

Contrat de projets Etat-Région Poitou-Charentes 2007 – 2013

Convention n°08/RPC-A-29 du 19 mai 2008

Laboratoire Environnement-Ressources des Pertuis Charentais

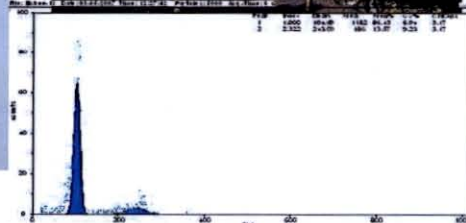
Projet

« Développement durable des Pertuis charentais »

Rapport d'avancement des travaux 2010

## CARTAMO : **CART**ographie des **A**nomalies génomiques dans les gisements naturels d'huîtres creuses du bassin de **M**arennes **O**léron

Auteur(s) **Abdellah BENABDELMOUNA & Issam HEMISSI**



Février 2011

## Remerciements :

Les travaux scientifiques présentés dans ce rapport ont été réalisés avec un soutien financier de la Région Poitou-Charentes et du Feder

# I Introduction

Les anomalies génomiques (baisse de la taille du génome (aneuploïdie) et cassures de l'ADN) sont fréquentes chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* notamment en réponse à des stress chimiques. Chez tous les bivalves marins, ce phénomène a été associé à une baisse des performances biologique générales de l'animal et il a été dernièrement démontré comme un facteur essentiel dans l'expression de la surmortalité estivale des naissains de *C. gigas* en France. Les anomalies génomiques, dont particulièrement l'aneuploïdie, paraissent aussi se transmettre d'une génération à l'autre ce qui laisse à penser que des géniteurs impactés sur leurs génomes auront tendance à produire des larves et des naissains qui le sont aussi ce qui pourrait à terme impacter négativement la qualité du captage réalisé dans un bassin comme Arcachon et donc réduire la survie des naissains produits.

Depuis son existence, le réseau biovigilance détecte des naissains sauvages issus du captage naturel atteints d'anomalies génomiques dont le taux varie en fonction des années et des sites de captage. Dans d'autres suivis, nous avons montré que ces anomalies génomiques affectant les naissains de *C. gigas* étaient négativement corrélées avec le niveau de survie des naissains. Dans le contexte des mortalités qui impactent lourdement depuis 2008 les naissains de *C. gigas*, et compte tenu du fait que les deux principaux bassins naisseurs français, étudiés dans le cadre du réseau Biovigilance, sont à la base de la fourniture de pratiquement les trois quarts des naissains annuellement utilisés, l'occurrence de ces anomalies génomiques mises en évidence dans le cadre du réseau biovigilance devrait susciter un intérêt particulier sur leurs causes.

Sachant que certaines anomalies génomiques pourraient se transmettre d'une génération à la suivante (transmission verticale des anomalies génomiques et donc de la plus forte sensibilité aux causes de la mortalité), l'action **CARTAMO** a pour objectif de fournir une première spatialisation de la prévalence des anomalies génomiques dans les bancs de géniteurs sauvages répartis tout le long des pertuis charentais. L'objectif final étant de :

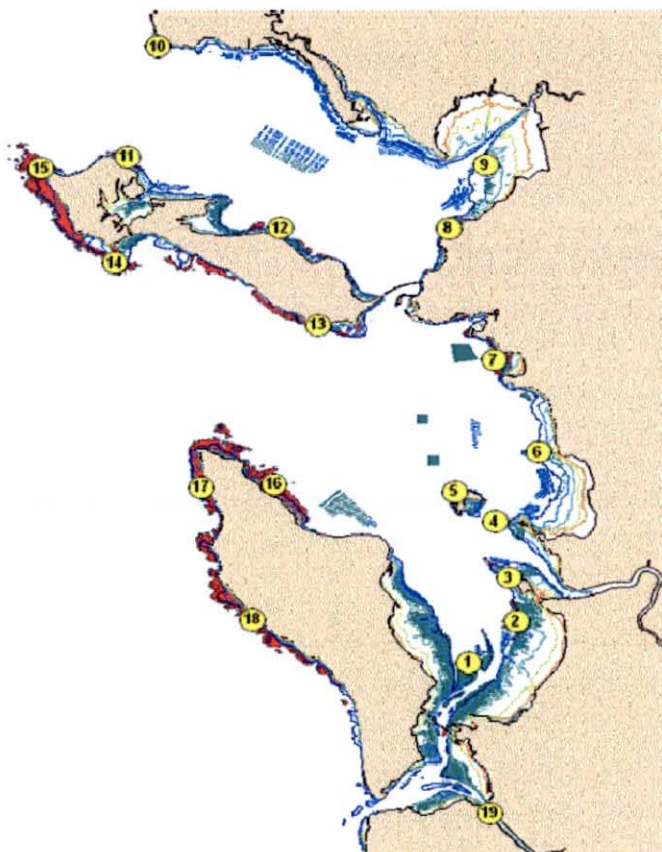
- lier la qualité cytogénétique des naissains captés en un site de captage donné à celle du ou des banc(s) de géniteurs sauvages dont ils seraient issus,
- étudier la corrélation entre les données physico-chimiques du bassin versant au niveau d'un gisement donné et la qualité cytogénétique des huîtres de ce même gisement,
- fournir une aide à la décision afin de préserver les bancs sauvages indemnes des anomalies génomiques ou au contraire identifier ceux qui en sont les plus atteints afin de procéder à leur nettoyage/remplacement.

## II. MATERIEL ET METHODES :

### 1. Echantillonnage des bancs sauvages :

Pour réaliser cette action, en collaboration avec l'action SPAC menée par le LER-PC, 20 sites de gisements naturels d'huîtres creuse adultes ont été identifiés de telle façon à couvrir tout le bassin de Marennes Oléron (cf Figure ci-dessous). Ensuite, une cinquantaine d'huîtres adultes sauvages ont été prélevées sur chaque site afin d'être analysées par cytométrie en flux sur des prélèvements branchiaux. Sur chaque site, un taux d'anomalies génomiques a été déterminé correspondant au pourcentage des individus ayant une quantité d'ADN inférieure à la quantité typique d'un diploïde normal.

1	Juliar
2	Estrée
3	Ile Madame
4	La Fumée
5	Ile d'Aix
6	Les Boucholeurs
7	Aytré
8	Nieul sur mer
9	Esnandes
10	La Tranche sur mer
11	Les Portes en Ré
12	Saint Martin de Ré
13	Sainte Marie en Ré
14	Ars en Ré
15	Saint Clément des Baleines
16	La Brée sur Oléron
17	Saint Denis d'Oléron
18	Saint Pierre d'Oléron
19	Seudre
20	Bonne Anse / Gironde



Localisation des différents sites de gisements sauvages échantillonnés dans CARTAMO

## 2. Analyse de ploïdie en cytométrie en flux :

L'analyse du niveau de ploïdie et des anomalies génomiques est réalisée individuellement par cytométrie en flux sur une biopsie branchiale prélevée suite au sacrifice de l'animal. Des fragments de tissus somatiques prélevés par biopsie branchiale (1mm<sup>2</sup> de tissu branchial) sont repris dans 1ml de tampon d'extraction d'ADN (cf ci-dessous). L'extraction des noyaux peut être accélérée en effectuant des aspirations successives à l'aide d'une micropipette. La suspension obtenue est ensuite filtrée sur une maille de 30 µm et la solution de noyaux est récoltée dans un tube à analyse, puis 1 ml de tampon d'extraction d'ADN contenant le fluorochrome DAPI (10 µl/ml) et le témoin interne (2 µl/ml de TRBC, DNA reference calibrator, Coulter) est additionné à la suspension, pour obtenir au final, pour chaque échantillon, un tube contenant 2ml de tampon contenant les noyaux, colorés au DAPI, de

l'échantillon à analyser et du témoin interne TRBC. Après une incubation de 15 min à 4°C à l'obscurité permettant la coloration des noyaux par le DAPI, les niveaux de ploïdie des échantillons sont analysés par le cytomètre en flux Partec PAII.

**Tampon d'extraction** : contient pour 1 litre :

5g de chlorure de sodium (NaCl).

1 ml de Triton X-100 (C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>).

12.11g de Trizma base (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> Tris[hydroxyméthyl]aminométhane).

1.07g de chlorure de magnésium hexahydraté (MgCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O).

Le pH est ajusté à 7 avec de l'acide chlorhydrique (HCl).

Pour compléter, de l'eau H<sub>2</sub>O bi-distillée est rajoutée au contenu.

**Solution DAPI** :

La solution de DAPI est préparée à partir de 2 mg de DAPI dans 10 ml d'eau distillée stérilisée par filtration (0.22 µm). La solution obtenue est à conserver à -20 °C à l'obscurité.

**Le témoin interne** :

Pour chaque tube, ajouter 2 µl/ml de TRBC (Trout Red Blood Cells, DNA reference calibrator, Coulter)

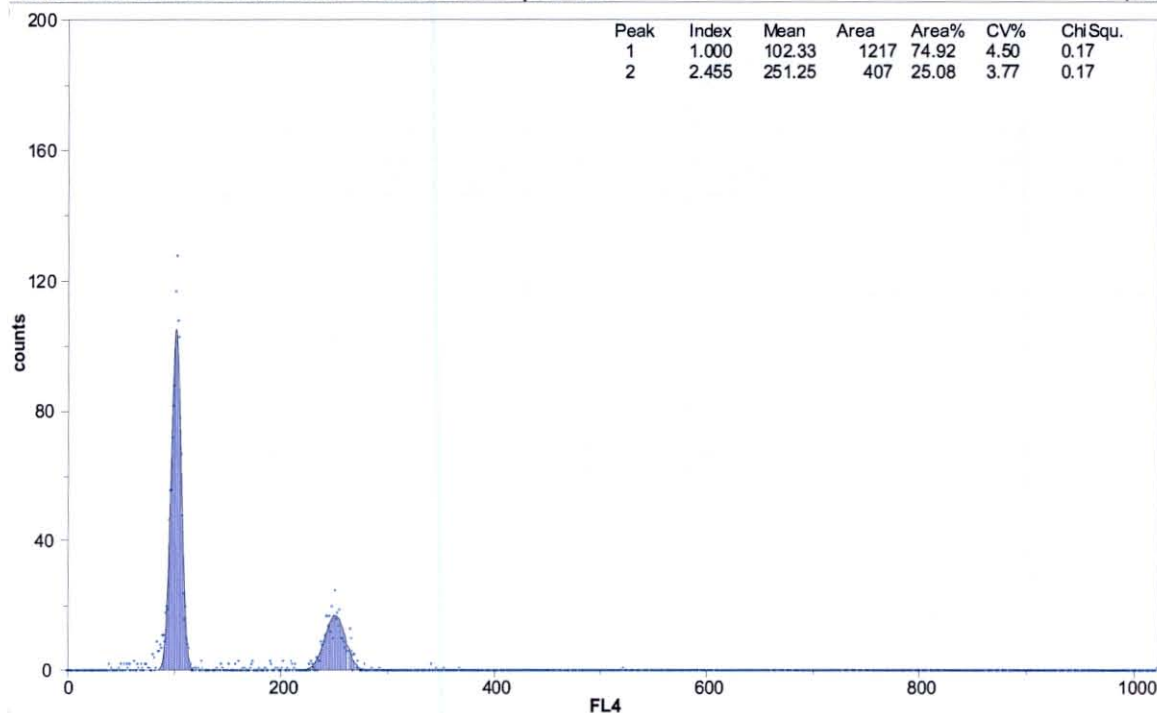
Avant chaque analyse des échantillons, l'étalonnage du cytomètre est réalisé en passant un tube contenant 2ml d'eau bi-distillée et 4µl de témoin interne constitué par des érythrocytes de truite TRBC (Trout Red Blood Cells, DNA reference calibrator, Coulter). Pour garantir la fiabilité des analyses, un réglage de la valeur du CV (Coefficient de Variation) inférieure à 3% ainsi que le réglage du pic de fluorescence émise par le TRBC sur 250nm ont été effectués en vérifiant régulièrement l'alignement de la lampe. Pour chaque échantillon, au minimum 2000 noyaux sont analysés. L'analyse des échantillons et la représentation graphique des résultats sous forme de cytogrammes sont réalisées par le logiciel FloMax®.

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'histogrammes mono paramétriques. Il s'agit d'histogrammes de fréquence où l'axe des abscisses correspond aux valeurs du paramètre analysé (quantité de fluorescence émise par événement et distribuée le long des 1024 canaux de sortie) et l'axe des ordonnées correspond au nombre d'événements comptés. Le logiciel permet d'obtenir une distribution gaussienne de chaque pic.

Chaque échantillon est analysé individuellement et comparé au témoin interne TRBC. Un ratio est par la suite déterminé à partir de la position moyenne du ou des pic(s) de fluorescence émis par les cellules somatiques des échantillons divisé(s) par la position moyenne du pic de fluorescence du témoin interne TRBC. L'équipe de l'IFREMER La Tremblade a mis en évidence que les ratios moyens de fluorescence standardisés étaient de 0.4 chez les huîtres diploïdes, de 0.6 pour les huîtres triploïdes et de 0.8 pour les huîtres tétraploïdes.

File: 03 Date: 14-04-2010 Time: 12:00:32 Particles: 2000 Acq.-Time: 3 s

partec PA



Histogramme caractéristique d'un animal diploïde (ratio = 0.4)

### 3 Analyse des données :

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel XLSTAT pour les traitements statistiques et box plots. Les représentations graphiques des données après traitement statistique sous forme de « Box plot » donnent des indications sur la tendance centrale des valeurs, leur variabilité, la symétrie de la distribution et la présence de valeurs atypiques. Il existe plusieurs possibilités de représentation du « box plot ». Le logiciel XLSTAT utilise la forme suivante :

- Le premier quartile Q1 correspond au bord inférieur de la boîte,
- La médiane Q2 correspond à un trait noir,
- La moyenne correspond à un trait rouge,
- Le troisième quartile Q3 correspond au bord supérieur de la boîte.
- Deux intervalles sont définis de part et d'autre des premier et troisième quartiles :
- $IQ1 = [Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1), Q1]$
- $IQ3 = [Q3, Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)]$

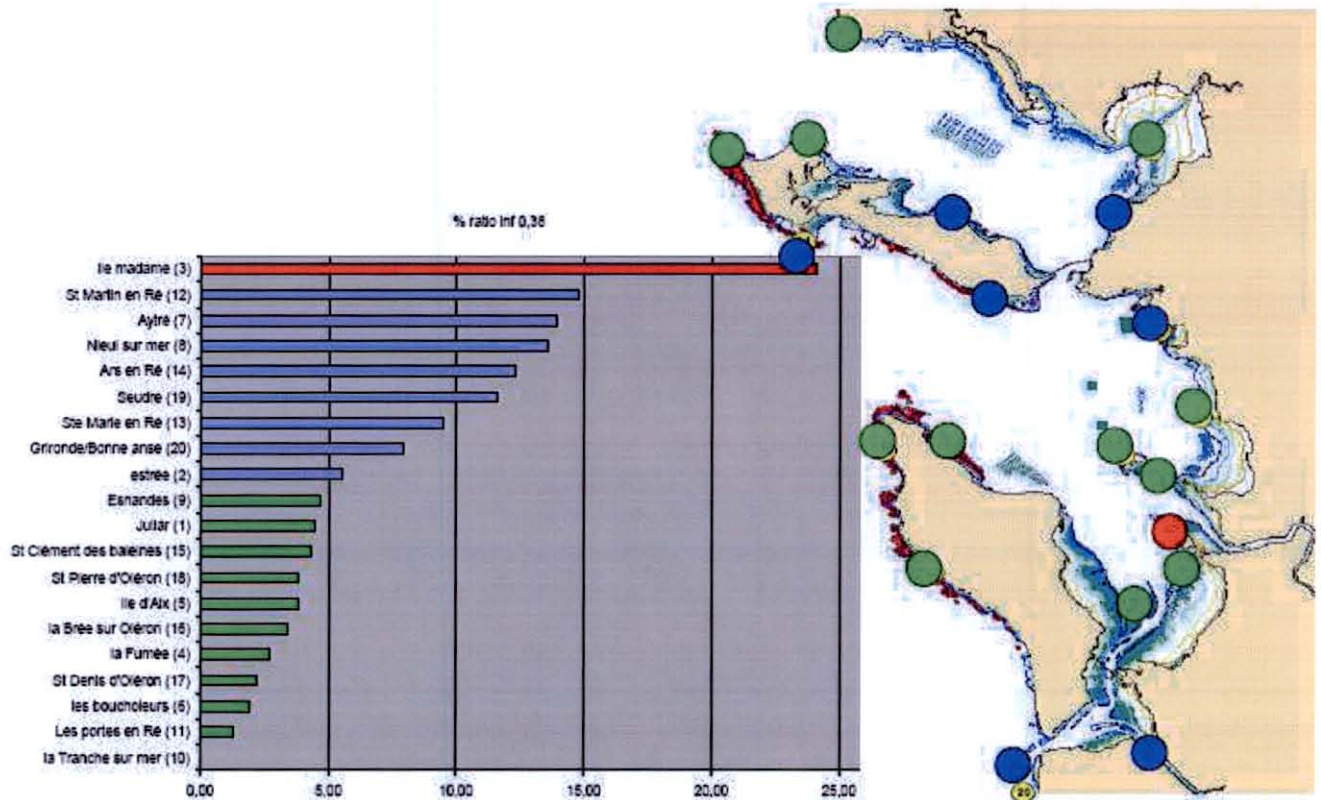
La moustache inférieure du box plot s'étend de Q1 jusqu'à la valeur la plus proche de la borne inférieure de IQ1, en restant à l'intérieur de IQ1,

La moustache supérieure du box plot s'étend de Q3 jusqu'à la valeur la plus proche de la borne supérieure de IQ3, en restant à l'intérieur de IQ3,

Les valeurs en deçà de la moustache inférieure et au delà de la moustache supérieure sont représentées individuellement par des cercles. Ces cercles sont pleins lorsque les valeurs sont au delà de 3 fois l'écart interquartile ( $Q3 - Q1$ ), et vides s'ils sont situés à l'intérieure de cet intervalle.

### III Résultats et conclusion

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante.



Trois types de gisements peuvent être identifiés :

- Gisements **très fortement impactés** par les anomalies génomiques : c'est le cas du site échantillonné au niveau de l'île Madame avec environ 25% des huîtres analysées présentant une quantité d'ADN inférieure à la normale (hypodiploïdie ADN). Ce site se trouve à proximité de l'embouchure de la Charente et est donc pleinement sous l'impact direct de ce fleuve et de son bassin versant.
- Gisements **moyennement à fortement impactés** par les anomalies génomiques avec 5 à 15 % des huîtres analysés typiquement hypodiploïdes. Cette catégorie regroupe les sites situés dans de zones sous l'influence des fleuves (Gironde et Seudre) ou de zones subissant le contact proche avec les agglomérations (Ré, la Rochelle)
- Gisements **faiblement impactés** par les anomalies génomiques avec moins de 5% des huîtres analysées typiquement hypodiploïdes. Cette dernière catégorie regroupe les zones océaniques tournées vers le large ainsi que les zones isolées.

Enfin, même si ces résultats présentent des aspects intéressants et compte tenu que cette étude n'a été conduite qu'une seule année (2010), nous considérons ces résultats présentés ici comme une première prise de vue qui doit être enrichie par des suivis analogues sur une longue période afin de construire une série historique significative. Toutefois, les résultats obtenus dans le cadre de CARTAMO 2010 pourraient être approfondis en les croisant avec les données ou modélisations environnementales du bassin versant. Une telle approche pourrait être à terme utile :

- dans le cadre de l'identification des bancs ostréicoles sauvages les moins impactés de telle façon à gérer leur l'utilisation la plus raisonnée possible soit comme sources de larves/naissains à la base de toute l'activité ostréicole du bassin, soit comme sites potentiels destinés à recueillir de possibles géniteurs améliorés dans le cadre d'un plan de repeuplement à partir de géniteurs sélectionnés,
- dans le cadre d'une aide à la décision dans les politiques de gestion de l'eau et des impacts anthropiques au niveau des sites les plus impactés ou de ceux qui doivent être « sanctuarisés ».