

Direction des Ressources Vivantes
Département Ressources Aquacoles
Laboratoire d'Aquaculture Tropicale

Vincent VONAU, Catherine ROUXEL, Denis SAULNIER, Nathalie
COCHENNEC-LAUREAU, Georges NEDELEC et Emmanuel GOYARD....
Avril 2003 – DRV/RST/RA/LAT/2003-05

Génotypage des géniteurs de *Lates calcarifer* de Tahiti :

*aide à la domestication raisonnée du Loup Tropical pour la filière
Tahitienne*



Numéro d'identification du rapport : DRV/RA/RST/2003-05 Diffusion : libre X restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> Validé par : Jean BARRET, Béatrice CHATAIN Version du document : Définitive		date de publication : avril 2003 nombre de pages : 20 bibliographie (Oui) illustration(s) (Oui) langue du rapport : Français
Titre et sous-titre du rapport : Génotypage des géniteurs de <i>Lates calcarifer</i> de Tahiti : aide à la domestication raisonnée du Loup Tropical pour la filière Tahitienne Titre traduit : Genotyping of the Tahitian broodstock of <i>Lates calcarifer</i>: contribution to the domestication of the Tropical Seabass for the Tahitian industry		
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Vincent VONAU, Catherine ROUXEL, et Emmanuel GOYARD	Organisme / Direction / Service, laboratoire DRV/RA/LAT	
Collaborateur(s) : nom, prénom Denis SAULNIER, Nathalie COCHENNEC- LAUREAU, Georges NEDELEC	Organisme / Direction / Service, laboratoire DRV/RA/LAT	
Travaux universitaires : diplôme : _____ discipline : _____ établissement de soutenance : _____ année de soutenance : _____		
Titre du contrat de recherche : _____		n° de contrat IFREMER
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s) Responsable scientifique : _____		
Cadre de la recherche : Programme : Gestion génétique des stades de reproducteur de <i>L. calcarifer</i> Convention : _____ Projet : E41001 Autres (préciser) : _____ Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)		

Résumé :

Le loup tropical *Lates calcarifer* a été introduit à Tahiti en 1984 puis domestiqué sans apport d'animaux extérieurs. Trois générations successives ont été obtenues en captivité. Des prélèvements de tissus sur les 38 géniteurs qui constituent l'intégralité du stock de reproducteurs tahitiens sont conservés dans l'alcool pour être génotypés à l'aide de quatre marqueurs microsatellites (Yue *et al.*, 2001).

Trois des quatre marqueurs décrits ont pu être transférés avec succès au laboratoire de génétique de Tahiti (marqueurs LcaMO1, LcaMO2, LcaMO3), la technique de révélation disponible localement ne permettant pas d'utiliser LcaMO4 en routine.

Les résultats montrent qu'on ne dispose pas à Tahiti de toute la variabilité génétique de l'espèce, ce qui pourrait s'expliquer, compte tenu de l'histoire de cette population, par un faible nombre de géniteurs fondateurs. La structuration de la 4^{ème} génération en plusieurs lots issus de parents différents apparaît comme la mesure de gestion minimale pour limiter la consanguinité au sein de cette population.

Abstract :

The tropical seabass *Lates calcarifer* was introduced in Tahiti in 1984 and then was domesticated without other introduction. Three successive generations have been obtained in captivity. Tissue samples of the 38 animals which represent the total Tahitian broodstock were preserved in alcohol to be genotyped with four microsatellite markers (Yue *et al.*, 2001).

Three of four described markers were successfully transferred to the laboratory of genetics of Tahiti (marker LcaMO1, LcaMO2, LcaMO3), as the revelation technology available locally did not allow the use of LcaMO4 in routine.

The results show that the genetic diversity of the tahitian broodstock is not equivalent of the one of the species, which could be explained by the small size of the founder population, which is consistent with the history of the Tahitian population. The structuration of the 4th generation into several batches obtained from different parents appears to be the minimum management procedure to limit inbreeding.

Mots-clés :

Lates calcarifer, marqueurs microsatellites, reproducteurs, variabilité génétique.

Keywords :

Lates calcarifer, microsatellite markers, breeding stock, genetic diversity.

Commentaire :

Histoire de la domestication du stock tahitien de <i>L. calcarifer</i>	4
Analyses génétiques réalisées	5
<i>Présentation des Marqueurs Microsatellites décrits dans la publication (Yue et al.,2001),</i> .	5
<i>Origine des échantillons</i>	6
<i>Extraction de L'ADN</i>	6
<i>Essais et mise au point de l'amplification par PCR</i>	6
<i>Migration des produits de PCR amplifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant</i>	7
Résultats et discussion	8
Conclusions	10
Références	12
Annexe 1 : croisements effectués depuis l'introduction de l'espèce à Tahiti	13
Annexe 2 : références individuelles utilisées	14
Annexe 3 : protocole d'extraction de l'ADN	15
<i>Milieus utilisés</i>	15
<i>Protocole</i>	15
Annexe 4 : Protocole de révélation par coloration argentique	17
Annexe 5 : génotypes	19
Annexe 6 : Profils observés au locus MO04	20
Annexe 7 : Fréquences alléliques observées pour chaque population	21

Le loup tropical *Lates calcarifer* n'est pas une espèce indigène de Polynésie française et a été introduit à Tahiti par IFREMER en 1984 en tant qu'espèce potentiellement intéressante pour le développement de l'aquaculture de poissons marins dans ce pays. La production à Tahiti vise le marché local et s'appuie sur 2 écloseries privées. L'IFREMER continue à jouer un rôle dans la gestion des stocks de reproducteurs, en particulier pour limiter la consanguinité au sein de cette population fermée. Comme les premiers essais avaient été menés pour mettre au point la zootechnie adaptée à cette espèce, les précautions d'ordre génétique lors des premières générations de domestication ont été limitées. En fait, la gestion des géniteurs par lots, en particulier lors de la ponte, n'a pas permis la tenue d'une généalogie précise.

Parallèlement, le développement de l'aquaculture de ce poisson en Australie et en Asie a justifié le développement de marqueurs génétiques utilisables pour des contrôles de parenté au sein de programmes d'amélioration génétique (Yue *et al.*, 2001).

L'objectif du présent travail était de tester ces marqueurs dans les conditions techniques du COP et de faire un point sur la variabilité génétique disponible au sein du stock de reproducteurs disponibles à Tahiti et sur sa gestion.

Histoire de la domestication du stock tahitien de L. calcarifer

L'annexe 1 résume l'histoire de la domestication du Loup tropical à Tahiti et est explicitée dans les lignes suivantes.

Quatre lots de larves et/ou d'alevins furent importées de Singapour en 1984, 1985, 1986 et 1989. Les parents de ces lots étaient vraisemblablement sauvages et non apparentés, mais aucune information n'est disponible au sujet de la structure génétique de ces lots (familles de plein frères, de demi frères ou mélange de familles). On peut considérer qu'au moins 8 géniteurs sauvages sont à l'origine du stock tahitien

Les 4 générations G1 correspondantes (G1-84, G1-85, G1-86 et G1-89) ont été élevées à l'IFREMER jusqu'à la taille de géniteurs et utilisées comme suit :

- 1 femelle G1-84 (référéncée G1-84-f1-1) a été mise en maturation avec 3 males G1-86 (référéncés G1-86-m1-1, G1-86-m1-2 et G1-86-m1-3) en 1988 et injectée. La « G2-88 » est issue d'une seule ponte de cette femelle ;
- 2 femelles G1-85 (référéncées G1-85-f1-1 et G1-85-f1-2) ont été mises en maturation avec 6 males G1-89 (référéncés de G1-89-m1-1 à G1-89-m1-6) dans un seul bassin en 1992. La « G2-92 » est issue d'un seul lot d'œufs récoltés dans ce bassin.

Ces 2 générations G2 (G2-88 et G2-92) ont été élevées à l'IFREMER jusqu'au stade géniteur et utilisées comme suit : 5 femelles G2-88 (référéncées G2-88-f1-1, G2-88-f1-2, G2-88-f1-3, G2-88-f1-4 et G2-88-f1-5) ont été mises en maturation avec 6 males G2-92 (référéncés G2-92-m1-1, G2-92-m1-2, G2-92-m1-3, G2-92-m1-4, G2-92-m1-5 et G2-92-m1-6) dans un seul bassin de 1994 à 1997 pour produire :

- la « G3-94 » en 1994 à partir d'un seul lot d'œufs ;
- la « G3-95 » en 1995 à partir d'un seul lot d'œufs ;

- la « G3-96 » en 1996 à partir d'un seul lot d'œufs, mais cette génération n'a pas eu de descendance ;

- la « G3-97 » en 1997 à partir d'un seul lot d'œufs.

Aucune autre information n'est disponible sur la structure génétique de ces G3, en particulier sur le nombre de géniteurs ayant réellement participé à la ponte : ces générations peuvent correspondre à des familles de pleins frères, de demi frères ou à des lots multiparentaux issus du mélange de plusieurs familles ayant pondu simultanément.

Les géniteurs survivants de ces 3 lots de 3^{ème} génération ont été identifiés et répartis dans les 3 écloséries travaillant sur cette espèce à Tahiti (Aquapac, Tahiti Aquaculture et IFREMER)

Analyses génétiques réalisées

Présentation des Marqueurs Microsatellites décrits dans la publication (Yue et al.,2001),

Quatre marqueurs microsatellites ont été identifiés par Yue et al. (2001), à partir des séquences publiées par Collet *et al.* (1998) et par Yowe *et al.* (1995) et conservées par GENBANK sous les références AF007973 et U16816. Les auteurs ont défini quatre paires d'amorces complémentaires à partir des séquences flanquantes des microsatellites :

LcaMO1 (localisé dans le second intron du gène IGF-2)

F:5' -GAT TCG CTC TTT ATT CTC CC-3' (CG)₄(CA)₈ R:5' -GTC GGC CTT TCA TAT GCA AT-3'

Amorce sur brin positif Microsatellite Amorce sur brin négatif

LcaMO2 (localisé dans le second intron du gène IGF-2)

F:5'-GCC GCT TGT TTA CCA GTA AA -3' (GA)₁₃. R:5'- TCC ATT TGA GGA TTA ACA GC -3'

Amorce sur brin positif Microsatellite Amorce sur brin négatif

LcaMO3 (localisé dans le promoteur du gène GH)

F:5'- TCA AAT CAG TTT GTG ACA CG -3' (CA)₁₄ R:5'- GTC TTG GCT CTG GAT CAG TG -3'

Amorce sur brin positif Microsatellite Amorce sur brin négatif

LcaMO4 (localisé dans le promoteur du gène GH)

F:5'-GTA GGT-CTA-CAA-TAG-GGG-GG-3' (TG)₃TTGT(TG)₂TTGT(TG)₂T(TG)₂TTGT R:5'-TGG GGC TGA TAA TGT AAT CA -3'

Amorce sur brin positif Microsatellite Amorce sur brin négatif

Le niveau de polymorphisme de ces marqueurs a été caractérisé par les auteurs en effectuant le génotypage de 34 individus d'origines diverses (tableau 1):

- 22 individus issus d'un lot de géniteurs d'élevage provenant de Singapour,
- 12 individus achetés dans un supermarché sans en connaître la provenance.

Tableau 1 : Caractérisation des microsattellites situés dans les gènes GH et IGF-2 (d'après Yue *et al.*, 2001),

Locus	Type	Nb. alleles	Taille (bp)	H _e	H _o	T (°C)
<i>LcaMO1</i>	Composés	3	260-264	0.58	0.38	55
<i>LcaMO2</i>	Parfait	11	256-284	0.85	0.79	55
<i>LcaMO3</i>	Parfait	4	231-239	0.56	0.32	50
<i>LcaMO4</i>	Imparfait	2	185-187	0.51	0.50	50

- H_e indique l'hétérozygotie espérée; H_o, l'hétérozygotie observée; T, la température d'hybridation pour la PCR

Les amorces publiées par Yue *et al.* (2001) ont été synthétisées par EUROGENTEC afin de tester leur éventuelle hybridation sur du matériel génomique extrait de loup tropical (*Lates calarifer*) de Tahiti.

Origine des échantillons.

Pour cette étude, nous avons collecté 38 échantillons provenant d'animaux de 3^{ème} génération élevés dans les deux fermes privées (Tahiti-Aquaculture et Aquapac), et à l'IFREMER. En outre, des échantillons de 5 individus australiens, d'origine inconnue, ont été fournis par le Department of Primary Industries du Queensland. Ces animaux sont référencés en reprenant leur référence généalogique (annexe 1) et leurs numéros de marquage individuel d'élevage (annexe 2) sauf pour les 5 animaux australiens.

Pour chaque individu, un prélèvement de nageoire pectorale a été effectué puis stocké au congélateur (-20°C) dans 2 tubes à hémolyse contenant 4 ml d'éthanol à 70%. Le marquage de ces tubes comporte le N° individuel, son sexe et sa référence généalogique.

Extraction de L'ADN.

L'extraction de l'ADN par la méthode au phénol-chloroforme a été réalisée sur des petits fragments de tissu (environ 8 mm²) suivant le protocole présenté en annexe 3 (Sambrook *et al.* 1989).

Essais et mise au point de l'amplification par PCR.

Pour définir la quantité d'ADN, chaque échantillon a été mesuré par spectrophotométrie puis dilué au 1/25^{ème} pour en faire une solution de travail.

Plusieurs essais ont été réalisés à différentes températures d'hybridation afin d'améliorer la spécificité du signal d'amplification.

Les meilleurs conditions d'amplification de l'ADN sont obtenues dans un volume de 30 µl final contenant

- 1x de tampon pour la polymérase (Qiagen)

- 1.5 mM de MgCl₂ (Qiagen),
- 0.2 mM de chaque dNTP (Qiagen),
- 0.5 μM d'amorce F et R pour chaque marqueur (Eurogentec),
- 1 Unité de Taq Polymérase(Qiagen)
- et 5 μl d'ADN génomique dilué

et en respectant le cycle d'amplification suivant :

- 2 mn de dénaturation à 94 °C,
- suivies de 35 cycles composés :
 - de 45 secondes de dénaturation à 94°C
 - de 45 secondes d'hybridation :
 - à 56°C pour les couples d'amorces LcaMO1 et LcaMO2
 - à 58°C pour les couples d'amorces LcaMO3 et LcaMO4
 - de 45 secondes d'élongation à 72°C.

Ces amplifications sont terminées par une élongation à 72°C pendant 10 minutes.

Migration des produits de PCR amplifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant

Principe général

Les fragments amplifiés sont séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant contenant 6 % d'urée. La solution de polyacrylamide est préparée à l'avance (1 litre de solution pour environ 10 gels) et conservée au réfrigérateur (+4°C). Le gel est coulé en sandwich entre deux plaques de verre dont l'épaisseur est de 0.4 mm. Pour un gel la composition est la suivante :

- 75 ml de solution acrylamide-bisacrylamide-urée
- 160 μl de persulfate d'ammonium (à 25%)
- 80 μl de Temed

Lorsque le gel a polymérisé (il est préférable de couler les gels la veille et de les laisser polymériser toute la nuit sous ambiance humide), il est placé dans la cuve d'électrophorèse (matériel LIFE TECHNOLOGY). Après ajout du tampon de migration 1X, des peignes-puits sont installés puis un préchauffage de 15 à 20 mn est initié. Pendant ce temps les échantillons amplifiés par PCR subissent une dénaturation à 94°C durant 5 mn après ajout de 10 μl de tampon de charge STR 9X. Un marqueur de taille 100 pb (paires de base) a également été dénaturé. Lorsque le thermocycleur a exécuté le programme de dénaturation, les échantillons sont déposés immédiatement sur la glace empêchant la rénaturation de l'ADN. Le chargement des échantillons ainsi que le marqueur s'effectue à raison de 6 μl par puits préalablement nettoyé à l'aide du tampon de migration. A la fin du chargement la migration est lancée à 1100 volts, 130 watts pour une durée de 6 à 7 heures. Après ce délai, la petite plaque est retirée et le gel est plongé dans un bain de fixation (acide acétique + éthanol +H₂ O) pour la nuit. Le lendemain le gel est révélé par coloration argentique selon le protocole argentique couramment utilisé au laboratoire (Annexe 4).

Problèmes rencontrés sur les gels et l'électrophorèse

Nous avons rencontré des points de blocage avec les gels, ce qui a occasionné un retard important (6 semaines).

La cause principale de ce retard était due au déchirement du gel dans le sens de l'épaisseur lors du retrait de la petite plaque. Après de multiples essais la cause du problème a été identifiée et une solution a été trouvée. En effet, lors du traitement des plaques, nous utilisons deux produits (solution de bind-silane et de silane) ayant une incidence non négligeable sur la réussite de l'électrophorèse. Le bind-silane est appliqué sur une des faces de la grande plaque, qui assure le collage du gel afin d'éviter qu'il ne se déchire dans l'étape de coloration argentique. Quant au Silane son rôle est inverse, il doit empêcher l'adhérence du gel sur la petite plaque. Or, il se trouve que cet agent siliconant était défectueux. Après plusieurs essais en augmentant la quantité de silane (de 100µl à 3ml) avec des résultats mitigés, nous avons testé avec succès une bombe « anti-buée » vendue dans le commerce.

D'autres problèmes ont été rencontrés : les conditions de migration, avec un voltage de 1500 volts et une puissance de 130 W semblent altérer la qualité du gel par chauffage excessif. Ceci a des effets négatifs sur la définition des bandes (bandes déformées et/ou floues avec de forts effets de bord) . En réduisant le voltage à 1100 V nous avons trouvé un compromis acceptable pour cette étude.

Enfin, nous avons eu à résoudre des problèmes de séchage de gel. Ceci entraînait : l'obtention d'un gel « collant », l'apparition de fines craquelures sur le gel au bout de quelques jours, l'ensemble rendant difficile l'interprétation. Après avoir fait vérifier l'appareil de séchage, tant au niveau électrique que mécanique, par le service logistique, et après de nombreux essais, la solution fût trouvée en isolant les pas de vis de la pompe à vide par du « Téflon » bloquant ainsi les micros entrées d'air.

Résultats et discussion

Le degré d'analyse est variable en fonction des marqueurs utilisés. Pour les marqueurs LcaMO1, LcaMO2 et LcaMO3, la discrimination des bandes est suffisante pour repérer respectivement, toutes populations confondues 4, 5 et 7 allèles. Par contre, avec le couple de marqueur LcaMO4 les allèles et les échos sont difficilement séparables, rendant les gels illisibles. Pour ce dernier marqueur, il semble néanmoins qu'il y ait une certaine variabilité des profils observés, même si le génotypage s'avère impossible dans les conditions du laboratoire IFREMER de Tahiti.

Les résultats de génotypage individuel sont fournis en annexes 5 et 6. Les fréquences alléliques observées aux locus MO01, MO02 et MO03 sont détaillées par population en annexe 7. Le tableau résume ces résultats par locus et par population.

L'analyse détaillée des génotypes observés chez les géniteurs tahitiens révèle que :

- le groupe G3-94 pourrait ne descendre que de 2 géniteurs G2 ;
- le groupe G3-95 pourrait ne descendre que de 2 géniteurs G2;
- le groupe G3-97 descend au moins de 3 géniteurs G2;
- **les 3 groupes G3 sont issus de parents G2 tous différents : au total, au moins 7 géniteurs parmi les 11 géniteurs des groupes G2-88 et G2-92 (Annexe1) ont une descendance parmi les géniteurs de 3^{ème} génération, alors que les données**

zootecniques ne permettaient pas d'exclure l'hypothèse d'un goulot d'étranglement à 2 géniteurs en 2^{ème} génération.

Le tableau 3 illustre ce résultat en fournissant un exemple de génotypes potentiels des 7 géniteurs efficaces de génération 2.

		Population				
		G3-94	G3-95	G3-97	Total Tahiti	Australie
Locus	MO01	3	3	3	4	3
	MO02	4	3	3	5	3
	MO03	3	4	4	7	1
Nombre d'individus génotypés		9	4	25	38	5

Tableau 2 : nombre d'allèles observés par locus et par groupe de géniteurs

Groupe de génération 3	Parents de génération 2	MO01	MO02	MO03
G3-94	A	001003	002004	002002
	B	001004	001003	004005
G3-95	C	001002	001002	002007
	D	002003	00*004	003006
G3-97	E	001003	004005	001006
	F	002003	003005	002004
	G	00*00*	003004	001004

Tableau 3 : exemple de génotypes possibles pour les 7 géniteurs de génération 2 parents des géniteurs de génération 3.

Par ailleurs, plusieurs points sont à souligner :

- il n'est pas possible d'aller plus loin dans la reconstitution de la généalogie des géniteurs actuels : en particulier, on ne peut affirmer que plus de 4 géniteurs de génération 1 (parmi les 12 géniteurs des groupes G1-84, G1-85, G1-86 et G1-89) ont effectivement une descendance en 3^{ème} génération,
- le nombre de parents G2 estimés ci dessus correspond au nombre de parents G2 potentiels des géniteurs G3 actuellement présents à Tahiti : cela ne signifie pas que les pontes à l'origine des 3 groupes tahitiens étudiés n'aient pas été issues de plus de géniteurs : entre ponte et géniteurs, une sélection spontanée a pu s'exercer, diminuant le nombre de géniteurs efficaces de seconde génération ,
- l'excès en hétérozygotes qu'on observe sur nos échantillons (Hétérozygotie observée supérieure à l'Hétérozygotie attendue) ne doit pas être interprétée comme un problème de lecture de gel : plusieurs facteurs peuvent expliquer un tel résultat : trop faible effectif échantillonné, échantillonnage biaisé (Il est possible que la sélection d'animaux comme futurs géniteurs ait conduit à favoriser des animaux hétérozygotes),

- on observe aux locus MO01 et MO03 plus d'allèles que Yue *et al.* en décrivent (2001) : cela n'est pas étonnant du fait que leur étude ne visait pas à décrire toute la diversité allélique de l'espèce,
- la diversité allélique des individus australiens est faible, en particulier au locus MO03, mais leur effectif (5) et l'absence d'information précise sur leur origine ne permet pas de considérer qu'ils constituent un bon témoin de variabilité.

Conclusions.

Trois des quatre marqueurs décrits dans la littérature ont pu être transférés avec succès au laboratoire de génétique de Tahiti (marqueurs LcaMO1, LcaMO2, LcaMO3), la technique de révélation disponible au COP ne permettant pas d'utiliser LcaMO4 en routine.

L'utilisation de ces marqueurs sur le stock de géniteurs tahitiens révèle une variabilité résiduelle entre les 3 groupes qui constituent ce stock et qui correspondent à des pontes différentes d'au moins 7 géniteurs de génération 2, décalées dans le temps. S'il n'est pas possible, faute de données et d'échantillons, de comparer la variabilité disponible à Tahiti et celle de l'espèce à l'état sauvage, on peut cependant suspecter une perte de variabilité par effet fondateur : 11 allèles sont décrits par Yue *et al.* (2001) au locus MO02 alors que nous ne détectons que 7 allèles à ce locus sur notre stock.

Cette étude justifie donc *a posteriori* la structuration du stock de reproducteurs en plusieurs groupes issus de pontes différentes et l'exploitation de cette structuration par des croisements inter-groupes pour limiter la consanguinité : en pratiquant ainsi, les animaux de génération 4 seront probablement consanguins, mais de façon limitée puisque leurs parents – non consanguins – ne seront pas frères-sœurs, mais au pire cousin-cousines.

Au regard de ces résultats, deux types d'objectifs principaux peuvent être définis :

Objectifs biomoléculaires

- La caractérisation de ces microsatellites a été réalisée à l'aide d'un séquenceur (ABI 377/Perkin-Elmer) ce qui permet certainement d'avoir une résolution plus importante que celle utilisée au laboratoire (coloration argentique). Dans la mesure où les autres programmes du laboratoire et de l'IFREMER justifierait un tel investissement, on gagnerait en efficacité dans le génotypage des géniteurs de *L. calcarifer* et dans le suivi de la variabilité résiduelle de ce stock fermé.
- Les marqueurs transférés avec succès au LAT (Laboratoire d'Aquaculture Tropical de l'IFREMER) pour cette pré-étude ont permis d'évaluer le nombre de géniteurs efficaces de la génération 2. Il est possible que ce chiffre soit sous-estimé et que des marqueurs plus variables aient fourni un chiffre plus élevé. Ces marqueurs constituent un outil précieux pour évaluer de façon séquentielle la diversité allélique du stock tahitien. Néanmoins, une veille technologique doit être poursuivie sur la publication de nouveaux marqueurs plus variables. La

participation au développement de nouveaux marqueurs pourrait, sans être une priorité, être envisagée en fonction du développement de la filière ou des opportunités de collaboration avec d'autres laboratoires.

Objectifs gestion des reproducteurs

- le génotypage des lots de 4^{ème} génération issus des animaux génotypés dans cette étude pourrait permettre de faire des choix en matière de lots à conserver pour constituer un nouveau stock de géniteurs. Néanmoins, une telle gestion optimisée du stock Tahitien nécessite un développement significatif de la filière. En revanche, l'étude réalisée justifie pleinement la démarche zootechnique de subdivision de la 4^{ème} génération en multiples lots identifiés susceptibles d'être croisés pour produire la génération suivante. La longévité des reproducteurs (7-8 ans, voire plus) associée à ces précautions zootechniques de base permettra de repousser les problèmes de consanguinité sur le long terme.

Références

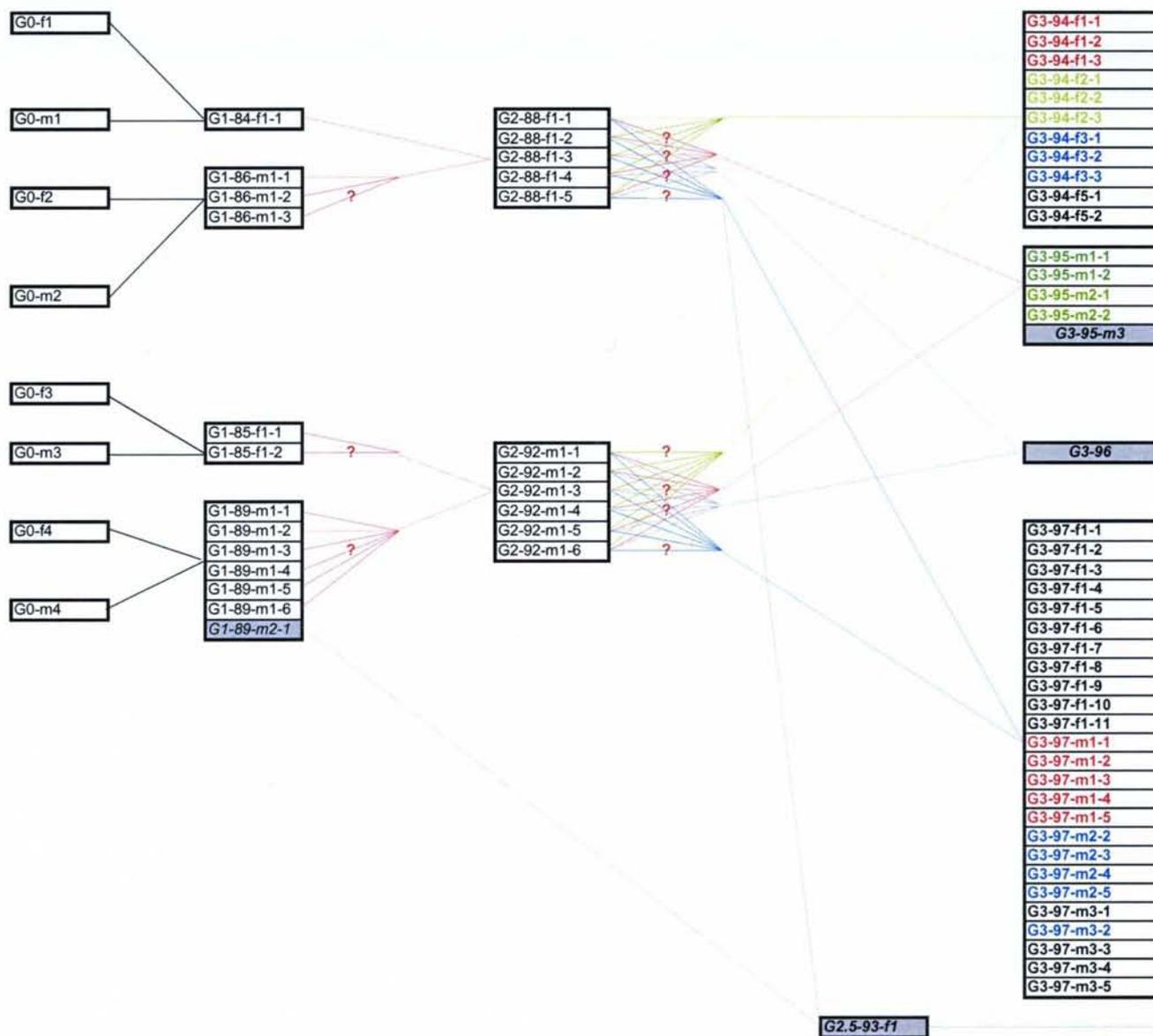
Collet,C., Candy, J.,and Sara, V. 1998. Thyrosine hydroxylase and insulin-like growth factor II but not insulin are adjacent in the teleost species barramundi, *lates calcarifer*. *Anim Genet* **29**:30-32

Sambrook J., Frisch E.F., and Maniatis T., 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Yowe, T.L., and Epping R.J. 1995. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene—a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. *Gene* **162**:255-259.

Yue, G., Yang Li, and Laslo Orban. 2001. Characterisation of Microsatellites in the IGF-2 and CH Genes of Asian Seabass *Lates calcarifer*. *Marine Biotechnology*, **3**:1-3

Annexe 1 : croisements effectués depuis l'introduction de l'espèce à Tahiti



Annexe 2 : références individuelles utilisées

Lieu de provenance	N° individu	N° sur le gel	Sexe	Références Généalogiques
Tahiti Aquaculture.	TA-005	T1	Mâle	G3-97-m3-2
Tahiti Aquaculture.	TA-006	T2	Mâle	G3-97-m2-2
Tahiti Aquaculture.	TA-007	T3	Mâle	G3-97-m2-3
Tahiti Aquaculture.	TA-010	T4	Mâle	G3-97-m2-4
Tahiti Aquaculture.	6450	T5	Femelle	G3-94-f3-1
Tahiti Aquaculture.	6451	T6	Femelle	G3-94-f3-2
Tahiti Aquaculture.	6452	T7	Femelle	G3-94-f3-3
Tahiti Aquaculture.	6654	T8	Mâle	G3-97-m2-5
Aquapac	1298	X3	Mâle	G3-97-m1-3
Aquapac	1295	X1	Mâle	G3-97-m1-1
Aquapac	1299	X4	Mâle	G3-97-m1-4
Aquapac	1287	A4	Mâle	G3-97-m1-5
Aquapac	1297	X2	Mâle	G3-97-m1-2
Aquapac	1848	A6	Femelle	G3-94-f1-2
Aquapac	1849	A7	Femelle	G3-94-f1-1
Aquapac	1998	A8	Femelle	G3-94-f1-3
COP-Ifremer	1686	C1	Femelle	G3-94-f2-3
COP-Ifremer	1687	C2	Femelle	G3-94-f2-1
COP-Ifremer	6250	C3	Femelle	G3-97-f1-1
COP-Ifremer	6251	C4	Femelle	G3-97-f1-2
COP-Ifremer	6253	C5	Femelle	G3-97-f1-4
COP-Ifremer	6254	C6	Femelle	G3-97-f1-5
COP-Ifremer	6255	C7	Femelle	G3-97-f1-6
COP-Ifremer	6256	C8	Femelle	G3-97-f1-7
COP-Ifremer	6257	C9	Femelle	G3-97-f1-8
COP-Ifremer	6258	C10	Femelle	G3-94-f2-2
COP-Ifremer	6260	C11	Femelle	G3-97-f1-10
COP-Ifremer	6261	C12	Femelle	G3-97-f1-3
COP-Ifremer	6262	C13	Femelle	G3-97-f1-9
COP-Ifremer	6454	C14	Femelle	G3-94-f5-2
COP-Ifremer	6650	C15	Femelle	G3-97-f1-11
COP-Ifremer	6675	C16	Mâle	G3-95-m1-1
COP-Ifremer	6676	C17	Mâle	G3-95-m1-2
COP-Ifremer	6677	C18	Mâle	G3-95-m2-1
COP-Ifremer	6678	C19	Mâle	G3-97-m3-1
COP-Ifremer	6680	C20	Mâle	G3-97-m3-3
COP-Ifremer	6681	C21	Mâle	G3-97-m3-4
COP-Ifremer	6682	C22	Mâle	G3-97-m3-5
COP-Ifremer	6683	C23	Mâle	G3-95-m2-2
Australie	S13	S13	?	-
Australie	S14	S14	?	-
Australie	S15	S15	?	-
Australie	S16	S16	?	-
Australie	S17	S17	?	-

Annexe 3 : protocole d'extraction de l'ADN

Milieux utilisés

- Ethanol 100%
- Ethanol 70 %
- Phénol équilibré par du tris pH 8 et additionné d'hydroxyquinoléine
- Chloroforme
- Mélange Phénol/Chloroforme, Alcool isoamylique AIA (25v/24v/1v)
- Acétate de sodium -----408.24 g/l (3 M) pH 5.2
- Tampon de lyse (en l'absence de protéinase K se conserve à T° ambiante)
 - NaCl-----5.85 g/l (100 mM) soit 0.585 g / 100 ml
 - Tris-HCL-----1.576 g/l (10 mM) soit 0.158 g/ 100 ml
 - EDTA-----9.305 g/l (25 mM) soit 0.930 g/ 100 ml
 - SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)-----5.0 g/l (0.5 %) soit 0.5 g/ 100 ml
 - PH -----8.0
 - Protéinase K (labile en tampon de lyse ----0.4 mg/ml ou 400 µg/ml et à préparer extemporanément)

Protocole

1. Prélever 30 mg de tissu et le déposer dans un tube eppendorf de 1.5 ml (on compte 1.2 ml de TP de lyse pour 100 mg de tissus ou 10^7 \varnothing (attention à bien rincer les outils de dissection entre chaque individu dans 1 bain d'une solution de SDS à 15%, puis dans un bain d'eau distillée et enfin dans un bain d'éthanol à 70%).
2. Dans le cas ou les échantillons à extraire sont conservés dans l'éthanol à 70 ou 80 % laisser sécher le prélèvement soit dans un bain-marie à sec à environ 60° C durant 30 mm ou une nuit sous hotte.
3. Ajouter 480 µl de tampon de lyse.
4. Ajouter 20 µl de Protéinase K (stock à 10mg/ml), afin d'être à 0.4 mg/ml en final.
5. Vortexer quelques secondes et incuber à 56° C toute la nuit.
6. Le lendemain ajouter 250 µl de phénol pur stabilisé au pH 8, vortexer quelques secondes et laisser agir pendant 10 mm puis ajouter 250 µl de chloroforme pur, vortexer et laisser agir encore 5 mm. Enfin centrifuger 15 mm à 10 000 G.
7. Récupérer la phase supérieure dans un nouvel eppendorf en prenant soin de pas récupérer l'interphase. (toutefois si cela arrive accidentellement, il y a une deuxième extraction au phénol-chloroforme AIA pour se rattraper).
8. Refaire une nouvelle extraction en rajoutant 500 µl d'un mélange phénol/chloroforme- AIA de proportion 25v/24v/1v .
9. Vortexer 15 secondes.
10. Puis centrifuger 15 mm à 10 000 G.
11. Récupérer la phase supérieure(≈ 400 µl) dans un eppendorf neuf anoté des références de l'échantillon à traiter en prenant grand soin de ne pas pipeter l'interphase.

12. Ajouter 40 μl d'une solution d'acétate de sodium 3 M.
13. Vortexer puis ajouter 800 μl d'éthanol absolu glacial (conserver au congélateur – 18° C)
14. Observer la formation d'un précipité d'ADN (méduse), (s'il n'y a pas d'ADN sous forme de méduse visible, mettre les eppendorfs au congélateur une nuit, voire à –80° C pendant 2 heures le temps de précipitation de l'ADN puis passer à l'étape de centrifugation.
15. Positionner les tubes sur le rotor, charnières vers l'extérieur puis centrifuger 20 à 30 mn à 10 000G, L'ADN se colle au fond du tube côté charnière.
16. Enlever l'éthanol absolu par renversement du tube en prenant garde de ne perdre le culot d'ADN.
17. Ajouter 800 μl d'éthanol 70 % pour laver le culot et enlever l'alcool 70 % comme dans l'étape précédente.
18. Laisser sécher durant la nuit sous hotte en couvrant d'une feuille d'aluminium ou a défaut environ 30 mn à 60° C dans un bain-marie à sec.
19. Enfin en final dissoudre l'ADN bien sécher dans 100 μl d'eau milliQ + 0.50 μl de Rnase à 10mg/ml de façon à être à 50 $\mu\text{g/ml}$ en final.
20. Contrôle quantitatif et qualitatif de l'ADN extrait par spectro.

Les culots d'ADN ont été repris dans 100 μl d'eau ultra pure et stockés à –20°C au congélateur.

Annexe 4 : protocole de révélation par coloration argentique

On enlève les spacers, le peigne et la petite plaque afin de récupérer uniquement la grande plaque et le gel pour la révélation.

Remarque : le protocole de révélation décrit ci-dessous doit être réalisé dans les cuves, si possible avec un couvercle, ou éloigné d'une source de lumière, afin d'obtenir une coloration homogène des différentes parties du gel.

On révèle le gel par coloration argentique, pour cela on effectue la série de bains suivante

1-Bain de fixation : 1 heure à 1 nuit

100 mL d'acide acétique glacial

320 mL d'éthanol 90°

580 mL d'eau bidistillée

2-Rinçage 1 : 10 min

213 mL d'éthanol 90°

787 mL d'eau bidistillée

3-Rinçage 2 : 10 minutes

1 L d'eau bidistillée

4-Sensibilisation: 1 minute exactement

250mg hydrosulfite de sodium

QSP.1 L d'eau bidistillée

4'- Rinçage de la cuve (! pas du gel) à l'eau bidistillée : permet d'obtenir un résultat final plus propre.

5-Bain d'argent : 40 minutes à 2-3 heures

2g nitrate d'argent

750 µL formaldéhyde 37 %

QSP.1 L d'eau bidistillée

5'-à la fin, verser le bain d'argent dans de l'eau de mer pour le neutraliser

6-Rinçage: 1 minute exactement

1 L d'eau bidistillée

7-Révélation : 1 à 4 minute selon l'intensité de la PCR et la qualité de la révélation

30 g carbonate de sodium

100 µL thiosulfate de sodium 5 %

500 µL formaldéhyde 37 %

QSP 1 L d'eau bidistillée

8-Arrêt de la révélation : environ 1 minute, assez longtemps pour que le gel ne se colore pas en jaune par la suite, mais pas trop longtemps pour que des bulles ne se forment pas sous le gel

32 mL d'acide acétique

9-Rinçage à l'eau bidistillée : le gel peut être conservé jusqu'à 12-24 heures dans l'eau bidistillée avant d'être scanné ou décollé à la soude A CONDITION qu'il soit encore bien collé à la grande plaque (sinon les mailles d'acryl se dilatent dans l'eau et le gel se déforme : la remarque vaut également si on décolle le gel à la soude et qu'on le rince ensuite à l'eau).

La récupération de l'information peut se faire en scannant le gel si la révélation est d'assez bonne qualité. On peut également récupérer le gel sur papier Whatman. Pour cela on baigne le gel dans une solution de soude 10 % pendant 10-30 minutes, on élimine les parties inintéressantes du gel, on décolle la partie du gel que l'on souhaite récupérer grâce à un fil dentaire tendu sous celui ci puis on élimine la soude et on la remplace par de l'eau bidistillée. On retire ensuite celle ci et on colle le gel sur une feuille de papier whatman. On sèche le tout sur un sécheur sous vide.

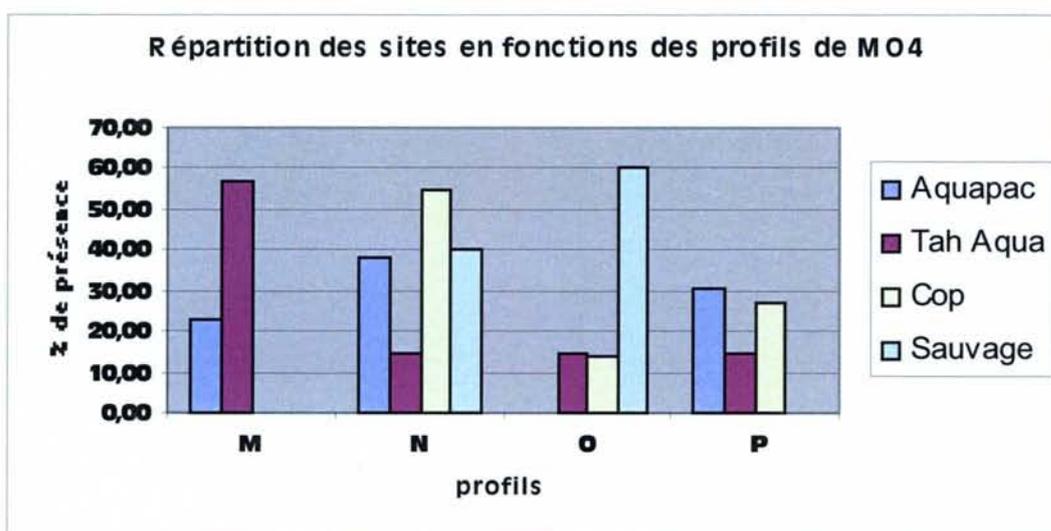
Annexe 5 : génotypes

population	lieu de prélèvement	individu			MO01	MO02	MO03
		ref généalogique	n° marque	ref biomol			
G3-94	aquapac	G3-94-f1-1	1849	A7	001001	002003	002004
G3-94	aquapac	G3-94-f1-2	1848	A6	001003	003004	002005
G3-94	aquapac	G3-94-f1-3	1847	A8	001004	003004	002005
G3-94	cop	G3-94-f2-1	1687	C2	001004	001004	002005
G3-94	cop	G3-94-f2-2	6258	C10	001003	003004	002002
G3-94	cop	G3-94-f2-3	1686	C1	001003	000000	002004
G3-94	tahaqua	G3-94-f3-1	6450	T5	000000	000000	000000
G3-94	tahaqua	G3-94-f3-2	6451	T6	003004	003004	002005
G3-94	tahaqua	G3-94-f3-3	6452	T7	003004	003004	002005
G3-94	cop	G3-94-f5-1	6453	-	000000	000000	000000
G3-94	cop	G3-94-f5-2	6454	C14	001004	003004	002005
G3-95	cop	G3-95-m1-1	6675	C16	000000	002004	002006
G3-95	cop	G3-95-m1-2	6676	C17	001003	002004	006007
G3-95	cop	G3-95-m2-1	6677	C18	002002	001004	003007
G3-95	cop	G3-95-m2-2	(6699)-6683	C23	002003	001004	006007
G3-97	cop	G3-97-f1-1	6250	C3	001002	005005	001002
G3-97	cop	G3-97-f1-2	6251	C4	002003	005005	001002
G3-97	cop	G3-97-f1-3	(6252)-6261	C12	003003	003004	001004
G3-97	cop	G3-97-f1-4	6253	C5	002003	005005	001002
G3-97	cop	G3-97-f1-5	6254	C6	001003	003004	001002
G3-97	cop	G3-97-f1-6	6255	C7	002003	003005	004006
G3-97	cop	G3-97-f1-7	6256	C8	003003	003004	004004
G3-97	cop	G3-97-f1-8	6257	C9	001003	003004	001002
G3-97	cop	G3-97-f1-9	(6259)-6262	C13	002003	003005	002006
G3-97	cop	G3-97-f1-10	6260	C11	003003	003003	001004
G3-97	cop	G3-97-f1-11	6650	C15	003003	003004	001002
G3-97	aquapac	G3-97-m1-1	1295	X1	001002	003005	004004
G3-97	aquapac	G3-97-m1-2	1297	X2	002003	003005	004004
G3-97	aquapac	G3-97-m1-3	1298	X3	003003	003003	001001
G3-97	aquapac	G3-97-m1-4	1299	X4	003003	003003	000000
G3-97	aquapac	G3-97-m1-5	1287	A4	003003	003004	004004
G3-97	tahaqua	G3-97-m2-2	(6651)-TA002	T2	003003	004004	001002
G3-97	tahaqua	G3-97-m2-3	6652	T3	001002	003005	001002
G3-97	tahaqua	G3-97-m2-4	6653	T4	001003	003004	004004
G3-97	tahaqua	G3-97-m2-5	6654	T8	001002	003005	004006
G3-97	cop	G3-97-m3-1	6678	C19	002003	005005	001002
G3-97	tahaqua	G3-97-m3-2	(6679)-TA005	T1	001002	003005	001002
G3-97	cop	G3-97-m3-3	6680	C20	003003	003004	001002
G3-97	cop	G3-97-m3-4	6681	C21	003003	003004	002006
G3-97	cop	G3-97-m3-5	6682	C22	002003	003005	004004
australie	-	-	-	S13	000000	001004	006006
australie	-	-	-	S14	003003	004004	006006
australie	-	-	-	S15	003003	004004	006006
australie	-	-	-	S16	002003	003004	006006
australie	-	-	-	S17	003003	003003	006006

Annexe 6 : Profils observés au locus MO04

Pour le locus MO04, l'impossibilité de discriminer les allèles limite l'interprétation des gels à une analyse par profil de migration,

Groupe différencié par profil	Numéro des individus dans le groupe considéré
M	T1 – T2 – T3- T4 – A1 – A3
N	A4 – A5 – A6 – A8 – T7 – C1 – C2 – C9 – C10 – C13 – C14 – C15 – C19 – C20 – C21 – C22 – S14 – S15 – X3
O	T6 – C3 – C5 – C11 – S13 – S16 – S17
P	T8 – A7 – C6 – C7 – C8 – C12 – C18 – C23 – X1 – X2 – X4
	C17 – A2 (pas de réponse avec ce marqueur)



Annexe 7 : Fréquences alléliques observées pour chaque population

N°	Nom de la population
1	G3-94
2	G3-95
3	G3-97
4	australie

H exp. = H calculée avec biais
 H n.b. = H calculée sans biais (Nei 1978)
 H obs. = H observée

LOCUS	POPULATION			
	1	2	3	4

MO01				
(N)	9	3	25	4
1	0.4444	0.1667	0.1600	-
2	-	0.5000	0.2400	0.1250
3	0.2778	0.3333	0.6000	0.8750
4	0.2778	-	-	-
H exp.	0.6481	0.6111	0.5568	0.2188
H n.b.	0.6863	0.7333	0.5682	0.2500
H obs.	0.8889	0.6667	0.6000	0.2500
MO02				
(N)	8	4	25	5
1	0.0625	0.2500	-	0.1000
2	0.0625	0.2500	-	-
3	0.4375	-	0.4600	0.3000
4	0.4375	0.5000	0.2200	0.6000
5	-	-	0.3200	-
H exp.	0.6094	0.6250	0.6376	0.5400
H n.b.	0.6500	0.7143	0.6506	0.6000
H obs.	1.0000	1.0000	0.6800	0.4000
MO03				
(N)	9	4	24	5
1	-	-	0.3125	-
2	0.5556	0.1250	0.2708	-
3	-	0.1250	-	-
4	0.1111	-	0.3333	-
5	0.3333	-	-	-
6	-	0.3750	0.0833	1.0000
7	-	0.3750	-	-
H exp.	0.5679	0.6875	0.7109	-
H n.b.	0.6013	0.7857	0.7261	-
H obs.	0.8889	1.0000	0.7083	-

N° RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUSION	NB pages
DRV/RA							
RA-2003-01	RA	LCM Sète	Hamon P.Y., C. Vercelli, Y. Pichot, F. Lagarde, P. Legall, J. Oheix	Les malaïgues de l'étang de Thau; Tome 1. Description des malaïgues, moyens de lutte, recommandations	janv	libre	64
RA-2003-02	RA	LAC Nouvelle Calédonie	Goarant C., D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert, A.L. Marteau	Bases des connaissances sur l'épidémiologie de <i>Vibrio nigripulchritudo</i> , agent étiologique du "Syndrome d'été" chez les crevettes d'élevage en Nouvelle-Calédonie	février	libre	27
RA-2003-03	RA	LCB La Trinité sur Mer	Fleury P.G., F. Cornette, S. Claude, H. Palvadeau, S. Robert, F. d'Amico, P. Le Gall, C. Vercelli, S. Pien	REMORA Résultats des stations nationales, année 2001	mars	libre	48
RA-2003-04	RA	LCB La Trinité sur Mer	Fleury P.G., C. Simonne, S. Claude, H. Palvadeau, P. Guilpain, F. d'Amico, P. Le Gall, C. Vercelli, S. Pien	REMORA Résultats des stations nationales, année 2002	mars	libre	49
RA-2003-05	RA	LAT Tahiti	Vonau V., C. Rouxel, D. Saulnier, N. Cochenec-Laureau, G. Nedelec et E./ Goyard	Génotypage des géniteurs de <i>Ictalurus calcarifer</i> de Tahiti: aide à la domestication raisonnée du Loup Tropical pour la filière Tahitienne	avril	libre	20