

**MAITRISE « BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ECOSYSTEMES »**

**Option : Ecotoxicologie aquatique  
Mention « Environnement »**

Année universitaire 2001-2002

**RAPPORT DE STAGE**

IFREMER  
BIBLIOTHEQUE  
LA TREMBLADE

Les gènes de l' amylase chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* :  
transmission et mise en évidence des pressions sélectives



**RAMBELO-RAMANITRA E. Sehen**

68891  
OR 1599  
Ecoo.RAM.G.

**Maîtres de stage : Pierre BOUDRY  
Lionel DEGREMONT**

**IFREMER**  
Direction des ressources vivantes  
Laboratoire de Génétique et Pathologie  
17 390 La Tremblade



**Ifremer**

Université Bordeaux I  
UFR des Sciences Biologiques

**MAITRISE « BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ECOSYSTEMES »**

**Option : Ecotoxicologie aquatique  
Mention « Environnement »**

Année universitaire 2001-2002

**RAPPORT DE STAGE**

Les gènes de l' amylase chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* :  
transmission et mise en évidence des pressions sélectives

**RAMBELO-RAMANITRA E. Sehen**

**Maîtres de stage : Pierre BOUDRY  
Lionel DEGREMONT**

**IFREMER**  
Direction des ressources vivantes  
Laboratoire de Génétique et Pathologie  
17 390 La Tremblade



## REMERCIEMENTS

Ce stage au sein du laboratoire de Génétique et Pathologie à la station La Tremblade de l'IFREMER m' a permis de lever le voile opaque qui recouvrait les techniques *théoriques* de la biologie moléculaire.

Il s'est fait sous la direction de Pierre Boudry à qui j'adresse mes sincères remerciements ainsi que reconnaissance pour sa disponibilité et pour m'avoir permis d' effectuer ce stage très intéressant mais hélas trop court.

Et avec le concours de Lionel Degremont dans la thèse duquel s'intègre et a participé cette étude, que je remercie et auquel je souhaite bon courage.

J'aurai goûté au domaine de la recherche et appris que « si cela marchait toujours, ce ne serait pas de la recherche mais de l'industrie ».

Une attention particulière est adressée à Franck Berthe, sans lequel ce stage n'aurait pu se faire.

A tous les stagiaires et toute l'équipe de La Tremblade, avec qui il a été agréable de travailler dans une ambiance détendue.

Et à tous les miens qui continuent de croire en la voie que je me trace.

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1:** Les différents réactifs pour le mix PCR et leurs intérêts..... p 6
- Tableau 2 :** Allèles identifiés après coupure par EcoRI des gènes A et B de l'amylase ..... p 7
- Tableau 3 :** Fréquence des génotypes tri-alléliques A et B de la population polymorphe, selon les 3 conditions..... p 8

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Structure des gènes A et B de l'amylase et fixation des amorces ..... p 5
- Figure 2 :** Représentation schématique des différents allèles des deux gènes de l'amylase, et position des sites de coupure EcoRI ..... p 7
- Figure 3 :** Profils électrophorétiques des différents génotypes observés en génération G1 ..... p 8
- Figure 4 :** Fréquences des différents génotypes multi-locus présentant 3 allèles pour les gènes A et/ou B dans la population polymorphe, selon les conditions trophiques d'élevage ..... p 8

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

EDTA : éthylène diamine tetraacetic acid

Go : génération 0

G1 : première génération

G2 : deuxième génération

Pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

TE : tris acétate EDTA

UV : ultra-violets

V : volts

## SOMMAIRE

|   | Pages |
|---|-------|
| INTRODUCTION  | 1     |
| I. PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL : L'IFREMER                              | 2     |
| I.1. <u>Présentation générale</u>   | 2     |
| I.2. <u>Historique</u>  | 2     |
| I.3. <u>L' IFREMER à La Tremblade</u>   | 2     |
| II. MATERIEL ET METHODES  | 3     |
| II.1. <u>L'espèce</u>   | 3     |
| II.2. <u>Familles Morest</u>  | 3     |
| II.3. <u>Population polymorphe</u>  | 3     |
| II.4. <u>Extraction de l'ADN</u>  | 4     |
| II.5. <u>La réaction de polymérisation en chaîne ou Polymerase Chain Reaction</u> | 5     |
| II.5.1. Principe  | 5     |
| II.5.2. Gènes   | 5     |
| II.5.3. Réactifs  | 5     |
| II.6. <u>Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose</u>                         | 6     |
| II.7. <u>Visualisation</u>  | 6     |
| II.8. <u>Restriction</u>  | 6     |
| III. RESULTATS  | 7     |
| III.1. <u>La population polymorphe</u>  | 7     |
| III.1.1. Profils des allèles des gènes A et B de l'amylase                        | 7     |
| III.1.2. Fréquences génotypiques  | 8     |
| III.2. <u>Les familles MOREST</u>   | 9     |
| IV. DISCUSSION  | 9     |
| CONCLUSION  | 10    |

## INTRODUCTION

Le phénomène de mortalité estivale chez *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est reporté depuis de nombreuses années. Des cas de mortalité, pouvant atteindre 60% de la population, sont signalés dès 1940 au Japon (Koganezawa, 1974), aux Etats-Unis dans les années 50 ( Glude, 1975), et en France dès l'introduction de *C. gigas* en 1970-1971 ( Maurer et Comps, 1986). Ces mortalités affectent aussi bien les adultes (Glude, 1975) que le naissain (Cheney et al., 2000). Les causes exactes de ce phénomène sont souvent non identifiées et plusieurs facteurs sont concomitants à l' apparition de ces mortalités massives dont la température élevée de l'eau et l' état physiologique.

Un certain nombre de parutions montrent qu'il pourrait exister un déterminisme génétique lié à ces mortalités. Les études récentes du polymorphisme de certains gènes codant pour des caractères susceptibles d'être sélectionnés de manière différentielle dans un environnement variable (dans l'espace ou le temps) ouvrent des perspectives nouvelles. Parmi ces gènes, les travaux menés sur les gènes de l'amylase permettent de tester si le polymorphisme observé peut servir à sélectionner des individus plus performants dans un milieu trophique donné (Moal et al. , 2000).

D'après les approches réalisées pour comprendre le phénomène des mortalités estivales, l' IFREMER développe actuellement un programme pluridisciplinaire dans le cadre du projet « **MOREST** » (MORTalités ESTivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*). Les objectifs sont de déterminer (1) les bases génétique du caractère de survie au stade naissain (héritabilité) et les corrélations avec d'autres caractères d'intérêt (la croissance), et (2) la possibilité de sélectionner pour ce caractère.

Cette étude s'inscrit dans la participation au projet génétique. Elle s'intéresse particulièrement à des génotypes rares présentant trois allèles pour l'un ou les deux gènes de l'amylase, rencontrés dans les familles et populations constitués dans ce programme. Elle vise d'une part à faire un suivi de la ségrégation des allèles chez la descendance à partir de parents possédant ces génotypes rares (familles MOREST) ou non (population polymorphe). D'autre part, elle va tenter de montrer s'il existe une pression sélective qui influe sur les génotypes des huîtres creuses en fonction des conditions trophiques.

## **I. PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL : L'IFREMER**

### **I.1. Présentation générale**

L'IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER, est un établissement public à caractère industriel et commercial créé par un décret du 5 juin 1984. Il résulte de la fusion du Centre National d'Exploitation pour les Océans (CNEXO) et de l'ISTPM ( Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes). Gérant un budget de plus de 152 000 000 euros, il est placé sous la tutelle de ministères chargés de la recherche, des pêches et cultures marines, de l'équipement, du logement, des transports. Il comprend 78 laboratoires ou services de recherche répartis dans 24 stations ou centres sur tout le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM.

### **I.2. Historique**

L'Institut Scientifique et technique des Pêches Maritimes a été pendant 69 ans à la Tremblade au service du bassin de Marennes - Oléron :

- 1913 : Création de l'AEIO ( Association d' Encouragement des Industries Ostréicoles et conchyliques françaises) à la Tremblade
- 1918 : Création de l'OSTPM ( Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes)
- 1953 : Transformation de l'OSTPM en ISTPM ( Institut Scientifique et technique des Pêches Maritimes)
- 1954 : L'inspection sanitaire et le laboratoire de biologie sont individualisés à la Tremblade
- **1984 : Création de l'IFREMER**

### **I.3. L' IFREMER à La Tremblade**

La station de La Tremblade comprend trois laboratoires. Elle est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement littoral .

- le **DRV/LGP ( Direction des Ressources Vivantes/ Laboratoire Génétique-Pathologie)**: ses axes de recherche s'inscrivent spécifiquement dans la génétique et la pathologie des mollusques bivalves marins. Ses compétences sont reconnus au niveau national et international.
- le **laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes ( DRV/LCPC)** : son action est tournée vers l'étude de la croissance et de la mortalité des cheptels, afin d'améliorer les productions du bassin et de comprendre les dysfonctionnements de l'écosystème conchylicole.
- **Direction de l'Environnement et de l'aménagement du Littoral ( DEL)** : dont l'une des principales missions consiste à mettre en œuvre les réseaux de surveillance garantissant aux conchyliculteurs et aux consommateurs des informations fiables concernant la qualité des eaux et des coquillages.

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. L'espèce

*Crassostrea gigas* ( Mollusques, Bivalves, Filibranches, Ostreidae) est une huître creuse originaire de l'Asie du Sud-Est, également connue sous le nom d'huître japonaise et huître du Pacifique. Introduite en France en 1966 (Comps et al, 1976), *C.gigas* est le bivalve le plus cultivé en France. On travaillera sur des individus juvéniles, de taille variable, conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### II.2. Familles Morest

Les génotypes des parents des familles ( $G_0$ ) ont été déterminés. Cela a permis de se focaliser sur deux génotypes particuliers : (1) pour la femelle 5 de la série 1 qui présente 3 allèles pour le gène A, et (2) pour la femelle 32 de la série 2 avec 3 allèles pour le gène B. Elles vont être , entre autre, retenues pour constituer une première génération ( $G_1$ ) formée de 3 séries de 24 familles bi-parentales.

- **F2-5** : croisement entre le mâle 2 de génotype (A1A1/B1B1) et la femelle 5 de génotype (A1A2A3/B1B1).
- **F8-32** : croisement entre le mâle 8 de génotype (A1A1/B1B2) et la femelle 32 de génotype (A1A1/B1B2B3).

Selon la réussite en éclosion et micronurserie, les cheptels constitués de 45 familles (15 familles par série de croisement) ont été transférés à la nurserie de Bouin pour un grossissement intensif avant la mise sur site. Leurs performances de survie ont été évaluées sur : les sites de Ronce Perquis (bassin de Marennes-Oléron), de Fort Espagnol (Bretagne sud ), de la Baie des Veys (Normandie).

F2-5, avec une meilleure survie, a notamment servi à l'élaboration de la  $G_2$ , dont l'élevage larvaire a eu à La Tremblade, tandis que le grossissement a été assuré à Bouin. Puis chaque famille a été répartie sur les trois sites expérimentaux.

### II.3. Population polymorphe

De plus, une population polymorphe pour les gènes de l'amylase a été créée et a permis de déterminer les fréquences alléliques des 2 gènes A et B, sous différentes conditions trophiques (**non limitante, limitante, évolutive**). Pour ce faire, des fragments de branchies de 205 individus constituant la génération  $G_0$  (populations naturelles du Bassin de Marennes Oléron) ont été prélevés afin de déterminer les génotypes pour les 2 gènes de l'amylase par PCR-RFLP. Les individus présentant un ou plusieurs allèles rares pour l'un ou les deux gènes de l'amylase ont été retenus : un croisement multi-parental de 14 femelles et 5 mâles a été effectué pour la constitution de la population polymorphe pour les gènes de l'amylase.

## **II.4. Extraction de l'ADN**

### **❖ Au phénol-chloroforme**

Selon le protocole phénol-chloroforme ( Moore, 1993), l'extraction de l'ADN à partir de tissus branchiaux et du manteau prélevés par biopsie se déroule en trois étapes :

❶ **la lyse des cellules** où un morceau de branchie est laissé au bain-marie à 55°C durant toute la nuit sous l'action :

- de 20µL de protéinase K (10 mg/ml) , protéinase très active, qui a pour but de digérer les protéines (de la cellule) associées à l'ADN nucléaire libéré dans le milieu.

- de 400µL de tampon d'extraction composé de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), puissant détergent anionique détruisant les membranes, et d'EDTA, agent chélateur complexant les ions  $Ca^{2+}$  indispensable à la cohésion cellulaire.

❷ **la purification au phénol/ chloroforme** : le principe consiste à traiter le lysat cellulaire dans du phénol puis, après centrifugation (10 000 tours.min<sup>-1</sup>, 4°C, 10 min) à éliminer la phase phénolique, avec du chloroforme, afin d'éliminer les traces éventuelles de phénol qui sont fortement inhibitrices des réactions enzymatiques. Le phénol, équilibré à pH 8, est un puissant agent déprotéinisant dans lequel les acides nucléiques ne sont pas solubles.

❸ **la précipitation des acides nucléiques** : le surnageant obtenu après centrifugation (10 000 tours.min<sup>-1</sup>, 4°C, 10 min) du traitement au chloroforme est récupéré, auquel on ajoute de l'éthanol pur 100°, ce qui permet la précipitation de l'ADN à -20°C pendant 2 à 3 heures.

On procède à une nouvelle centrifugation (10 000 tours.min<sup>-1</sup>, 4°C, 10 min), l'éthanol pur est éliminé, remplacé par de l'éthanol 70° pour le rinçage. Les culots sont mis à sécher à l'étuve, à 37°C.

❹ **Le rendement de l'extraction** : la concentration de l'ADN extrait est déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm de solutions diluées au 1/20 dans du tampon TE. Des solutions filles d'ADN sont ensuite préparées à partir de l'ADN natif, qui restera conservé à -20°C-, qui serviront pour les expériences de biologie moléculaire.

### **❖ Au chelex®**

Cette technique, plus rapide mais peut-être de moindre rendement, a été utilisée à titre comparatif quant à la qualité de l'ADN extrait.

Le morceau de tissu, placé dans un tube Eppendorf, est laissé au bain-marie toute la nuit à 55°C sous l'action du Chelex® 10% qui sert de chélateur, et de la protéinase K. On le transfère ensuite dans un bain-marie bouillant à 100°C pendant 15 min avant centrifugation. Le surnageant prélevé est la solution d'ADN natif qui est conservé dans du tampon TE à -20°C, dont on a préparé une solution-fille.

## II.5. La réaction de polymérisation en chaîne ou Polymerase Chain Reaction

### II.5.1. Principe

Mise au point en 1985 par le Dr Kary Mullis, la PCR permet l'amplification exponentielle in vitro de séquences spécifiques d'ADN (fragment d'intérêt ou gène cible), à partir d'une faible quantité d'ADN. Pour cela, des amorces complémentaires aux extrémités de la région d'ADN à amplifier, servent de point d'initiation pour la synthèse d'ADN par élongation, par action de la Taq polymérase. La réaction comporte 35 cycles, chaque cycle étant constitué de trois phases différentes :

- la **dénaturation** de l'ADN à 94°C : les liaisons faibles hydrogène qui assurent la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.
- l'**hybridation** des amorces (ou annealing) à 58°C: repose sur l'appariement des bases complémentaires des amorces sur l'ADN monocaténaire.
- l'**élongation** (ou extension des amorces) à 72°C, dans le sens 5' vers 3'.

### II.5.2. Gènes

Pour cette étude, on amplifie une partie des gènes codant pour l'amylase. Il s'agit de la zone entre l'exon 4 et 6 comprenant deux introns. On utilise les amorces Ha-aH et Hb2-bH, respectivement spécifiques aux gènes A et B.

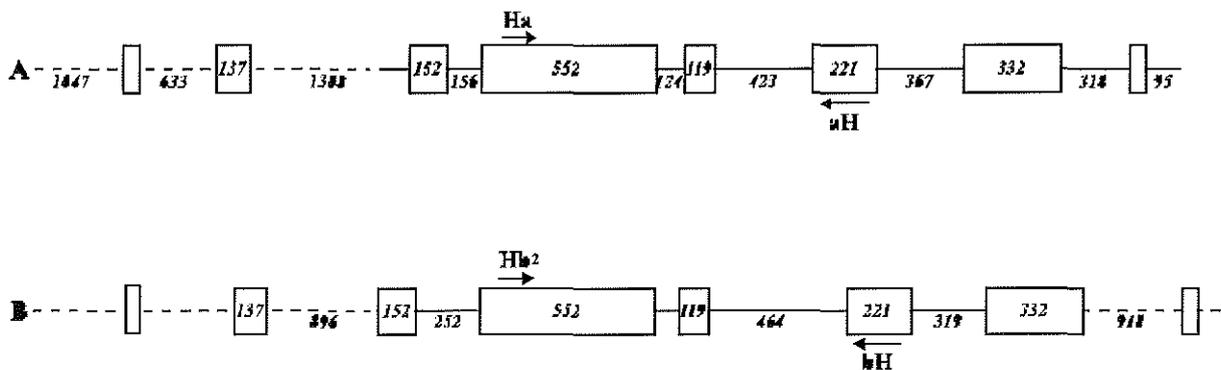


Figure 1: Structure des gènes A et B de l'amylase et fixation des amorces.

Les rectangles représentent les exons et les traits les introns. Les nombres représentent la taille en pb de chaque intron ou exon.

### II.5.3. Réactifs

Pour chaque échantillon, deux PCR sont effectuées : une pour le gène A et une autre pour le gène B.

Le mix (mélange réactionnel) PCR pour un échantillon est composé de :

**Tableau 1: Les différents réactifs pour le mix PCR et leurs intérêts**

| Réactifs                 | Volume (µL) | Fonction   |
|--------------------------|-------------|--|
| Eau distillée            | 27.8        |  |
| dNTP                     | 0.5         | Nucléotides nécessaires pour l'élongation  |
| Tampon MgCl <sub>2</sub> | 1.5         | Ions Mg <sup>2+</sup> servent de cofacteurs à la polymérase (Powell, 1995).<br>Meilleur fonctionnement de l'enzyme |
| Tampon 10X               | 5           | Pour optimiser l'enzyme  |
| Amorce Hx                | 5           | Amorce sens se fixant sur l'extrémité 5' du gène A ou B  |
| Amorce xH                | 5           | Amorce anti-sens se fixant sur l'extrémité 3' du gène  |
| Taq polymérase           | 0.2         | ADN polymérase : permet la synthèse du nouveau brin d'ADN après fixation des amorces et grâce aux nucléotides      |
| ADN                      | 5           | Séquence délimitée par les amorces à amplifier   |

## **II.6. Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose**

A pH neutre, l'ADN est chargé négativement avec un groupement phosphate H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> qui participe à la liaison phosphodiester. Cette charge négative, répartie de façon homogène sur la molécule, est la même quelque soit la séquence du segment d'ADN considérée. Cette propriété a été mise à profit pour séparer les molécules d'ADN dans un champ électrique à travers un gel poreux .

Le gel utilisé est le gel d'agarose à 1%. On y ajoute une solution de bromure d'éthidium, BET, molécule plane qui s'intercale entre les plateaux formés par les paires de bases de l'ADN, traduit par une meilleure fluorescence à la révélation. Selon MacCallum (1995), ce gel , dont les mailles sont larges, permet de séparer des molécules avec une taille de 100 à 3000 pb.

La migration se fait à température ambiante, sous une tension de 150V pendant une heure, dans une cuve à électrophorèse recouverte de tampon TAE.

## **II.7. Visualisation**

Après migration, les molécules d'ADN sont visualisées sous lumière ultraviolette. Le BET présent dans le gel d'agarose émet une fluorescence sous UV beaucoup plus intense qu'à l'état libre.

## **II.8. Restriction**

Connue sous le nom de RFLP, le Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction est basé sur la variabilité de la taille des fragments produits par la restriction de l'ADN cible par une enzyme de restriction.

Pour cette étude, la restriction se fait directement sur les produits PCR des locus A et B en utilisant l'enzyme de restriction EcoRI, reconnaissant la séquence 5' - G↓AATC -3'.

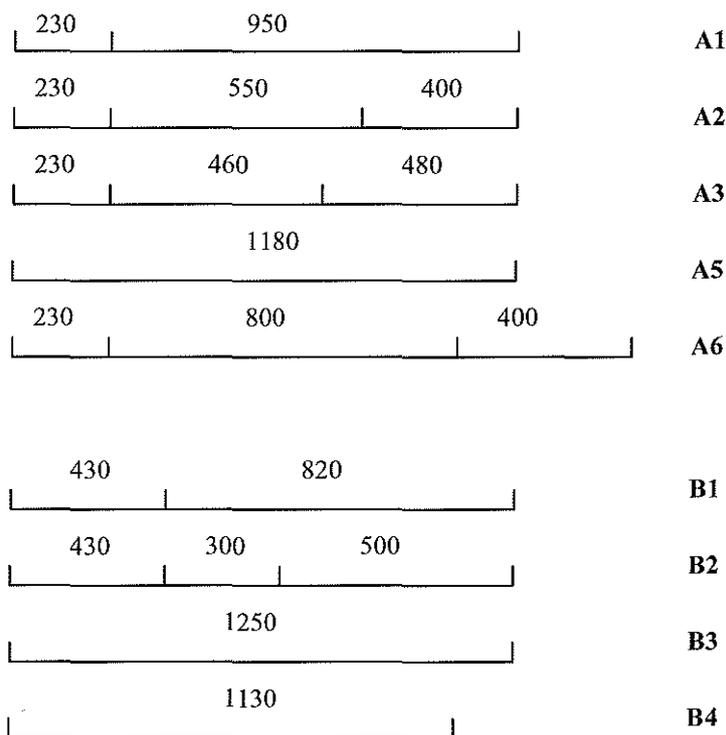
### III. RESULTATS

Cette étude a participé dans un premier temps à une parallèle portant sur la population polymorphe.

#### III.1. La population polymorphe

##### III.1.1. Profils des allèles des gènes A et B de l'amylase

La figure 2 montre la position des sites de coupure EcoRI des différents allèles des gènes A et B codant pour l'amylase chez *C. gigas*. Ces allèles se distinguent facilement en RFLP par un nombre variable de sites de restriction (de 0 à 2) et de par leurs différentes positions au niveau des séquences amplifiées.



**Figure 2 : Représentation schématique des différents allèles des deux gènes de l'amylase, et position des sites de coupure EcoRI.** Les chiffres correspondent à la taille en paire de bases de chaque fragment issu de la digestion.

Les résultats des électrophorèses nous montrent différents profils pour les individus analysés en première génération, obtenus avec les amorces spécifiques Ha-aH et Hb2-bH, qui sont :

- Extraits avant restriction (Figure 3) : **gène A** : une bande d'environ 1180 pb et/ou 1430 pb.
- gène B** : une bande d'environ 1250 pb.

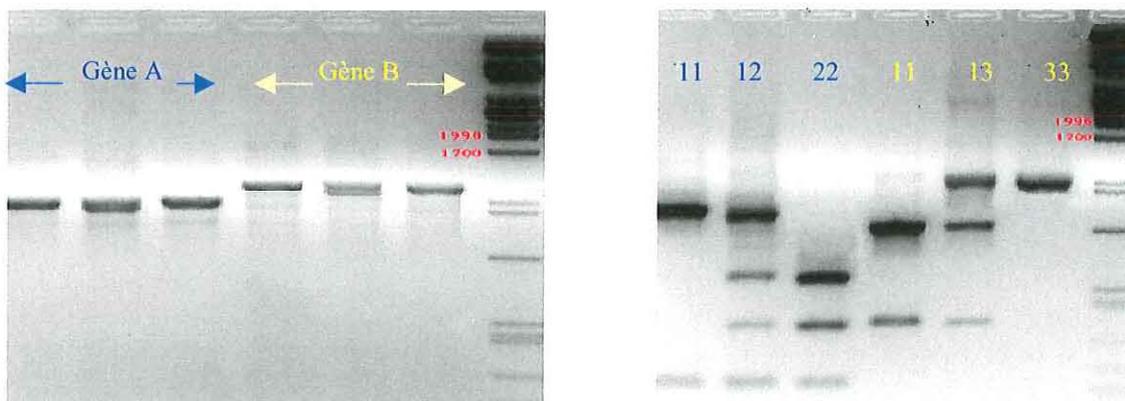
Ainsi nous avons bien amplifié de manière spécifique des portions des gènes codant pour l'amylase.

- Extraits après restriction (Figure 3)

**Tableau 2 : Allèles identifiés après coupure par EcoRI des gènes A et B de l'amylase**

| gène A                                   | gène B                                   |
|--|--|
| allèle A1 : bandes de 230 et 950 pb      | allèle B1 : bandes de 430 et 820 pb      |
| allèle A2 : bandes de 230, 380 et 560 pb | allèle B2 : bandes de 430, 300 et 500 pb |
| allèle A3 : bandes de 230, 460 et 480 pb | allèle B3 : bande de 1250 pb             |
| allèle A6 : bandes de 230, 400 et 800 pb |  |

Dans la population polymorphe, 4 allèles ont donc été identifiés pour le gène A et 3 allèles pour le gène B.



**Figure 3 : Profils électrophorétiques des différents génotypes observés en génération G<sub>1</sub>.**

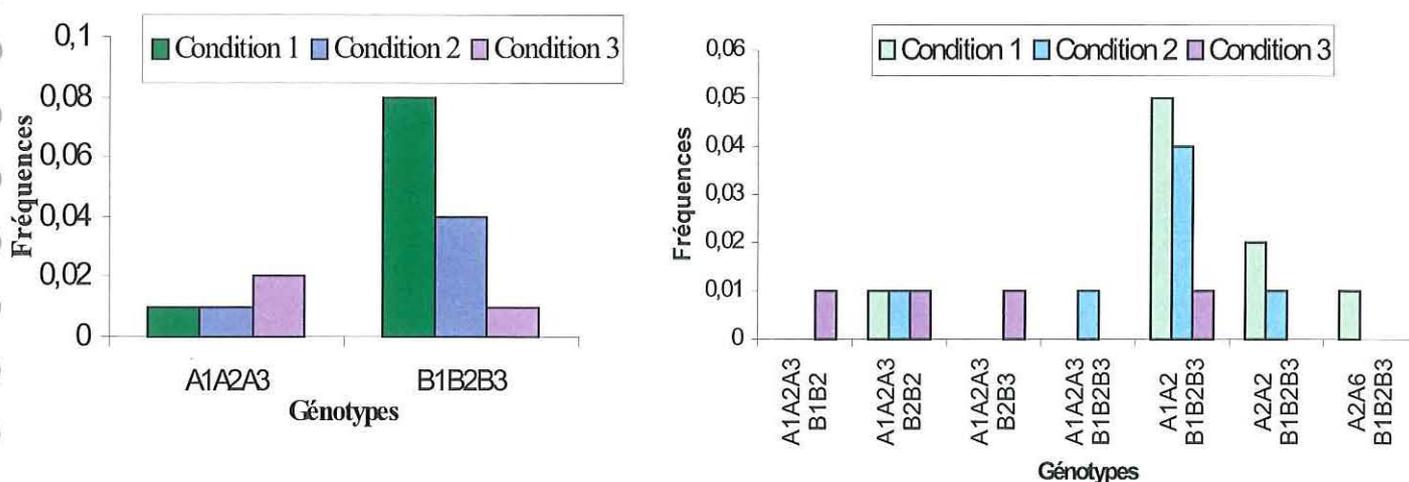
A gauche, les produits PCR n'ayant pas subi de restriction et à droite, après restriction par EcoRI. En rouge correspond la taille de quelques fragments du marqueur de taille. En bleu, gène A amplifié par Ha-aH. En jaune, gène B amplifié par Hb2-bH. Les chiffres représentent les génotypes. (Ex : 11 correspondant au génotype A1A1 ).

### III.1.2. Fréquences génotypiques

30 génotypes multi-locus, regroupant les gènes A et B, ont été dénombrés dans la population polymorphe. Les génotypes A1A1/B1B1 et A1A2/B1B2 sont les plus fréquents : respectivement 20% et 22%. Mais nous allons essentiellement nous intéresser aux génotypes rares suivants :

| Génotypes | Condition 1 | Condition 2 | Condition 3 |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| A1A2A3    | 1/131 (1%)  | 1/135 (1%)  | 3/141 (2%)  |
| B1B2B3    | 10/131 (8%) | 6/135 (4%)  | 1 /141(1%)  |

**Tableau 3 : Fréquence des génotypes tri-alléliques A et B de la population polymorphe, selon les 3 conditions**



**Figure 4 : Fréquences des différents génotypes multi-locus présentant 3 allèles pour les gènes A et/ou B dans la population polymorphe, selon les conditions trophiques d'élevage**

### **III.2. Les familles MOREST**

La démarche similaire est appliquée sur les échantillons des familles MOREST F2-5 Bouin et F8-32 Bouin et Ronce.

Néanmoins, les génotypes des individus de la génération G2 n'ont pu être établis de par un problème de non-amplification de l'ADN lors de la PCR, manipulation de routine ayant pourtant toujours marché jusque là. Il n'a donc pas été possible de procéder au RFLP. Plusieurs hypothèses ont été formulées, suivies de vérifications expérimentales par électrophorèse, afin d'en trouver l'explication. Les amorces ainsi que les réactifs utilisés pour le mix PCR ont été remplacées par des neufs. La qualité de l'ADN a été vérifiée en procédant à l'extraction au Chelex®. Des gammes d'ADN ont été effectués : une concentration trop élevée d'ADN inhibe l'amplification. Les résultats obtenus se sont révélés très aléatoires, rendant impossible une interprétation relative. Il resterait un dysfonctionnement du thermocycleur. Des échantillons à amplifier, envoyés à Ifremer –Brest, ont donné de meilleurs résultats, mais pas entièrement probants, éliminant déjà l'hypothèse de la mauvaise qualité de l'ADN extrait. Le profil des allèles des gènes de l'amylase restent inchangés. D'autres analyses seront prochainement entreprises pour résoudre ce problème.

## **IV. DISCUSSION**

### **Détermination des génotypes à trois allèles**

Pour le gène A, les profils électrophorétiques des échantillons (A1A2A3) montraient les fragments caractéristiques des trois allèles avec une intensité égale. Quant au gène B, l'interprétation des gels a été plus délicat. En effet, les bandes des allèles B2 et B3 étaient nettes et de même intensité, et deux bandes plus faibles étaient également observées à 820 pb et 730 pb. Le fragment 820 pb étant caractéristique de l'allèle B1, il a été émis que ces huîtres étaient (B1B2B3). Des analyses complémentaires restent à faire pour confirmation.

Par ailleurs, la présence d'individus à trois allèles pour les gènes A et B peut être expliquée par l'hypothèse qu'il n'existerait pas un locus par gène, mais plusieurs. Par conséquent, le génotype exact de ces huîtres présenteraient quatre allèles, comme par exemple A1A1 A2A3.

### **Population polymorphe**

Les génotypes multi-locus, au nombre de 7, s'avèrent rares à la génération G<sub>1</sub> de la population polymorphe, avec une fréquence de moins de 5%. De plus, il ne semble pas avoir de conditions trophiques favorisant plus qu'un autre la présence de ces génotypes, mais quand ils existent, ils sont généralement de l'ordre de 1%.

D'après les données d'études faites sur la génération  $G_0$ , la détermination des génotypes indique 27 génotypes multi-locus, dont 24 considérés rares (moins de 5%). Cependant, les 14 femelles et 5 mâles de  $G_0$  ne présentaient aucun génotype à trois allèles. Ces derniers sont donc apparus chez la descendance. L'apparition de ces génotypes chez l'huître creuse pourrait ainsi être interprétée comme un signe d'adaptation génétique pour la survie, face à la pression sélective.

### **Familles MOREST**

Ceci pourrait être confirmé avec l'analyse de la ségrégation des allèles chez les générations suivantes et de l'évolution des fréquences de ces génotypes à trois allèles. Cependant, il faut noter que la famille MOREST F2-5 a été résistante, tandis que F8-32 a connu 80% de mortalité, mais il faut prendre en considération tous les paramètres pouvant l'expliquer. La ségrégation permettra de vérifier si ces génotypes pourraient bien être responsables du déterminisme génétique du caractère survie.

Des travaux similaires sur le polymorphisme de l'isoamylase chez *Drosophila ananassae* (Da Lage et al., 1989) ont mis en exergue les faits suivants :

- **La différenciation géographique du polymorphisme de l'amylase.** En effet, à partir d'échantillons prélevés dans divers pays, onze isoamylases ont été identifiés chez *D. ananassae* adultes. Les populations africaines et de Madagascar se sont révélées davantage polymorphes que celles d'Asie et ont montré une large variété de phénotypes. Ceci pourrait être expliqué par un nombre plus important de loci fonctionnels dans les populations d'Afrique.
- **La présence de multiples loci du gène,** indiquant une multiplication du gène codant pour l'amylase, où au moins quatre copies du gène semblent être actifs (Da Lage, 1992). Ceci serait dû à des duplications qui auraient eu lieu durant l'évolution du sous-groupe de *D. ananassae*.

### **CONCLUSION**

Cette étude a permis de connaître et de se familiariser avec les techniques et procédures conduisant à identifier les possibles effets sélectifs influant sur les constitutions génétiques de l'huître creuse *C.gigas* et sur l'évolution de ses gènes. Il n'en reste pas moins que l'évolution demeure un phénomène progressif et lent, d'où le faible taux d'apparition des génotypes à trois allèles.

L'analyse des relations entre le polymorphisme génétique et la survie des huîtres fait apparaître que certains génotypes seraient mieux adaptés. Il en est de même pour le paramètre croissance face à différents niveaux nutritifs. Cela pourrait être confirmé par l'étude de l'expression de l'enzyme digestive qu'est l'amylase chez ces huîtres d'intérêt aquacole, et vérifier l'activation d'un gène donné en fonction des conditions, trophiques ou autre.

## BIBLIOGRAPHIE

- Cheney DP, MacDonald BF, and Elston RA**, 2000. Summer mortality of pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *Journal of Shellfish Research*, **19** : 353-359.
- Comps M, Bonami J.R., Vago C., and Campillo A.**, 1976. A virus disease of the portugese oyster *Crassostrea angulata*. C.R. Hebd Seances Acad Sci, Ser D, Sci Nat, **282(22)** : 1991-1993.
- Dégremont L.**, 2000. Etude du polymorphisme des gènes de l'amylase chez *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973). Relation avec les paramètres physiologiques de l'assimilation. Mémoire de DEA, Université de Bretagne Occidentale, IUEM, 30p.
- Da Lage J.-L., Carriou M.-L., and David J.R.**, 1989. Geographical polymorphism of amylase in *Drosophila ananassae* and its relatives. *Genet. Res. Camb*, **59** : 85-92.
- Da Lage J.-L., Lemeunier F., Carriou M.-L., and David J.R.**, 1992. Multiple amylase genes in *Drosophila ananassae* and relative species. *Heredity* **63** : 67-72.
- Delpech M.**, 1999. *Annales de Biologie Clinique*. Vol. 57, Numéro 1, Pratique quotidienne : 77-84
- GENEPHYS** ,1997, 1998, 1999, 2000. Genetics bases and variability of physiological traits involved in growth in *Crassostrea gigas*. Commission of the European Communities, contract No. Fair 95-421.
- Glude J.B.**, 1975. A summary report of pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972. In : *Proceedings of the third U.S.- Japan Meeting on Aquaculture*. Tokyo, Japan, October 15-16, 1974 : 1-28.
- Koganezawa A.**, 1974. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. In : *Proceedings of the third U.S.- Japan Meeting on Aquaculture*. Tokyo, Japan, October 15-16, 1974 : 29-34 .
- Mac Callum, L.J.**, 1995. Detection of Amplified Products. In : *PCR. Essential Data Series*, **11** : 99-127. Edited by Newton, C.R. Series Editors : Rickwood D., Hames, Wiley B.D., Chichester.
- Maurer D, and Comps M**, 1986. Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon : facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. In : *Pathology in Marine Aquaculture*, Vivarès, C.P., Bonami, J.R. and Jaspers, E. (Eds). *European Aquaculture Society, Special Publication N°9*, Bredene, Belgium, 29-41.



**UNIVERSITE BORDEAUX I**  
**MAITRISE "BIOLOGIE DES POPULATIONS ET**  
**DES ECOSYSTEMES"**

*Mention "Environnement"*

UFR de Sciences Biologiques - Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex

**FICHE D'EVALUATION DE STAGE**

→ A INCLURE A LA FIN DU MEMOIRE

**L'ETUDIANT :**  
 Nom : RAMBELO - RAMANITRA  
 Prénom : Seheno  
 Option : Ecotoxicologie  
aquatique

**STRUCTURE D'ACCUEIL :**  
 Raison sociale : Etablissement public  
 Adresse : IFREMER La Tremblade  
17390 Ronce-les-Bains  
 Tél. : 05 46 36 98 36  
 Télécopie : 05 46 36 37 51  
 Responsable du stage  
 M., Mme, Mlle : Pierre Boudry

Service dans lequel l'étudiant a effectué son stage :

Du 13 mai au 14 juin 2002  
Laboratoire de Génétique et de Pathologie

TACHES EFFECTUEES :

Extraction d'ADN, PCR-RFLP

| Appréciations sur le stagiaire        | Très bien | Bien | Moyen | Insuffisant | Très insuffisant |
|---------------------------------------|-----------|------|-------|-------------|------------------|
| Assiduité                             |           | X    |       |             |                  |
| Intégration                           |           | X    |       |             |                  |
| Participation                         | X         |      |       |             |                  |
| Initiative                            | X         |      |       |             |                  |
| Capacité à utiliser ses connaissances | X         |      |       |             |                  |
| Capacité au travail                   | X         |      |       |             |                  |
| Autonomie (travail, rédaction)        | X         |      |       |             |                  |

**Appréciations sur le travail fourni au cours du stage :**

Observations : Stagiaire autonome et efficace qui a une très bonne compétence pour les expériences de biologie moléculaire.

Date et signature

10/06/02  
