une population pure *C. angulata* (au locus mitochondrial) et 0,1 et 0,9 pour OGA (Japon) pure *C. gigas*. La répartition des allèles en fonction du taxon est donc la même pour les populations européennes et pour les populations asiatiques.

A partir de ces données, nous pouvons établir un scénario retraçant l'histoire des marqueurs mitochondrial (COI) et nucléaire (CG44R). Partons de l'époque de l'existence d'un ancêtre commun à *C. gigas* et *C. angulata*, juste avant la divergence. Des études ont estimé la divergence entre *C. gigas* et *C. sikamea*, deux espèces proches, au pliocène il y a 2 millions d'années (Banks *et al.*, 1994). De plus, nous savons que *C. gigas* est génétiquement plus proche de *C. angulata* que de *C. sikamea* (Gaffney et Allen, 1993). La divergence entre nos deux sous-espèces a été estimée entre un à deux millions d'années (ÓFoighil *et al.*, 1998). Une glaciation au pléistocène aurait entraîné une régression des océans autour du Japon et la formation de ponts de terre infranchissables par les organismes marins (Durham, 1963). Ces événements géologiques ont généré la cladogenèse de nombreuses espèces par isolement géographique (Majima, 1989). Cet isolement aurait pu avoir pour conséquence la divergence mitochondriale et nucléaire (mutation dans la séquence microsatellite) entre *C. gigas* et *C. angulata*. Lors de la fonte des glaces, les deux sous-espèces auraient pu être remises en contact. Des flux de gènes, établis sur une courte durée, auraient alors permis un faible mélange des deux taxons, ce qui expliquerait les fréquences alléliques 0,1 et 0,9 au locus CG44R. Pour que ces fréquences se soient maintenues au cours du temps nous pouvons imaginer une seconde séparation géographique "peu" de temps après la remise en contact. Les traces du mélange au niveau mitochondrial auraient disparu sous l'action de la dérive alors qu'elles seraient encore présentes dans une fraction du génome nucléaire. La dérive du génome mitochondrial est plus rapide car la taille effective des

"populations mitochondriales" est plus petite. Les populations européennes ayant été constituées à partir d'huîtres importées du Japon, les proportions de 0,1 d'allèles "C" dans les populations *C. gigas* et "0,1" d'allèle NC dans les populations *C. angulata* ont été conservées, d'une part par absence de flux génique et d'autre part parce que le temps écoulé depuis l'introduction de ces huîtres en Europe est trop court pour que les effets de la dérive soient visibles.

L'analyse du marqueur CG44R peut nous fournir d'autres indications sur les événements moléculaires qui ont eu lieu à ce locus. Le calcul du déséquilibre de liaison entre le microsatellite CG44 et l'insertion CG44R, située juste en amont, ne montre pas de déséquilibre de liaison entre les deux locus. Ce résultat pourrait être interprété en terme de temps écoulé depuis l'apparition de l'insertion. Ceci reviendrait à dater approximativement cette mutation. En effet, plus le nombre de générations passées depuis l'événement de mutation est grand plus la probabilité de recombinaison entre les locus est grande et plus le déséquilibre de liaison diminue. Cependant, une condition nécessaire pour réaliser cette datation est de pouvoir estimer les vitesses relatives d'évolution des deux locus. La séquence microsatellite hypervariable évolue beaucoup plus rapidement que l'insertion. Ces données permettent peut être de donner une estimation de l'époque de la divergence entre les deux taxons *C. gigas* et *C. angulata* pour cette partie du génome.

2.5. Conclusions

La situation actuelle de la répartition des deux sous-espèces d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata*, en Europe, établie par cette étude, est la suivante : des phénomènes d'hybridation naturelle entre les deux taxons ont été mis en évidence au Portugal, dans la région de Tavira. Ainsi, l'hybridation naturelle entre *C. gigas* et *C. angulata* existe le long des côtes européennes. Cependant, elle n'est présente que dans les régions où les activités humaines ont mis les deux taxons en contact. En France et en Espagne, les populations échantillonnées ne sont constituées que par le taxon *C. gigas*, excepté 3 individus *C. angulata* sur 357 analysés et la différenciation génétique observée est très faible.

Les huîtres *C. gigas* se sont largement répandues en Europe depuis leur introduction à partir de 1971. Au vu des résultats de cette étude, nous nous interrogeons sur la pérennité de la sous-espèce *C. angulata*.

- Ce taxon ne risque-t-il pas de disparaître d'Europe ? Il serait intéressant d'établir un suivi des populations européennes afin de connaître l'évolution des deux sous-espèces dans les zones déjà échantillonnées, en considérant les importations grandissantes de *C. gigas* dans le sud de l'Europe.
- De plus, ne faudrait-il pas développer des programmes de conservation de souches pour des espèces telle *C. angulata* dont la survie semble aujourd'hui menacée ?

A la suite de ces travaux, il serait intéressant de réaliser une étude équivalente en Asie. *C. gigas* étant présente au Japon et *C. angulata* à Taiwan. Un site qu'il faudrait prospecter est la côte des îles Ryû-Kyû situées entre le Japon et Taiwan. Si les deux sous-espèces étaient présentes sur ces îles, ce serait un site idéal pour l'étude de l'hybridation naturelle entre *C. gigas* et *C. angulata*. Des connaissances sur la situation actuelle dans cette région permettraient aussi de retracer l'évolution des deux taxons.

Le marqueur CG44R, découvert au cours de cette étude, a constitué un outil moléculaire puissant pour l'étude de l'hybridation entre les deux taxons. Il nous a aussi permis de trouver des indications concernant l'histoire évolutive de l'espèce *Crassostrea gigas* en faisant un lien entre les populations européennes et asiatiques. L'une des perspectives de ce travail serait d'étudier le marqueur CG44R chez des espèces d'huîtres creuses phylogénétiquement proches de *C. gigas*, comme par exemple *C. sikamea*. Ces analyses constitueraient des données supplémentaires pour l'étude de l'évolution de ces espèces.

2.6. Bibliographie

- Banks M.A., McGoldrick D.J., Borgeson W. et Hedgecock D. (1994). Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. *Marine Biology*, 121 : 127 - 135
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L. et Bonhomme F. (1996). Genetix, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, Université de Montpellier II
- Black W.C. et Krafur E.S (1985). A FORTRAN program for the calculation and analysis of two-locus linkage disequilibrium coefficients. *Theoretical and Applied Genetics*, 70 : 491 - 496
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. et Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*, 32 : 314 - 331.
- Boudry P., Heurtebise S., Collet B., Cornette F. et Gérard A. (1998). Genetic differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226 : 279-291
- Boursot P. et Bonhomme F. (1986). Génétique et évolution du génome mitochondrial des métazoaires. *Genetic Selfish Evolution*, 18 : 73 -98
- Buroker N.E., Hershberger W.K. et Chew K.K. (1979). Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine biology*, 54 : 157-169
- Buroker N.E., Hershberger W.K. et Chew K.K. (1979). Populations genetics of the family Ostreidae. II. Intraspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Marine biology*, 54 : 171-184
- Butman C.A. (1987). Larval settlement of soft sediment invertebrates : the spatial scales of patterns explained by active habitat selection and the emerging role of hydrodynamic processes. *Oceanography Marine Biology Annual Review*. 25 : 113 - 165
- Cameron R.A. (1986). Introduction to the invertebrate larval biology workshop : a brief background. *Bull. Mar. Sci.*, 32 : 145 - 161
- Comps M. (1970). La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolution des altérations, processus de cicatrisation. *Revue des travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 34 : 23-44
- Comps M. (1972). Observations sur la résistance d'huîtres du genre *Crassostrea* au cours de la mortalité massive de 1970-1971 dans le bassin de Marennes Oléron. *ICES CM*, 22 pages.
- Cousteau C., Renaud F. et Delay B. (1991). Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. *Marine Biology*, 111 : 87-93
- Desmarais E., Lanneluc I. et Lagnel J. (1998). Direct amplification of length polymorphism (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*, 26 : 1458-1465

- Durham J.W. (1963). Paleogeographic conclusions in light of biological data. *Proc. of Pacific scientific congress*, 10 : 355 - 365
- Escoubas J.M., Briant L., Montagnani C., Hez S., Devaux C. et Roch P. (1999). Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Letters*, 453 : 293-298
- Folmer O., Black M., Hoech W., Lutz R. et Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase c subunit from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5) : 294 – 299
- Gaffney P.M. et Allen S.K. Jr. (1993). Hybridisation among *Crassostrea* species : a review. *Aquaculture*, 116 : 1-3
- Grizel H. (1996). Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 15 : 401 – 408
- Grizel H. et Heral H. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal du Conseil International pour l'Exploitation de la Mer*, 47 : 399-403
- Huvet A. (1997). Différenciation génétique de deux huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* : apport des marqueurs microsatellites. Rapport de DEA. 25 pages.
- Huvet A., Lapègue S., Magoulas A. et Boudry P. (2000). Mitochondrial and nuclear phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics* 1 : 251-262.
- Huvet A., Baladaud K., Bierne N. et Boudry P. Microsatellite analysis of 6-hour embryos reveals no preferential fertilization between two cupped oysters *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. *Marine Biotechnology (in press)*
- Leitão A., Boudry P. Labat J.P. et Thiriote-Quévieux C. (1999). Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia*, 41(1) : 175 - 186
- Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V. et Zouros E. (1998). Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics*, 29 : 63 – 72
- Majima R. (1989). Cenozoic fossil naticidae (Mollusca : Gasteropoda) in Japan. *Bulletin American de Paléontologie*, 96 : 1-159
- Mathers N.F., Wilkins N.P. et Walne P.R. (1974). Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2 : 453-456
- Mattiucci S. et Villani F. (1983). Studio elettroforico dei sistemi gene-enzima in ostriche classificate come *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) e *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (Mollusca : Ostreidae). *Parasitologia*, 25 : 21-27
- Menzel R.W. (1974). Portuguese and Japanese Oysters are the same species. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31 : 453-456
- Moal J., Daniel J.Y., Sellos D., Van Wormhoudt A., et Samain J.F. (2000). Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. *Journal of Comparative Physiology B*, 170 : 21-26
- Moraga D., Osada M., Lucas A. et Nomura T (1989). Génétique biochimique de populations de *Crassostrea gigas* (côte atlantique) et au Japon (Miyagi). *Aquatic living resources*, 2 : 135 134

- O'foighil D., Gaffney PM., Wilbur AE. et Hilbish TJ. (1998). Mitochondrial cytochrome oxydase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Marine Biology*, 131 : 497-503
- Ozaki O. and Fujio H. (1985). Genetic Differentiation in Geographical Populations of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku. Journal of Agriculture research*, 36 : 49 – 61
- Pemberton J.M., Slate J., Bancroft D.R. et Barrett J.A. (1995). Non-amplifying alleles at microsatellite loci : a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4 : 249 - 252
- Ranson G.(1948). Ecologie et répartition géographique des Ostréidés vivants. *Revue de Science*, 86 : 469 - 473
- Stenzel H.B. (1971). Oysters. *In Treatise on invertebrate paleontology* (K.C. Moore, ed.), Geological Society of America Inc. and the University of Kansas, Boulder, Colorado
- Weir B. et Cockerham CC. (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 : 1358 - 1370
- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15 : 323 – 354
- Zouros E. et Foltz D.W. (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia*, 25 : 583 – 591
- Zouros E. et Foltz DW. (1984). Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oysters populations. *Developmental genetics* 4 : 393 – 405

**Action 2: Etude des anomalies chromosomiques chez
*Crassostrea gigas***

**S. Lapègue¹, H. McCombie², A. Leita², S. Heurtebise¹, P. Boudry¹,
C. Thiriot², et A. Gérard¹**

(1) IFREMER Laboratoire de Génétique et Pathologie	(2) CNRS Observatoire Océanologique de Villefranche sur Mer
BP 133, 17390 La Tremblade Tél. 05 46 36 98 36 Fax. 05 46 36 37 51	06230 Villefranche sur Mer Tél. 04 93 76 38 25 Fax. 04 93 76 38 93

L'étude présentée ici a été réalisée en étroite collaboration avec le Laboratoire Océanologique de Villefranche-sur-Mer et plus particulièrement Catherine Thiriot et Alexandre Leitao. Cette collaboration engagée depuis de nombreuses années maintenant a ainsi permis au laboratoire IFREMER Génétique et Pathologie de La Tremblade d'acquérir les compétences nécessaires dans l'étude de l'aneuploïdie.

De plus, la relation avec les professionnels et les échantillonnages sur le terrain ont été réalisés grâce à la collaboration avec le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC) et en particulier Stéphane Robert ainsi qu'avec notre pilote Jean-Luc Seugnet.

1. Contexte des études menées en 2000

Divers travaux menés depuis 1984 montrent qu'il existe, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, des cellules montrant un nombre anormal de chromosomes ($2n = 19$, 18 ou même 17 au lieu de $2n = 20$). Le niveau d'aneuploïdie est déterminé par le décompte des chromosomes à partir de suspensions cellulaires de tissu branchial.

Le pourcentage de cellules aneuploïdes est toujours significativement supérieur dans les "lots de queue", c'est-à-dire les huîtres présentant des croissances plus faibles, et peut atteindre plus de 30 %. Récemment, une étude réalisée au sein du programme européen « GenephyS » a démontré que plus de 50 % de la variance pour la vitesse de croissance était liée au taux d'aneuploïdie.

Cependant, de nombreux points concernant ce phénomène restent inconnus en particulier à cause des difficultés méthodologiques rencontrées lors de son étude.

En 1999, une expérimentation a été menée afin de faire un état des lieux du niveau d'aneuploïdie des populations du bassin de Marennes-Oléron, et plus particulièrement des sites de captage afin de déterminer si certains sites pouvaient être davantage touchés que d'autres. Les résultats ont montré que l'on observe de l'aneuploïdie dans chaque site avec un taux moyen par population relativement faible par rapport à celui des populations étudiées précédemment. Les tests statistiques n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les cinq populations étudiées. Cependant, il est apparu que les animaux appartenant à la classe des « moyens » sont globalement moins aneuploïdes que ceux classés « petits » ou « grands », et ce, dans toutes les populations. Ce dernier résultat est plutôt étonnant et reflète très certainement les difficultés de comparer des classes de taille de populations naturelles. En effet, les collecteurs peuvent avoir recueilli différentes cohortes de pontes et donc des animaux d'âge différent, biaisant ainsi la classement effectué sur le poids. C'est toute la difficulté d'étudier ce caractère sur des populations naturelles.

Pour faire un suivi plus précis, des collecteurs vierges ont été placés en 1999 dans deux des mêmes zones à des dates connues afin d'obtenir des animaux de la même année et si possible d'une même cohorte ou tout au moins provenant d'un nombre réduit de cohortes, dont les émissions auront été proches dans le temps. Nous avons étudié le taux d'aneuploïdie dans deux sites du bassin de Marennes-Oléron en nous focalisant sur les deux classes de taille extrêmes et en étudiant un plus grand nombre d'animaux (30 par classe).

De plus, des collecteurs vierges ont été placés pendant l'été 2000 en un site de captage de façon séquentielle pendant trois périodes de deux semaines, afin d'obtenir des animaux, si possible d'une même cohorte ou tout au moins provenant d'un nombre réduit de cohortes, dont les émissions auront été proches dans le temps.

2. Le captage 1999

2.1. Echantillonnage

A la fin du printemps 2000, du naissain de 1 an sur collecteur a été échantillonné dans deux différents sites de captage du bassin de Marennes-Oléron. Il s'agit des sites de Bonne-Anse, et Fouras (figure 1). Les collecteurs ont été hébergés gracieusement par deux ostréiculteurs que

nous tenons à remercier chaleureusement. Les caractéristiques liées aux différents échantillons sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des échantillons prélevés dans les différents sites.

Site	Nature du matériel	Date de mise à l'eau des collecteurs	Date de prélèvement du matériel	Professionnel
Bonne-Anse	Collecteurs tubes	4 août 1999	15 mai 2000	Mr. Rousselot
Fouras	Collecteurs tubes	2 août 1999	19 mai 2000	Mr. Allard

Les échantillons ont été placés en race-ways puis dans des bacs de 800 l dans les salles de l'écloserie de la station IFREMER de La Tremblade. Les bacs étaient alimentés en eau de mer à laquelle a été ajouté du phytoplancton sous la forme de *Skeletonema costatum*. La pousse des huîtres s'est alors poursuivie dans de bonnes conditions. Un détroquage manuel a été réalisé le 15 juin 1999. Les huîtres ont alors été placées dans des tamis de 2000 microns en micronurserie.

Deux cents animaux par site, choisis aléatoirement sur les collecteurs, ont été pesés le 4 juillet et mis en casiers individuels. Ils représentent la variabilité de poids du site considéré. Le fichier de pesées avec les moyennes par site est présenté dans l'annexe 4.1 et les histogrammes de distribution de poids sur la figure 2. Les histogrammes mettent en évidence des distributions à peu près normales des poids dans les différentes populations.

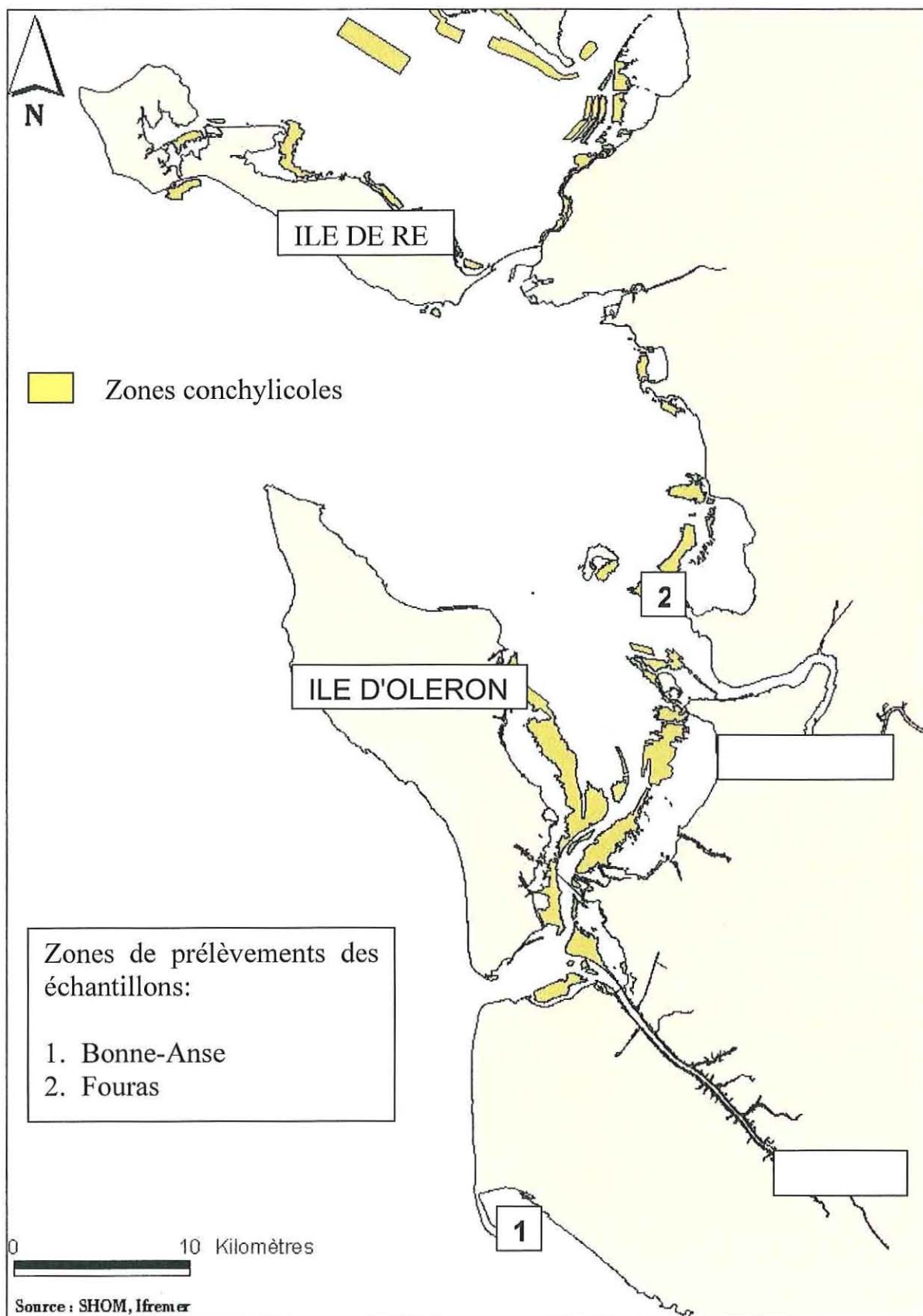
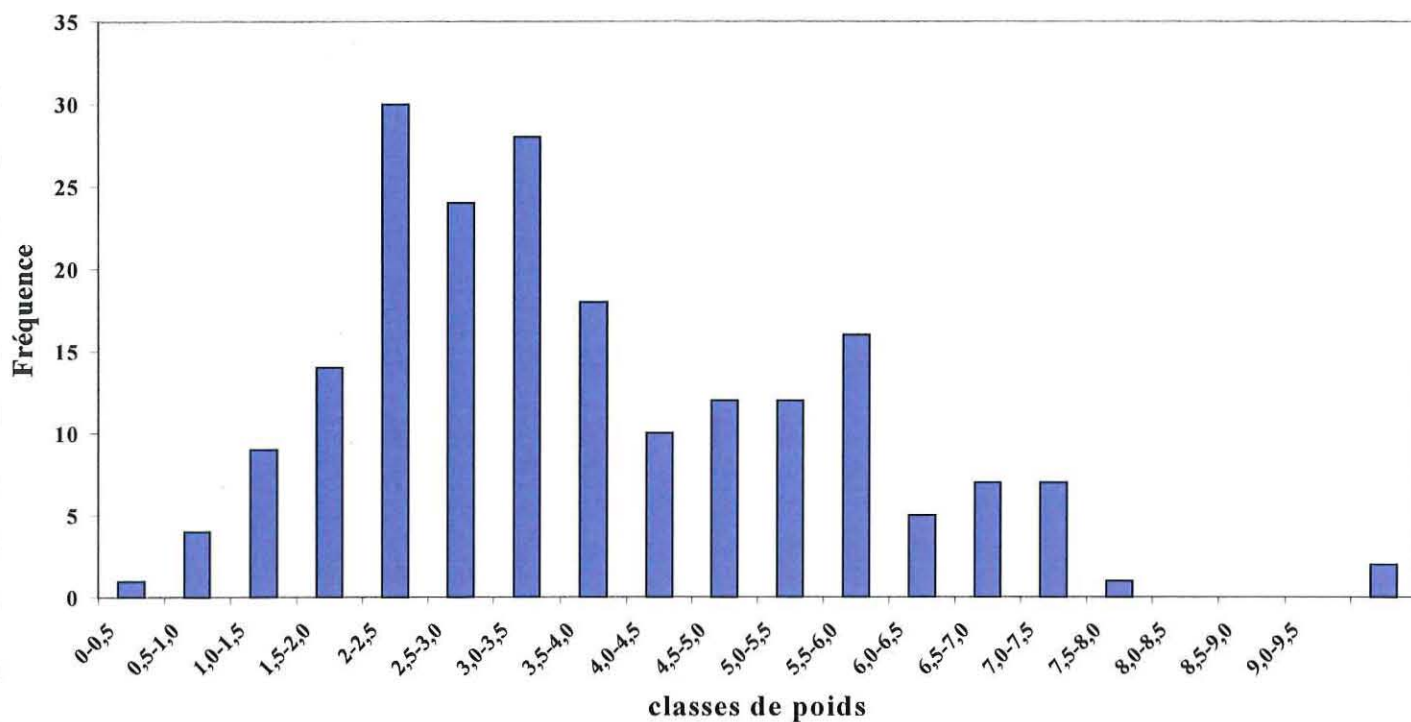


Figure 1. Localisation des sites échantillonnés

Bonne Anse



Fouras

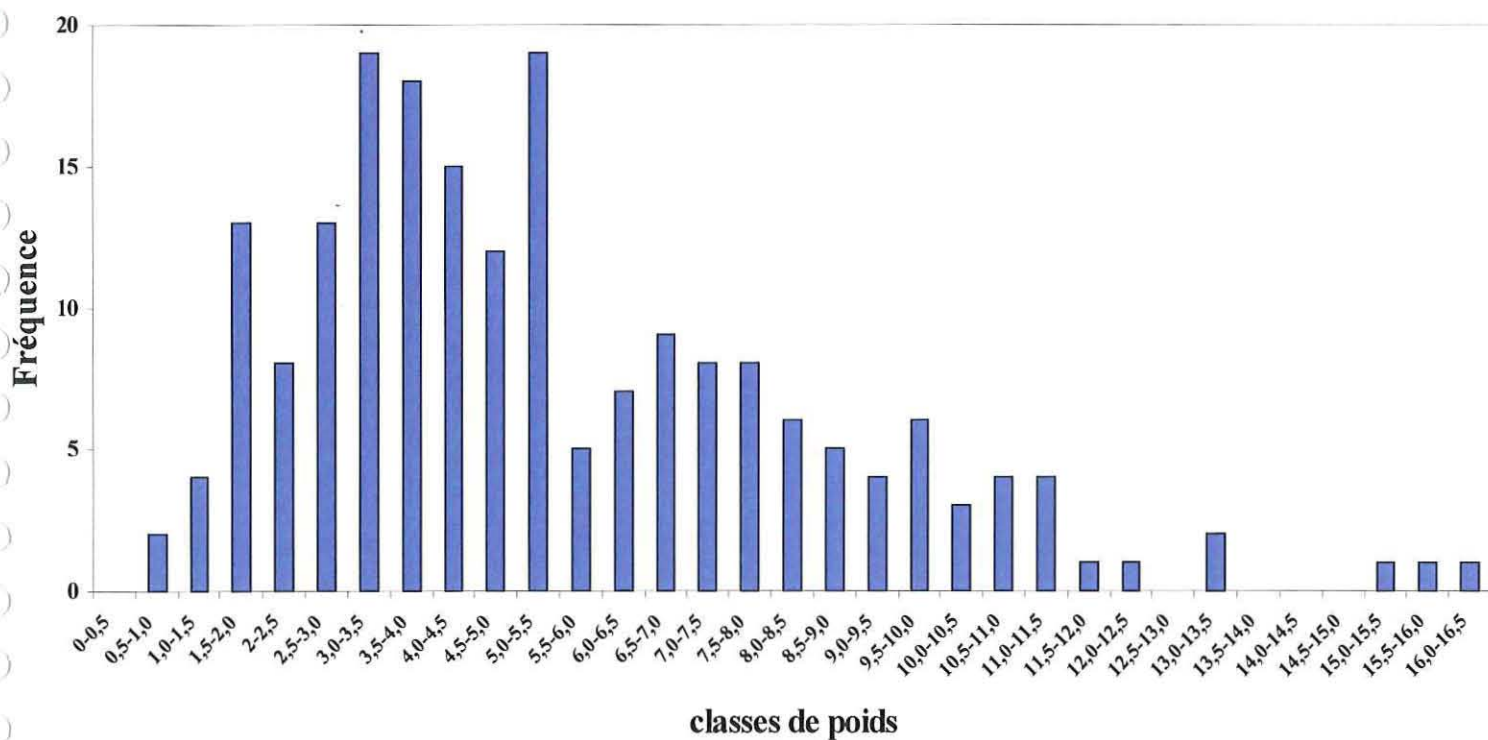


Figure 2 : Histogrammes de distribution des poids en grammes

Etant donné le lien mis en évidence entre aneuploïdie et poids des animaux, nous avons voulu nous affranchir de ce paramètre afin de pouvoir estimer au mieux le taux d'aneuploïdie moyen d'une population. Pour cela, nous avons choisi d'étudier 60 animaux de chaque population : 30 représentant des animaux "petits" et 30 des animaux "grands". Dans chaque population, les deux groupes de trente ont été choisis aux extrémités de la distribution. Les moyennes et écart-types des poids pour chaque population et chaque classe sont donnés dans le tableau 2. Les poids des animaux par population et par classe sont également représentés graphiquement sur la figure 3.

Tableau 2 : Moyennes et écart-types des poids (g) des animaux étudiés pour chaque classe et chaque population.

Population	Classe	Moyenne	écart-type
Bonne-Anse	Petites	1,57	0,45
	Grandes	6,41	0,65
	Total	3,89	2,49
Fouras	Petites	2,00	0,54
	Grandes	10,17	1,19
	Total	5,90	4,21

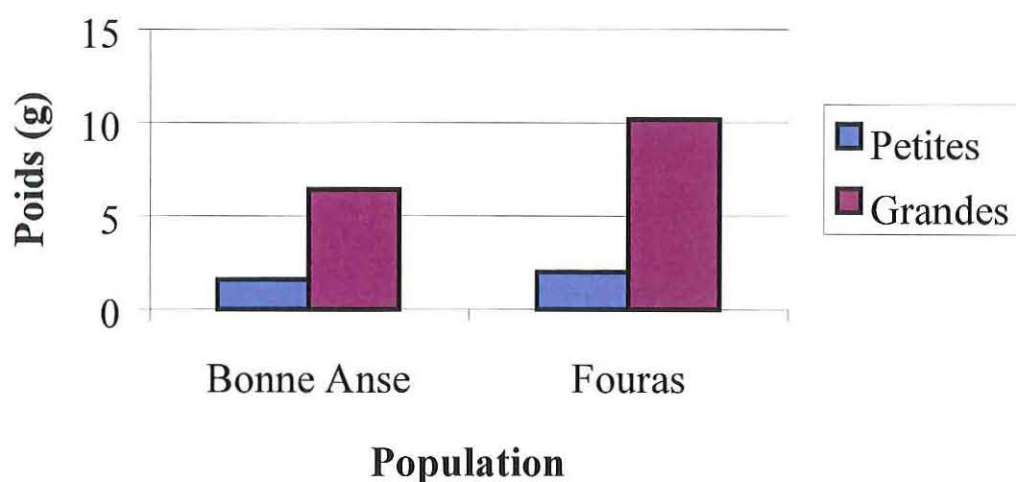


Figure 3. Histogramme des poids moyens par population et par classe de taille

Si les petits animaux apparaissent à peu près de la même taille dans les deux populations, il n'en est pas de même pour les animaux de grandes tailles qui sont en moyenne 50% plus gros à Fouras qu'à Bonne-Anse.

2.2. Méthode d'étude

Deux grandes étapes peuvent être distinguées, l'une consistant en la préparation du matériel biologique et la seconde en la préparation des lames microscopiques sur lesquelles seront observés les chromosomes. La préparation des huîtres pour la visualisation des métaphases somatiques correspond à la fixation de matériel biologique dans lequel se trouve des cellules permettant l'observation des chromosomes. La préparation des lames microscopiques consiste en l'étalement des cellules afin de réaliser la visualisation des chromosomes. Le détail de ces opérations a été exposé dans le rapport de l'année précédente. Les protocoles sont rappelés en annexe 4.2.

Le travail de comptage des chromosomes proprement dit peut alors commencer. Il se déroule sous microscope optique. Il s'agit tout d'abord de repérer les mitoses, ce qui constitue l'étape la plus fastidieuse. Cette étape dépend en grande partie de la qualité des étalements. Lorsqu'une mitose est repérée, la position sur la lame est notée (afin de ne pas compter plusieurs fois la même mitose) et elle est observée à plus fort grossissement ($1.25 \times 10 \times 40$). Une caméra reliée à un écran permet de mieux visualiser la mitose et de compter les chromosomes. De façon générale, les métaphases sont a priori choisies au hasard tout en privilégiant une dispersion la plus homogène des chromosomes.

Les fixations des fragments de branchies traités à la colchicine se sont déroulées les 5, 6 et 7 juillet. Les préparations de lames et les comptages de chromosomes se sont ensuite étalés de ces dates à la fin du mois d'août, occupant une personne à temps plein. Il s'agit en effet de la fixation de 60 échantillons par site, soit, sur 2 sites, 120 fixations. Une lame au minimum est nécessaire par échantillon. Si 30 mitoses n'ont pu être observées sur une première lame, une seconde voire une troisième est réalisée pour l'échantillon en question.

Dans les analyses ultérieures, cette étape devrait pouvoir être optimisée. En effet, grâce à l'aide financière apportée par la région Poitou-Charentes, le laboratoire LGP a pu acquérir un système permettant la recherche automatisée de métaphases (décembre 2000) (Figure 4). Cet appareil est composé d'un microscope Zeiss sur lequel est monté une platine motorisée qui peut accueillir huit lames en même temps. Une caméra reliée à un système informatique permet le traitement des images et leur visualisation. Le microscope balaie ainsi automatiquement des surfaces définies sur les huit lames et le logiciel permet la reconnaissance d'images ressemblant à des métaphases. Ces images sont stockées provisoirement sous formes de petites vignettes photographiques. L'opérateur, en "cliquant" sur une vignette montrant une métaphase, entraîne le repositionnement du microscope au-dessus de cette métaphase. Le comptage des chromosomes peut alors être réalisé.

Cet appareil a donc été installé à la fin de l'année et des premières expériences ont été réalisées afin de mettre au point son fonctionnement. Nous pensons qu'il en découlera un gain de temps non négligeable dans les analyses dès 2001, mais également un confort de travail pour le manipulateur.



Figure 4. Système de recherche de métaphases automatisé

2.3. Résultats

Les résultats sur le niveau d'aneuploïdie observé dans les populations captées en 1999 (figures 5 et 6) montrent une forte différence par rapport aux résultats obtenus sur le captage 1998. Tout d'abord, le taux d'aneuploïdie dans la population de Bonne-Anse est plus important que celui observé l'année précédente avec 17.44 % sur ce captage 1999 au lieu de 12% sur le captage 1998 étudié l'année dernière. De plus, Le taux d'aneuploïdie est significativement ($p < 0.001$ dans l'ANOVA) plus grand dans la population de Bonne Anse (17.44 %) que dans celle de Fouras (11.66%) (Figure 5). C'est aussi, et seulement, dans cette population qu'une différence d'aneuploïdie entre les deux classes de taille s'est avérée significative ($p = 0.04$, figure 6), les plus petits animaux étaient plus aneuploïdes. Ce dernier résultat est en accord avec les résultats des études précédentes obtenus dans des populations provenant d'écloseries et d'autres de milieux naturels.

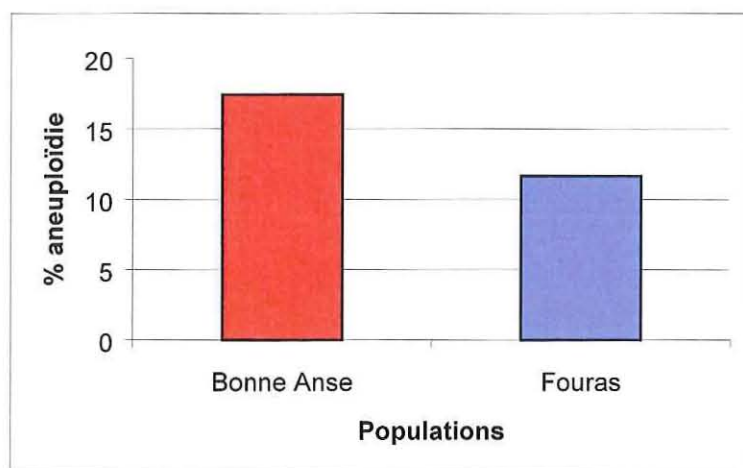


Figure 5. Taux d'aneuploïdie dans les deux population étudiées

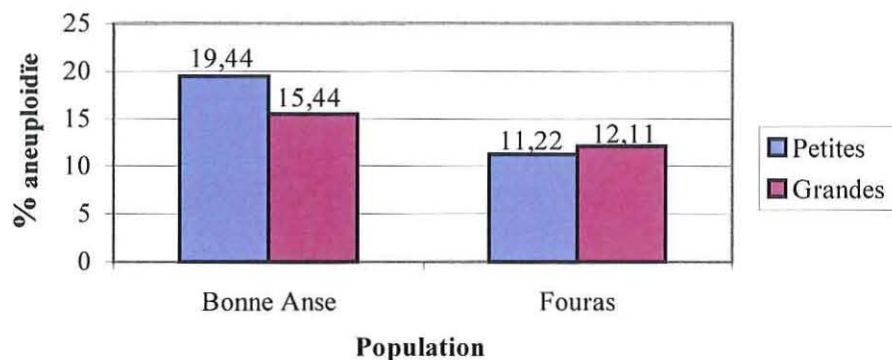


Figure 6. Taux d'aneuploïdie par population et classe de taille

2.4. Conclusion

Une différence significative du taux d'aneuploïdie entre les populations étudiées a été révélée cette année. De plus, une différence de ce même taux entre les deux classes de taille a été mise en évidence dans la population Bonne Anse. On retrouve ainsi la corrélation entre aneuploïdie et croissance qui avait été mise en évidence dans de nombreuses études antérieures.

Il est à noter que, dans cette population, les animaux sont en moyenne plus petits. La population de Bonne Anse est connue comme étant exposée à des polluants provenant de la Gironde, et la pêche à pied est en conséquence interdite dans cette zone. Le site est cependant toujours utilisé pour le captage d'huîtres élevées ensuite dans d'autres zones du bassin.

Nous allons donc poursuivre le suivi de cette population et nous pencher sur l'impact éventuel de polluants sur le taux d'aneuploïdie du naissain. En effet, alors qu'une relation aneuploïdie-pollution n'a pas encore été établie chez l'huître, des anomalies chromosomiques ont été observées chez d'autres espèces de bivalves, par exemple l'influence de la pollution sur l'aneuploïdie de la moule.

3. Le captage 2000

Une approche encore plus précise de l'étude du taux d'aneuploïdie chez le naissain a été réalisée en 2000. Il s'agissait d'étudier des groupes d'huître captées sur une période assez courte afin de réduire l'hétérogénéité des animaux en terme d'âge, facteur qui peut influencer indépendamment la taille des animaux et ainsi masquer une éventuelle relation aneuploïdie-croissance.

Pour réaliser cette étude, des collecteurs ont été positionnées pendant trois périodes consécutives de 2 semaines chacune (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques de l'échantillonnage.

Site	Nature du matériel	Date de mise à l'eau des collecteurs	Date de prélèvement du matériel
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	29/7/2000	16/8/2000
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	16/8/2000	29/8/2000
Fouras	4 collecteurs (Coupelles)	29/8/2000	18/9/2000

Malgré un captage assez moyen cette année, les collecteurs se sont avérés suffisamment fournis pour constituer trois lots d'étude. Après leur retrait du milieu marin, les collecteurs ont été placés dans des bassins à La station de La Tremblade pendant dix semaines. Le détroquage a ensuite été réalisé et a été grandement facilité par l'utilisation de coupelles souples comme support de captage. Cette manipulation n'a ainsi entraîné qu'une perte très faible d'animaux alors que l'utilisation du système de capteurs en tuyaux PVC durs avait induit l'année précédente un

nombre important d'animaux très abîmés (coquilles cassées), et donc rapidement morts ou d'animaux stressés.

Les animaux ont ensuite été placés dans des raceways (Figure 7) dans l'écloserie avec une alimentation plus importante en phytoplancton afin de favoriser les divisions cellulaires (Figure 8).



Figure 7. Raceways en circuit fermé dans lesquels les lots ont été mis en pouxe.

Le traitement des deux premiers lots a pu être commencé dès cette année. Ainsi, 30 animaux "petits" et 30 animaux "grands" ont été fixés pour chacun des deux premiers lots. De plus, 2 lames ont été réalisées pour chaque animal. Cela représente au total 120 animaux fixés et 240 lames réalisées. Les niveaux d'aneuploïdie seront étudiés l'année prochaine toujours dans le cadre de la collaboration avec l'équipe du CNRS de Villefranche-sur-mer.



Figure 8. Naissain d'un lot du captage 2000 dans un tamis

4. Annexes

4.1. Fichier des poids individuels de 200 animaux par site

4.2. Protocoles

4.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques

4.2.2. Préparation des lames microscopiques

4.3. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés

4.1. Fichier des poids individuels de 200 animaux par site

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
1	7,4	11,35
2	4,25	6,64
3	3,91	11,11
4	5,78	5,13
5	3,1	3,66
6	2,85	10,18
7	4,3	2,55
8	10	7,67
9	5,37	6,38
10	4,61	4,46
11	3,04	5,47
12	3,57	2,78
13	6,73	4,12
14	5,74	4,11
15	7,29	4,63
16	5,74	0,63
17	3,9	8,09
18	1,47	7,06
19	2,08	15,08
20	1,68	1,65
21	9,37	3,18
22	2,41	3,02
23	3,29	0,95
24	3,58	3,54
25	1,88	3,32
26	2,87	7,5
27	3,48	1,56
28	1,72	1,82
29	2,17	3,08
30	1,62	10,31
31	2,62	8,4
32	2,14	3,57
33	3,84	4,98
34	4,07	4,11
35	2,91	9,46
36	2,16	2,92
37	5,3	2,23
38	2,76	15,86
39	3,38	6,59
40	5,2	4,31
41	7,54	8,1
42	3,33	9,27
43	3,23	3,77

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
44	6,33	3,39
45	2,63	5,84
46	2,24	12,78
47	1,26	10,9
48	1,68	8
49	2,23	4,1
50	6,66	3,29
51	5,58	16,37
52	3,16	7,53
53	3,11	5,45
54	6,72	3,45
55	4,33	7,26
56	1,25	10,72
57	3,08	5,15
58	2,19	4,16
59	2,66	5,38
60	2,52	1,9
61	3,49	2,44
62	4,72	4,52
63	3,85	7,61
64	7,38	9,52
65	5,03	5,43
66	5,08	4,67
67	2,09	7,76
68	1,68	3,01
69	1,85	4,04
70	1,03	4,43
71	1,96	3,75
72	4,25	1,52
73	4,82	1,26
74	4,53	8,44
75	3,97	6,09
76	3,39	4,85
77	2,21	4
78	2,77	5,15
79	5,16	3,22
80	2,31	6,57
81	2,82	2,75
82	1,65	5,28
83	3,5	4,83
84	4,12	6,38
85	0,95	4,36
86	1,43	6,12
87	4,1	4,95
88	3,24	2,54
89	3,02	10,68
90	7,27	3,58

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
91	2,04	1,87
92	2,99	6,59
93	3,75	6,29
94	3,83	5,11
95	1,28	6,55
96	1,5	8,37
97	7,49	2,73
98	6,97	3,27
99	2,52	2,5
100	3,48	11,48
101	2,45	1,96
102	1,58	2,36
103	0,86	2,03
104	2,87	1,88
105	2,46	3,26
106	5,1	4,1
107	1,53	9,09
108	2,89	2,94
109	2,21	8,49
110	1,07	9,99
111	0,63	7,16
112	3,12	7,21
113	3,69	5,32
114	5,78	2,27
115	3,23	6,94
116	5	3,83
117	5,92	3,86
118	3,4	3,78
119	7,05	3,79
120	4,8	6,85
121	5,7	5,11
122	6,21	5,89
123	5,83	3,84
124	3,96	3,14
125	3,87	2,63
126	3,39	5,01
127	5,88	3,24
128	4,92	1,36
129	4,75	8,97
130	5,45	4,42
131	5,54	12,57
132	3,33	6,39
133	3,35	10,11
134	2,09	3,97
135	3,05	5,45
136	3,32	9,71
137	3,9	5,16

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
138	2,59	3,64
139	1,95	3,46
140	2,62	6,47
141	5,57	4
142	3,04	2,96
143	1,86	3,13
144	1,49	3,72
145	2,28	7,79
146	0,47	2,31
147	2,42	1,5
148	3,55	2,8
149	2,21	5,23
150	6,51	3,58
151	5,24	5,11
152	2,4	8,66
153	2,22	6
154	3,8	2,66
155	6,61	8,91
156	2,28	4,69
157	2,89	7,92
158	5,47	4,47
159	2,85	5,49
160	2,71	2,74
161	2,88	12,04
162	2,04	13,32
163	4,02	7,12
164	3,12	4,75
165	2,67	3,4
166	3,27	6,6
167	4,75	1,98
168	2,48	3,45
169	5,82	7,27
170	7,23	5,72
171	5,14	3,14
172	2,38	2,55
173	5,8	1,61
174	2,09	4,78
175	3,15	11,07
176	4,43	3,75
177	6,24	1,81
178	4,91	9,86
179	5,29	9,44
180	2,64	9,84
181	5,19	6,61
182	0,97	9,95
183	6,06	8,92
184	4,14	10,98

Numéro individuel	Sites étudiés	
	Bonne Anse	Fouras
185	2,68	3,1
186	2,88	4,1
187	3,86	1,23
188	4,76	7,29
189	6,46	1,89
190	4,56	5,46
191	2,12	4,98
192	2,33	11,88
193	2,14	8,86
194	3,6	5,23
195	5,09	7,84
196	2,46	2
197	6,7	2,33
198	3,98	4,36
199	5,63	5,78
200	1,73	4,78
Moyenne	3.71	5.53

4.2. Protocoles

4.2.1. Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques

Aneuploïdie :
Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.
1- Solutions

A préparer avant la manip. (après-midi de la nuit où ça sera lancé)

a) Les solutions suivantes:

- Solution hypotonique de citrate de sodium à 0,9% (pour utilisation le matin)
- Solution 'Mère' de colchicine 0,1% permettant de bloquer les mitoses en métaphase (sera diluée le soir avant de traiter les huîtres)

La quantité de solution nécessaire est dépendante du nombre d'animaux traités et des volumes des containers dans lesquels le traitement de la nuit aura lieu (colchicine) et dans lesquels les préparations seront fixées et stockées le matin (citrate).

CITRATE : Solution de citrate de sodium à 0,9%, donc:
900 mg de citrate de sodium dans
100 ml H₂O **distillée (stockage au réfrigérateur)**

Le tissu est mis dans le citrate une seule fois (directement après la dissection), donc la quantité nécessaire est égale au volume des tubes dans lesquels on mettra le tissu.

e.g. Les tubes ont la capacité de 2.2 ml et il y a 120 animaux:
 $2.2 \text{ ml} \times 120 = 264 \text{ ml}$
 $+ \text{extra} = 300 \text{ ml}$

Si on a 900 mg de citrate de sodium dans 100 ml H₂O distillée
On a besoin de 3 x 900 mg
 $= 2700 \text{ mg sodium citrate pour } 300 \text{ ml H}_2\text{O distillée}$

COLCHICINE 'MÈRE': Solution 'Mère' de colchicine à 0,1%, donc:
100 mg colchicine
100ml H₂O **de mer filtrée (stockage au réfrigérateur)**

La quantité de solution 'Mère' nécessaire dépend du volume de solution 'fille' de colchicine, à 0,005%, nécessaire pour le traitement de nuit, qui est égal au volume des récipients dans lesquels les huîtres vont être traitées.

100 ml solution 'fille' (faite le soir juste avant de lancer le traitement)
= 5 ml solution 'mère'
+ 95 ml H₂O **de mer avec Isochrisis**

i.e. 5 ml de solution Mère est nécessaire pour chaque 100ml de solution fille

e.g. Si on utilise 50 ml par petit animal (<2 g) et que l'on a 120 animaux, on a besoin de 6 litres de solution 'fille'.

6 litres de solution 'fille' est requis

$$6000 \text{ ml} / 100 = 60$$

$$60 \times 5 \text{ ml} = 300 \text{ ml}$$

Donc 300 ml de solution 'mère' est requis. Et si on a 100 mg de colchicine dans 100 ml de H₂O de mer, dans 300 ml on va avoir besoin de 300 mg.

ATTENTION : LA COLCHICINE EST UN PRODUIT TRES TOXIQUE, A PESER AVEC GANTS ET MASQUE EN SALLE DES POWDRES.

b) Numéroté les tubes de 2.2 ml qui seront utilisés.

A préparer la nuit, juste avant le manip.

COLCHICINE 'FILLE' : Juste avant la manip, la solution 'fille' est préparée à partir de la solution 'mère'

100 ml solution 'fille'

=5 ml solution 'mère'

+95 ml H₂O **de mer avec Isochrisis**

L'eau de mer avec *Isochrisis* est composée du mélange (2/1) Eau de mer filtrée/ *Isochrisis* pris dans la salle des algues (à choisir dans un 300 litres à couleur brune moyenne).

Dans l'exemple ci-dessus, 6000 ml de solution 'fille' est requis

Dont 300 ml de solution mère de colchicine (5%)

Et du mélange (2/1) de 3800 ml d'eau de mer filtrée/1900 ml Isochrisis,

A préparer le matin juste avant le fixation

SOLUTION FIXATRICE : Le fixateur est composé d'un mélange (3/1) éthanol absolu/ acide acétique glacial. Il est utilisé après le citrate et changé 4 fois avant que les échantillons soient stockés dans le réfrigérateur. La quantité nécessaire est donc 5 fois le volume des tubes dans lesquels seront fixés les animaux.

Dans l'exemple ci-dessus, 2.2 ml tubes x 120 animaux = 264 ml

$$264 \text{ ml} \times 5 = 1320 \text{ ml}$$

$$+ \text{extra} = 1500 \text{ ml}$$

$$1500 / 4 = 375$$

Donc 1125 ml éthanol absolu

Et 375 ml acide acétique glacial

Préparer au fur et à mesure cette solution: 100 ml alcool absolu + 300 ml acide acétique glacial.

Aneuploïdie :
Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.
2- Manip de nuit.

Cette fiche décrit la manip avec lancement manuel la nuit.
Le soir, avant de partir, préparer d'abord les choses suivantes:

Pour la nuit:

- Colchicine (solution mère),
- Epprouvettes graduées pour mesurer les différents volumes,
- Pichet/s et bêche/s pour les algues et le mélange avec la solution 'fille',
- Bols/bêchers/aquariums pour le traitement des huîtres,
- Gants,
- Bulleur (tubes et pierres) pour oxygéner l'eau,
- Agitateur magnétique,
- Blouse de laboratoire.

Pour le matin (à préparer le soir ou pendant la nuit):

- Solution de citrate,
- Ethanol absolu et Acide Acétique Glacial et bouteille pour le fixateur,
- Tubes eppendorfs pour mettre les échantillons,
- Microscope pour la dissection (loupe binoculaire),
- Chaise à la bonne hauteur pour la dissection,
- Outils de dissection (ciseaux, forceps, scalpel/couteau pour ouvrir les huîtres),
- Boîte de Pétri
- Pissette d'eau de mer,
- Bol pour servir de poubelle,
- Pipette/s pasteur,
- Sopalin,
- Minuteurs,
- Papier brouillon et crayon papier,
- Gants,
- Blouse de laboratoire,
- Chocolat ou autre nourriture !!!

Mise en marche la nuit

ATTENTION : LA COLCHICINE EST UN PRODUIT TRES TOXIQUE, PORTER DES GANTS !

Le traitement à la colchicine, permettant le blocage des mitoses en métaphase, est lancé à minuit et arrêté entre 8 à 10 heures plus tard pour du comptage (6 heures pour du banding).

Avant le lancement, la solution fille de colchicine (5%) est préparée avec la solution mère, l'eau de mer filtré et *Isochrysis* (voir Fiche 1).

Ce mélange est fait dans un bêche/s ou pichet avec l'agitateur magnétique en marche pendant quelques minutes. Les huîtres sont mises dans leurs bols ou autres récipients de façon à ne pas les entasser mais en leur laisser de l'espace pour s'ouvrir et filtrer. La solution est ajoutée et le bulleur mis en marche pour aérer l'eau.

Aneuploïdie :
Préparation des huîtres pour visualisation des métaphases somatiques.
3- Dissection et fixation le matin

Les démarches décrites ci-dessous sont à faire suite à la manip détaillée en fiche 2: Manip de nuit. Elles sont à faire le matin suivant le traitement des huîtres à la colchicine. Pour une visualisation du nombre de chromosomes, la manip est arrêtée après 6 heures (à 6 heures du matin si elle a été lancée à minuit).

La fixation concerne les solutions suivantes:

- Citrate (déjà préparé et stocké au réfrigérateur, voir fiche 1)
- Fixateur: solution (3/1) d'éthanol absolu/acide acétique glacial (à préparer le matin, voir fiche 1)

Dissection

Les branchies des huîtres sont découpées dans de l'eau de mer propre et mises dans les eppendorfs ou récipient de taille adéquate avec le citrate (volume 20 x supérieur à celui du tissu étudié) pendant 40 minutes. Puis Le citrate est enlevé par aspiration avec une pipette pasteur et remplacé par du fixateur.

Pour découper les branchies, l'huître est ouverte avec un scalpel et regardée avec le microscope de dissection (fig. 1). Le manteau et les branchies sont découpés ensemble en prenant soin de ne pas abîmer la glande digestive ni la gonade si il y en a. Les branchies (et peut-être le manteau avec!) sont enlevées ensemble puis le manteau (plus épais avec les poils) est découpé afin de garder seulement les lamelles des branchies qui sont entre les deux couches de manteau. Avant de mettre le tissu dans le citrate, 2 petites coupures sont faites du haut vers le bas des branchies pour faciliter la pénétration de citrate (fig. 2.). Ces coupures ne sont pas faites sur la totalité mais seulement deux tiers de la largeur des branchies. Ceci permet d'éviter que les branchies ne se séparent en morceaux. Elles restent attachées les unes avec les autres à la base.

Fixation

Les branchies restent dans leur tube d'origine et différents bains (un de citrate et cinq de fixateur (F)) sont appliqués:

Citrate pendant	40 min
F1	10 min
F1'	10 min
F2	20 min
F3	20 min
F5 final (dans lequel l'échantillon va être stocké au réfrigérateur)	

D'un point de vue pratique, il est généralement plus facile de faire la fixation des échantillons par groupes de 10. Un minuteur est mis en marche lorsque la dissection ou le changement de fixateur est terminé pour chaque groupe. L'heure de chaque changement est notée pour chaque groupe afin de respecter au mieux les durées des bains précisées ci-dessus.

4.2.2. Préparation des lames microscopiques

Aneuploïdie : Préparation des lames microscopiques. 1- Fixation des chromosomes

Les lames peuvent être préparées à partir de 24 heures après la fin de fixation (Penser à préparer des lames propres à l'avance (voir plus bas)!!!).

Matériel

Le matériel suivant est nécessaire:

Microscope de dissection binoculaire
Une table chauffante pour lames (mis à 44°C)
Lames 'porte objets' (lavées à l'acide chlorhydrique, voir ci-dessous)
Lame avec dépression circulaire (ou petit verre de cristallisation)
Pincettes fines
Ciseaux fins
2 Pipettes Pasteur
Boîte pétri
Bol poubelle

Les solutions suivantes sont également nécessaires :

1/1 Acide Acétique/ Eau distillée
Fixateur 3/1 Ethanol Absolu/ Acide Acétique Glaciale (frais)

Méthodologie

Une lame 'porte objets' est mise sur la table chauffante à 44°C sur laquelle le numéro de l'animal (numéro de lame, date etc.) est inscrit. Pour voir le numéro clairement lorsque la lame est sur le microscope pendant le comptage, orientez la partie où l'on écrit à droite.

Les tubes Eppendorf contenant les branchies sont retirés du réfrigérateur. La branchie est mise sur la boîte de pétri avec son fixateur et un petit morceau est découpé. Ce morceau mesure 2-3mm de longueur. Les extrémités des branchies sont plus riches en mitoses (lieux d'attache des 4 lamelles). Aussi, est-il préférable de prélever à cet endroit, en prenant soin d'inclure les différentes lamelles.

Remettre le reste des branchies dans le tube, remplir avec du fixateur frais et remettre le tube au réfrigérateur.

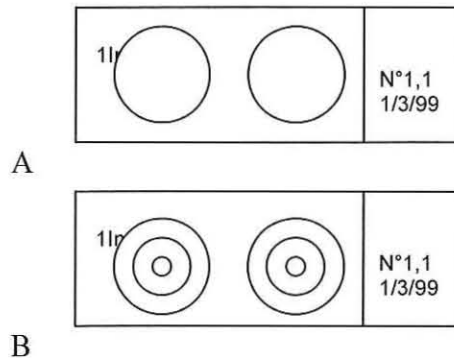
Le morceau découpé est séché sur une serviette en papier et mis sur la lame avec la dépression avec le mélange 1/1 Acide/Eau de façon à remplir cette dépression (Utilisation de la pipette Pasteur n°1). La lame est posée sous le microscope.

Après quelques minutes il apparaît de petites bulles autour du morceau. Le morceau peut être agité dans la solution avec la pince pour libérer ces bulles. Enfin le morceau, qui est devenu transparent,

est enlevé et jeté. Le liquide restant contient les noyaux. Le liquide est aspiré avec une pipette pasteur (Pipette Pasteur n°2) et laissé tombé sur la lame de la manière suivante :

Le liquide est donc aspiré, en évitant d'aspirer les éventuelles déchets de tissu qui sont déchirés du morceau original. Essayer de récupérer toutes les bulles.

Pour déposer le liquide sur la lame, on doit le laisser tomber d'une hauteur de 60cm. D'abord, toucher la lame avec le bout de la pipette pour viser. Puis lever la pipette et laisser tomber le liquide en gouttes sur la lame. L'objectif est de casser la membrane nucléaire. Pour bien distribuer le matériel sur la lame, faire deux gouttes rondes côte à côte (voir figure A).



Le liquide est ensuite réaspiré très doucement avec la même pipette (N°2). La pipette placée bien verticalement permet d'aspirer petit à petit le liquide au centre de chaque goutte (aller de l'une à l'autre rapidement) afin de tracer des cercles concentriques (Figure B). Le matériel nucléaire se dépose sur la lame et sèche en même temps que le liquide est aspiré ou s'évapore naturellement avec la chaleur de la table chauffante (lorsque les gouttes rétrécissent d'elles-mêmes, les laisser faire: utiliser l'aspiration comme une aide!). Ainsi, le matériel est mieux distribué facilitant la lecture ultérieure. On laisse ensuite la lame sécher à température ambiante.

La pipette N°2 est rincée (avec de l'eau acidifiée deux ou trois fois) ou remplacée entre les échantillons. La table chauffante est nettoyée. La lame avec la cavité est nettoyée avec de l'eau acidifiée sans l'essuyer pour ne pas introduire de peluches. De façon générale, travailler en blouse et gains pour éviter de salir les lames.

Nettoyage à l'acide chlorhydrique des lames avant utilisation pour l'étude de l'aneuploidie

Les lames sont trempées du soir au matin dans un mélange (9/1) d'alcool 90/95% / acide chlorhydrique (HCl). Pour mélanger les deux solutions, ajouter doucement l'acide à l'alcool. La solution va fumer donc faire cette étape sous la hotte. Utiliser comme stockage une boîte plastique qui ferme.

Retirer les lames du bain d'acide (le bain peut être gardé et réutilisé). Les mettre dans un porte-lames et les rincer sous le robinet légèrement ouvert pendant 24 heures. (En cas d'urgence 16-18h suffisent)

Les lames sont ensuite stockées dans un bain d'alcool à 90% jusqu'à leur utilisation.

Aneuploïdie :
Préparation des lames microscopiques.
2- Coloration des lames

Matériel

Le matériel suivant est nécessaire:

- pHmètre (la première fois et lorsque l'on a besoin de mélanger du tampon)
- Bain à lames = "baignoire"
- Eprouvettes graduées
- Pipette (pour le bain de coloration), filtres et cônes
- Parafilm et ciseaux
- Bouteille en verre pour faire le mélange (si le cylindre n'est pas en verre)
- Minuteur

Les produits chimiques suivants sont nécessaires :

- Colorant de Giemsa
- Tampon phosphate à pH 6.8: Préparé avec $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- Eau distillée

Méthodologie 1: Préparation du tampon phosphate.

Le tampon est composé de deux solutions stock qui sont mélangées afin de produire une solution à pH 6.8.

Solution A: 7.8g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 250ml d'eau distillée

Solution B: 17.9g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 250ml d'eau distillée

Le mélange est fait à partir de 51ml de A et 25ml environ de solution B et le pH est mesuré avec le pHmètre. De la solution B (prévoir 25 autres ml) est ajoutée progressivement jusqu'à ce que le pH voulu (6.8) soit atteint. De l'eau distillée est ensuite ajoutée pour donner 200ml au total.

Le tampon est stocké au réfrigérateur jusqu'à son utilisation. Il faut le laisser se réchauffer à température ambiante avant chaque utilisation afin d'attendre le bon pH.

Les solutions de base sont stockées.

Méthodologie 2: Coloration des lames.

ATTENTION : GIEMSA EST UN PRODUIT TOXIQUE, PORTER DES GANTS !

Après avoir fixé les chromosomes, les lames sont mises dans le bain à lames. Pour un bain de 100ml, le bain composé de :

4ml Giemsa,
4ml Tampon Phosphate pH 6.8,
92ml Eau distillée.

Les trois liquides sont mis dans la bouteille, qui est fermée par du parafilm et agitée pour mélanger le contenu en tournant 12 fois !

Le mélange est ensuite versé directement sur les lames placées dans leur "baignoire" et le minuteur lancé pour 9 ou 10 minutes. Les lames ont été positionnées dos à dos. Bouger les lames doucement avec un doigt (en portant des gants) pour vérifier que leurs surfaces sont en contact avec la solution.

Lorsque la coloration est finie, jeter la solution dans l'évier et rincer les lames dans leur baignoire 3 fois avec de l'eau du robinet et 1 fois enfin avec de l'eau distillée. Les lames peuvent être séchées sur du sopalin sur une surface plane.

4.3. Résultats bruts des taux d'aneuploïdie observés

Population: Bonne Anse. Echantillonnage de 30 animaux de grande taille							
Animal n°	Nombre de mitoses (N=30)					N° de lames	% aneuploïdie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	26	3		1	4	1	13,33
2	29	1			1	1	3,33
3	25	5			5	2	16,67
4	27	2	1		3	1	10
5	27	1	1	1	3	1	10
6	28		1	1	2	1	6,67
7	24	3	2	1	6	2	20
8	23	5	2		7	2	23,33
9	24	5	1		6	1	20
10	26	1	3		4	2	13,33
11	25	3	1	1	5	2	16,67
12	25	5			5	1	16,67
13	24	4	1	1	6	2	20
14	23	4	2	1	7	1	23,33
15	27	3			3	2	10
16	24	5	1		6	1	20
17	22	3	3	2	8	1	26,67
18	23	3	3	1	7	1	23,33
19	26	4			4	1	13,33
20	26	3	1		4	2	13,33
21	23	5	1	1	7	2	23,33
22	24	6			6	2	20
23	29	1			1	1	3,33
24	26	1	3		4	2	13,33
25	24	3	1	2	6	1	20
26	26	4			4	1	13,33
27	28	2			2	1	6,67
28	26	3	1		4	1	13,33
29	26	3		1	4	1	13,33
30	25	1	3	1	5	1	16,67
					% aneuploïdie totale:		15,44

Population: Bonne Anse. Echantillonnage de 30 animaux de petite taille							
Animal n°	Nombre de mitoses (N=30)					N° de lames	% aneuploïdie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	27	3			3	1	10
2	27	2		1	3	1	10
3	25	4	1		5	1	16,67
4	25	3	2		5	1	16,67
5	25	1	2	2	5	1	16,67
6	27	2	1		3	1	10
7	25	3	1	1	5	2	16,67
8	24	4	2		6	5	20
9	20	2	6	2	10	2	33,33
10	21	5	2	2	9	2	30
11	29		1		1	3	3,33
12	25	5			5	2	16,67
13	25	5			5	2	16,67
14	23	3	3	1	7	2	23,33
15	23	6	1		7	1	23,33
16	21	6	3		9	1	30
17	24	1	3	2	6	2	20
18	25	2	2	1	5	1	16,67
19	29	1			1	1	3,33
20	25	2	1	2	5	1	16,67
21	23	5	1	1	7	1	23,33
22	22	5	3		8	1	26,67
23	22	1	4	3	8	1	26,67
24	21	9			9	2	30
25	18	6	5	1	12	1	40
26	24	3	2	1	6	1	20
27	23	6	1		7	1	23,33
28	24	3		1	4	2	13,33
29	27	3			3	1	10
30	24	3	3		6	2	20
					% aneuploïdie totale:		19,44

Population: Fouras. Echantillonnage de 30 animaux de grande taille							
Animal n°	Nombre de mitoses (N=30)					N° de lames	% aneuploïdie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	30				0	1	0
2	25	4		1	5	1	16,67
3	28	1	1		2	1	6,67
4	27	2		1	3	1	10
5	30				0	1	0
6	28	1	1		2	1	6,67
7	26	3		1	4	1	13,33
8	25	4		1	5	1	16,67
9	27	3			3	1	10
10	28	2			2	1	6,67
11	26	4			4	1	13,33
12	26	2	2		4	1	13,33
13	25	4		1	5	1	16,67
14	26	2	1	1	4	1	13,33
15	28	2			2	1	6,67
16	27	3			3	1	10
17	28	1		1	2	1	6,67
18	27	3			3	1	10
19	26	3	1		4	1	13,33
20	27	3			3	1	10
21	27	2		1	3	1	10
22	26	3		1	4	1	13,33
23	24	3	1	2	6	2	20
24	26	4			4	1	13,33
25	25	3	1	1	5	1	16,67
26	27	3			3	2	10
27	21	8	1		9	1	30
28	27	3			3	1	10
29	25	5			5	2	16,67
30	23	3	3	1	7	2	23,33
					% aneuploïdie totale:		12,11

Population: Fouras. Echantillonnage de 30 animaux de petite taille							
Animal n°	Nombre de mitoses (N=30)					N° de lames	% aneuploïdie
	normales	aneuploïdes					
	2n=20	2n=19	2n=18	2n=17	total		
1	25	4	1		5	2	16,67
2	25	3	2		5	1	16,67
3	25	3	2		5	1	16,67
4	28	1		1	2	1	6,67
5	29	1			1	1	3,33
6	28	2			2	1	6,67
7	23	4	2	1	7	2	23,33
8	24	4	2		6	1	20
9	27	3			3	1	10
10	29	1			1	1	3,33
11	25	4	1		5	1	16,67
12	28	2			2	1	6,67
13	27	2	1		3	1	10
14	29		1		1	2	3,33
15	29	1			1	2	3,33
16	27	2	1		3	1	10
17	27	2	1		3	1	10
18	28	2			2	1	6,67
19	26	2	2		4	1	13,33
20	20	9	1		10	1	33,33
21	27	2	1		3	2	10
22	29	1			1	1	3,33
23	28	1	1		2	1	6,67
24	26	3	1		4	1	13,33
25	23	4	1	2	7	1	23,33
26	29		1		1	1	3,33
27	24	3	2	1	6	1	20
28	28	2			2	1	6,67
29	29	1			1	1	3,33
30	27	2		1	3	1	10
					% aneuploïdie totale:		11,22