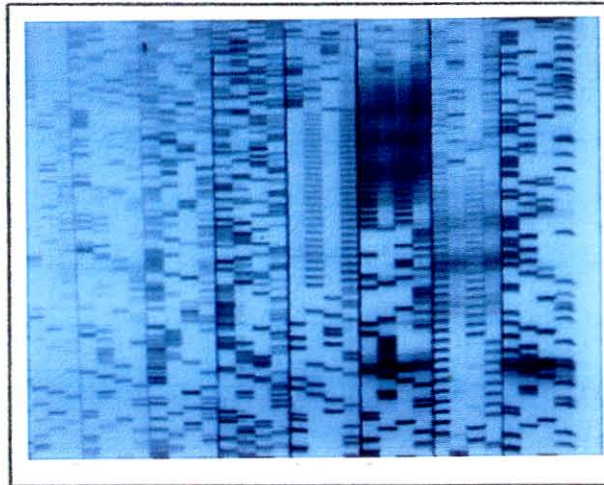


**RECHERCHE DE MARQUEURS GENETIQUES
ET EVALUATION DE LA VARIABILITE GENETIQUE
DANS LE CADRE D'UN PROGRAMME DE SELECTION
DE L'HUITRE PLATE *OSTREA EDULIS* AU PARASITE *BONAMIA OSTREA***

Sophie LAUNEY

UNITE DE RECHERCHE EN GENETIQUE
LABORATOIRE GENETIQUE, AQUACULTURE ET PATHOLOGIE
STATION DE RONCE LES BAINS
BP 133
17390 LA TREMBLADE



Responsables scientifiques: Yamama NACIRI-GRAVEN et André GERARD
Laboratoire GAP-URGE, IFREMER La Tremblade

Directeur de thèse: Pr. Jacques BOUGLER
Département des Sciences Animales
Institut National Agronomique Paris-Grignon

Parrainage: François BONHOMME
Laboratoire Génome et Populations
CNRS Montpellier

RESUME

Responsables scientifiques: Yamama NACIRI et André GERARD
Laboratoire GAP - URGE, IFREMER La Tremblade

Directeur de thèse Pr. Jacques BOUGLER
Dép¹ des Sciences Animales, Institut National Agronomique Paris Grignon

Parrainage: François BONHOMME
Laboratoire Génome et Populations, CNRS Montpellier

Dans le cadre du projet de relance de l'huître plate en France, projet mené par l'IFREMER et soutenu par les régions Bretagne et Poitou-Charentes, un programme de sélection pour la recherche de résistance au *Bonamia ostreae*, protozoaire parasite ayant entraîné une diminution importante des stocks cultivés, a été engagé à partir de 1985. Deux populations ont ainsi été sélectionnées et présentent maintenant des signes de résistance (ou de tolérance) accrue par rapport aux témoins du milieu naturel. Dans le cadre de ce programme, l'identification de marqueurs moléculaires a été initiée à partir d'octobre 1993 (Naciri *et al.*, 1995). Mon sujet de thèse s'inscrit dans cette continuité.

Mon travail s'articule en 2 parties :

① Dans un premier temps, la recherche de marqueurs moléculaires du génome, essentiellement marqueurs microsatellites, basés sur l'utilisation de sondes monolocus pour des séquences correspondant à la répétition en tandem, et en n exemplaires, de deux paires de bases (par exemple (CA)_n/(TG)_n). Ces marqueurs sont potentiellement neutres, répartis dans tout le génome et en général fortement polymorphes.

② Dans un deuxième temps, leur utilisation dans le cadre du programme de sélection:

- *En évaluant le taux de polymorphisme présent dans les populations sélectionnées.*
- *En débutant une cartographie du génome de l'huître plate *Ostrea edulis*.* En raison du nombre très important de marqueurs nécessaires pour un tel travail, l'objectif sera réduit à la mise en évidence de groupes de liaison.
- *En recherchant un éventuel marqueur de la résistance et/ou tolérance à la bonamiose* par l'analyse d'individus de structures familiales appropriées ("F2" issues de croisement entre populations résistantes et populations sensibles).

Au terme d'un an et demi de travail, les résultats portent sur deux points:

- *Production du matériel biologique.* L'essentiel du matériel biologique nécessaire à cette étude, à savoir principalement les nouvelles générations de sélection et leur témoin, ainsi que les familles prévues pour la recherche d'un marqueur de résistance, a été produit à l'écloserie de La Tremblade et est actuellement en élevage dans différentes stations (La Tremblade, Bouin, La Trinité sur Mer). La menace d'*Herpès* virus qui pèse sur ces lots n'est cependant pas écartée.
- *Recherche de marqueurs.* Un séjour de 4 mois au Laboratoire Génome et Populations, dans le cadre de l'URM N° 16, a permis la réalisation d'une nouvelle banque génomique partielle d'*Ostrea edulis*. L'exploitation de cette banque a conduit à l'identification de 33 nouveaux microsatellites, qui s'ajoute aux 12 identifiés par Naciri *et al.* (1995). Les premiers essais d'amplification laisse espérer qu'une vingtaine au moins de marqueurs de ce type pourront être utilisés en routine. Les projets d'évaluation de la variabilité génétique et surtout de cartographie de liaison s'en trouvent consolidés.

Couverture: Autoradiographie d'un gel de séquence d'ADN d'*Ostrea edulis*, mettant en évidence deux motifs microsatellites.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	3
I.1. Problématique du sujet	3
I.2. Rappel du programme de recherche	4
I.3. Objectifs pour 1995-1996	6
I.3.A. Production du matériel biologique	6
I.3.B. Recherche des marqueurs moléculaires	6
II. MATERIEL ET METHODES	7
II.1. Matériel biologique: le programme de sélection d'<i>Ostrea edulis</i> pour la résistance à <i>Bonamia ostreae</i>	7
II.1.A. Production 1995-1996	7
II.2. Marqueurs moléculaires	8
II.2.A. Microsatellites	8
II.2.B. Marqueurs Anonymes Simple Copie (MASC) (Karl & Avise, 1993)	11
II.2.C. Technique d'étude du polymorphisme des marqueurs moléculaires: la PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par Polymérisation).	11
II.3. Analyse de la variabilité génétique dans les populations sélectionnées	12
II.3.A. Evaluation du polymorphisme génétique	13
II.3.B. Etude des performances des lignées sélectionnées	13
II.4. Réalisation d'une carte de liaison	14
II.5. Mise en évidence d'un marqueur de la résistance à <i>Bonamia ostreae</i>	14
II.5.A. Inoculation de la F2 en vue de l'identification d'un marqueur de résistance	15
II.5.B. Tests statistiques	15
III. RESULTATS	17
III.1. Production du matériel biologique	17
III.1.A. Production des nouvelles générations de sélection	17
III.1.B. Production des familles F2	17
III.2. Inoculations des familles produites en 1995	17
III.3. Marqueurs moléculaires	18
III.3.A. Identification et caractéristiques des microsatellites	18
III.3.B. Estimation des densités des microsatellites (AC/GT) _n et (AG/CT) _n	21
III.3.C. Marqueurs anonymes simples copies	23
III.4. Etude des performances des lignées sélectionnées	24
IV. CONCLUSION	25
IV.1. Bilan pour l'année 1995-1996	25
IV.1.A. Points de blocage	25
IV.1.B. Points forts	25
IV.2. Objectifs pour 1996-1997	26
IV.2.A. Variabilité génétique dans les populations sélectionnées	26
IV.2.B. Etude de familles	26
IV.2.C. Cartographie de liaison	27
IV.2.D. Recherche d'un marqueur de résistance	27
IV.2.E. Estimation des performances des populations sélectionnées	27
IV.2.F. Communications	27
V. BIBLIOGRAPHIE	28
VI. CALENDRIER INITIAL	32

I. INTRODUCTION

I.1. PROBLEMATIQUE DU SUJET

L'huître plate (*Ostrea edulis*) est une huître indigène des côtes atlantiques françaises. Jusqu'à 1970, son élevage était florissant, avec des productions de l'ordre de 15000 à 20000 tonnes. Depuis elle a connu deux attaques parasitaires successives. L'apparition de *Martelia refringens* (martéliose) au début des années 70 a réduit l'élevage de l'huître plate aux zones d'eau profonde. Au début des années 80, *Bonamia ostreae* (bonamiose) a également attaqué les élevages en eau profonde, provoquant l'arrêt quasi-totale de la culture (Pichot *et al.*, 1980). En 1992, la production n'était plus que de 1800 tonnes, exclusivement en Bretagne, avec des élevages en densité très faible, parfois en mélange avec des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) et avec des cycles d'élevages raccourcis, pour réduire au maximum la prolifération du parasite. En effet, *Bonamia* semble se développer préférentiellement lors de la deuxième année de reproduction.

Un programme de sélection de l'huître plate visant à produire des huîtres résistantes (ou tout au moins tolérantes) à *Bonamia* a été engagé par l'IFREMER en 1985 (Martin *et al.*, 1993). Deux populations originaires de Quiberon ont été sélectionnées, l'une depuis 1985 (appelée par la suite P85) et l'autre depuis 1989 (appelée par la suite P89). Au début de mon travail, la population sélectionnée depuis 1985 en était à la deuxième génération de sélection (G2), la population de 1989, à la première génération (G1).

En 1993, deux expériences ont été menées parallèlement, correspondant chacune à la production de plusieurs populations :

- * Mixage : croisements P89-G1 x P85-G2, témoins Palavas et témoins Méditerranée. Cette expérience prévoyait également la production de deux autres populations P89-G1 x G0 et P85-G2 x G0, les géniteurs G0 étant de vieilles huîtres de Quiberon récupérées en terrain fortement infesté par la bonamiose et supposée résistantes. Seule la population P89-G1 x G0 a pu être obtenue, à raison de 12 familles différentes, comme pour les croisements P89-G1 x P85-G2 ou les populations de témoin.
- * Rétrocroisement : croisements P85-G2 x Témoin, P85-G2 x P85-G2 (la descendance étant la P85-G3) et Témoin x Témoin. Cette expérience a été faite à petite échelle, ce qui fait que chaque type de croisement n'est représenté que par 5 familles différentes.

Dans l'une ou l'autre des expériences, les témoins sont des individus issus de captage dans le milieu naturel, et donc issus de populations considérées comme sensibles à la bonamiose.

Les premiers résultats (Naciri-Graven *et al.*, soumis) montrent une amélioration sensible des performances de résistance pour les premières générations de sélection. Par contre, une baisse des performances de résistance dans la deuxième génération de sélection a été relevée, et cela pour les deux populations, la survie n'étant pas significativement différente du témoin. Néanmoins, cela n'est vrai que pour les animaux issus de parents inoculés, alors que les animaux issus de parents sélectionnés après croissance dans le milieu naturel ont une survie légèrement meilleure que les témoins. Cette relative baisse de performances pourrait être liée à une dépression de consanguinité, due au fait que les programmes ont probablement démarré avec un faible nombre de parents effectifs. La troisième génération de sélection de la population 85 (P85-G3) est par contre très supérieure à celle du témoin; cette reprise de performances pourrait être liée à une évacuation du fardeau génétique en deuxième

génération. Le croisement entre les deux lignées (P85-G2 x P89-G1), réalisé pour la première fois et à petite échelle en 1993 n'a pas permis à ce jour de mettre en évidence un effet d'hétérosis pour la résistance.

Un rétrocroisement a également été effectué entre la P85-G2 et un témoin; ses performances intermédiaires entre les deux populations parentales, ainsi que la rapidité de la réponse à la sélection en première génération, soutiennent l'hypothèse d'une additivité pour le caractère de résistance. Pour l'instant, et étant donné que le début du programme a été effectué sans contrôle des croisements, on ne sait rien sur la consanguinité des deux populations sélectionnées. Par ailleurs, et bien que l'on continue à employer le terme de "résistance", il apparaît maintenant possible qu'il s'agisse d'une tolérance, qui permettrait à l'individu de supporter plus longtemps l'attaque du parasite ou d'être infesté plus tard (Cochennec *et al.*, 1995).

Notons qu'aucune résistance ne semble être apparue dans le milieu naturel. Trois hypothèses peuvent expliquer cela. Premièrement, le fait que la bonamiose n'est apparue que depuis une dizaine d'année, délai peut-être trop court pour permettre l'apparition d'une résistance naturelle. Deuxièmement, les huîtres sont commercialisées lorsqu'elles atteignent une taille suffisante, et on peut faire l'hypothèse que les huîtres résistantes ont de meilleures potentialités de croissance, du fait d'une faible pression parasitaire; elles atteindraient cette taille marchande à un âge plus précoce, et auraient donc moins le temps de répandre les gènes responsables de la résistance. Troisièmement, la lenteur de la cinétique d'infestation de *Bonamia ostreae* permet aussi bien aux huîtres sensibles que résistantes de participer au recrutement, puisque l'incidence du parasite est élevée surtout à partir de la deuxième année, laissant le temps à tous les individus de se reproduire.

I.2. RAPPEL DU PROGRAMME DE RECHERCHE

Le programme de travail proposé s'attache principalement à obtenir de nouveaux marqueurs génétiques (microsatellites, MASC (Marqueurs Anonymes Simple Copie : Karl & Avise, 1992)...) avec comme application principale, la construction d'une carte de liaison puis son utilisation dans le cadre du programme sur la recherche d'une résistance de l'huître plate *Ostrea edulis* à son parasite *Bonamia ostreae*.

● Recherche de marqueurs moléculaires.

Les régions répétées de l'ADN, et en particulier les locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) connaissent depuis peu un intérêt considérable de la part des généticiens en raison du polymorphisme important qu'elles révèlent à l'intérieur des populations (Jeffreys *et al.*, 1988). Des techniques telles que les empreintes génétiques ou les RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, voir Williams *et al.*, 1993) ont pour principe l'utilisation de sondes multilocus dans l'analyse du polymorphisme des VNTR. La technique des microsatellites est par contre basée sur l'utilisation de sondes monolocus pour des séquences correspondant à la répétition en tandem, et en n exemplaires de deux paires de bases (par exemple $(CA)_n/(TG)_n$). L'importance de la variation ainsi mise en évidence et sa probable neutralité sélective, font de l'étude du polymorphisme microsatellitaire une technique très efficace dans les différents domaines que sont la recherche de parenté, l'étude des flux de gènes entre et à l'intérieur des populations, l'évaluation de l'importance de la diversité génétique et son maintien, enfin la cartographie génétique. Cette dernière application découle du nombre élevé et de la dispersion des VNTR dans l'ensemble du génome, et a été principalement développée chez les mammifères : c'est en particulier le cas de la souris pour laquelle plus de 2000 locus ont d'ores

et déjà été recensés (Love *et al.* (1990), Cornall *et al.* (1991), Hearne *et al.* (1991), Montagutelli *et al.* (1991), Dallas (1992)).

Dans le cas de l'huître, la cartographie fine du génome ne pourra sans doute pas se contenter de l'utilisation des microsatellites, dans la mesure où leur identification est relativement longue, ce qui est peu compatible avec la durée et les impératifs d'une thèse. Il faudra donc envisager l'utilisation d'autres méthodes, plus rapides à mettre en oeuvre, en particulier celle consistant à mettre en évidence un polymorphisme de l'ADN Nucléaire simple copie (MASC ou Marqueurs Anonymes Simple Copie : Karl & Avise, 1992, 1993). Cette technique consiste à obtenir une banque d'ADN contenant des fragments allant de 500 à 5000 paires de bases. Un dot blot est ensuite effectué utilisant différentes sondes marquées et les faibles spots sont sélectionnés dans la mesure où ils sont susceptibles de correspondre à des simples copies. Un séquençage permet de définir des amorces et l'étude du polymorphisme se fait par PCR suivie d'une digestion par enzymes de restriction des amplifiats. Pour chaque couple d'amorces, une enzyme de restriction peut donner différents pattern de bandes correspondant à un marqueur monocus. S. Karl (Karl & Avise, 1993) a ainsi montré sur l'huître creuse *Crassostrea virginica* que pour une quarantaine d'enzymes, la moitié révèle un polymorphisme correspondant à un nombre de sites de restriction variant en moyenne de 1 à 3. De même que pour les microsatellites, cette technique présente l'avantage d'être non destructive (car utilisant la PCR).

Que ce soit pour les microsatellites ou pour les MASC, l'avancée des travaux d'autres équipes pourra sans doute permettre d'augmenter le nombre de marqueurs disponibles dans la mesure où il s'avérera possible d'utiliser des amorces définies sur d'autres espèces. Pour l'identification de microsatellites, c'est en particulier le cas des travaux du Dr E. Zouros (Marine Laboratory of Crete) et des Drs D. Hedgecock et D. Mac Goldrick (Bodega Marine Laboratory) sur *Crassostrea gigas*, de ceux de M.U. Patwary sur *Placopecten*. Pour les MASC, les amorces déjà définies chez *Crassostrea virginica* (Karl et Avise, 1993) peuvent également être testées sur *Ostrea edulis*.

② Utilisation dans le cadre du programme de résistance

A l'heure actuelle, plusieurs problèmes se posent dans le cadre du programme de résistance décrit plus haut:

- Entre 85 et 92, toutes les générations obtenues l'ont été sans contrôle des croisements (Martin *et al.*, 1993). Les larves récupérées provenaient d'un pool d'animaux et le nombre de parents effectifs pour chaque génération n'est pas connu.
- Depuis 88, une technique d'inoculation du parasite a été mise au point qui permet de soumettre les individus à une pression de sélection connue et contrôlée (Mialhe *et al.*, 1988 ; Hervio, 1992). Cela a permis de réduire le cycle de sélection de cinq ans à deux ans, mais les expériences restent lourde et longues; d'autant plus qu'il est nécessaire d'élever séparément les familles.

L'identification de marqueurs (microsatellites ou MASC) pourrait apporter des solutions à ces deux problèmes :

- En évaluant le taux de polymorphisme présent dans les populations sélectionnées. Cet aspect pourra se compléter d'un suivi de parenté précis entre les différentes générations obtenues et sera traité en utilisant exclusivement des marqueurs monocus.
- En débutant une cartographie du génome de l'huître plate *Ostrea edulis* et en utilisant tous les moyens de marquage à disposition. En raison du nombre très important de

marqueurs nécessaires pour un tel travail, l'objectif sera réduit à la mise en évidence de groupes de liaison.

- En recherchant un éventuel marqueur de la résistance et/ou tolérance à la bonamiose par l'analyse d'individus de structures familiales appropriées ("F2" issues de croisement entre populations résistantes et populations sensibles). La mise en évidence d'un tel marqueur permettrait de sélectionner précocement les individus résistants et donc de réduire la durée des cycles de sélection.
- En utilisant ces marqueurs très polymorphes dans le cadre d'une recherche de parenté, ce qui pourrait permettre le mélange précoce des différentes familles et leur reconnaissance ultérieure.

I.3. OBJECTIFS POUR 1995-1996

Les principaux objectifs, pour 1996, au vu du calendrier prévisionnel, portaient principalement sur deux points:

- * la création du matériel biologique nécessaire à mon étude
- * La poursuite de la recherche de marqueurs moléculaires

I.3.A. Production du matériel biologique

I.3.A.1. Nouvelles générations du programme de sélection

Il était prévu de produire, avant l'été 1995, d'une part 30 familles biparentales pour chacune des nouvelles générations de sélection, à savoir P89-G2 et P85-G3, d'autre part 20 familles biparentales issues d'un croisement entre les deux lignées (soit P85-G2 x P89-G1), et enfin 20 familles biparentales témoin (produites à partir d'individus issus du milieu naturel, Baie de Quiberon). Il était prévu une inoculation de ces familles au printemps 1996, pour évaluer les performances de résistance.

I.3.A.2. Familles nécessaires à la cartographie et à la recherche d'un marqueur de résistance.

A partir des familles F1 (P85-G2 x Témoin) produites en 1993, un certain nombre de familles F2 (5 au maximum) devaient être obtenues avant l'été 1995. Devant le risque de ne pas obtenir suffisamment de familles, de nouveaux croisements F1 (lignée sélectionnée x Témoin) ont été lancés, ces F1 devant alors être recroisées en 1996 pour obtenir de nouvelles familles F2 avant l'été 1996.

Les familles F2 produites en 1995 devaient être inoculées dans l'hiver 1995-1996, ou au printemps 1996 au plus tard; elles serviront pour la recherche d'un éventuel marqueur de résistance.

I.3.B. Recherche des marqueurs moléculaires

Le principal objectif pour 1995-1996 était la construction et l'exploitation d'une banque génomique partielle d'*Ostrea edulis*, dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs microsatellites. Un séjour de quatre mois au Laboratoire Génome et Populations, dans le cadre de l'URM n°16, a été consacré à ce travail. La mise au point de ces marqueurs devait être poursuivie à La Tremblade, avec comme première application l'analyse de la variabilité génétique dans les populations sélectionnées.

Au cours de l'année écoulée, il était également prévu de tester certains couples d'amorces des MASC, publiés par Karl & Avise (1993).

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE: LE PROGRAMME DE SELECTION D'*OSTREA EDULIS* POUR LA RESISTANCE A *BONAMIA OSTREAE*

L'huître plate est une huître larvipare. Le mâle libère le sperme dans le milieu, la femelle filtre les gamètes et incube les ovules fécondés pendant 8 à 10 jours dans la cavité palléale. Il est donc difficile de réaliser des fécondations *in vitro*. De 1985 à 1992, le renouvellement de génération s'est fait sans contrôle des croisements (pontes en masse de géniteurs sélectionnés). Depuis 1993, tous les croisements effectués sont de type plein-frères uniquement. En effet, du fait des difficultés zootechniques rencontrées dans l'obtention de maturations synchrones et dans l'induction de la ponte, les familles de demi-frères sont pour l'instant hors de portée. Tous les croisements sont donc obtenus en faisant murer les huîtres deux par deux dans des aquariums et en récupérant les larves après la ponte. L'élevage larvaire et le prégrossissement sont réalisés à l'écloserie de l'URGE, et les animaux sont ensuite envoyés pour grossissement en conditions contrôlées à la station IFREMER de Bouin, puis à la Station IFREMER de La Trinité sur Mer où elles sont immergées dans la Baie de Quiberon.

II.1.A. Production 1995-1996

II.1.A.1. Nouvelles générations de sélection (Production 1995)

Les animaux, placés deux par deux dans des aquariums, ont été soumis à une maturation forcée, à une température de 18 à 20 degrés. Un essai de photopériode progressive a été tenté en diminuant la durée de la nuit de 14 à 9 heures (avec diminution d'un quart d'heure tous les deux jours). La maturation a été avancée dans la saison pour tenter de s'affranchir des problèmes d'infestation virale (*Herpès virus*) dont l'écloserie a été victime en 1994.

En 1995, plusieurs populations ont été produites:

① Les nouvelles générations de chacune des populations 85 et 89 (à raison d'un nombre théorique de trente familles de plein-frères chaque) :

* 3ème génération (G3) pour la population 85,

* 2ème génération (G2) pour la population 89.

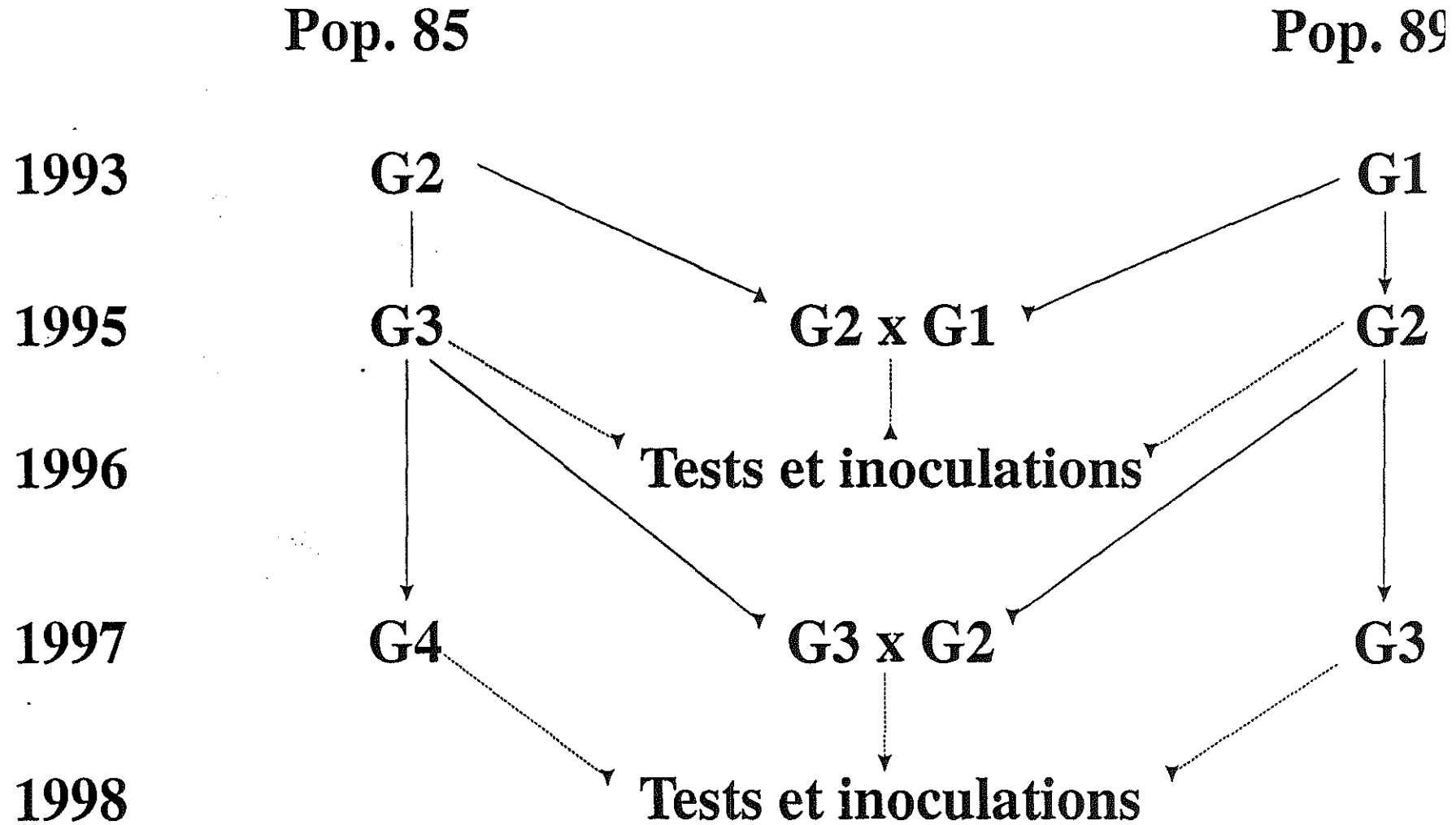
② Les animaux ayant pondus ont ensuite été recroisés pour produire une génération interpopulation (G1 x G2). Vingt familles de ce type devaient être produites. Ces populations permettront d'estimer un éventuel effet d'hétérosis par comparaison avec les générations intrapopulations de même âge (G3 pour la population 85 et G2 pour la population 89).

③ Vingt familles de plein frères de témoins devaient également être produites, à partir d'individus issus de captage dans le milieu naturel (Station IFREMER de La Trinité sur Mer). Le lot témoin était constitué à 27% d'individus captés en 1990 et 1991 (54 et 42 mois), 26% d'individus captés en 1992 (30 mois) et 47% d'individus captés en 1993 (18 mois), et représente la population naturelle de la Baie de Quiberon.

Après inoculation en 1996, en collaboration avec l'URPIG (Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale), un nouveau cycle de sélection sera mené en 1997, en utilisant les individus survivants, et avec les mêmes types de croisement qu'en 1995, mais pour les générations suivantes : P85-G4 et P89-G3, intercroisement P89-G2 x P85-G3 et croisement témoin. Le plan de sélection correspondant est présenté sur la Figure 1.

FIGURE 1

Programme de sélection résistance



II.1.A.2. Production des populations en vue de l'identification d'un marqueur de résistance

Les croisements nécessaires à la mise en évidence d'éventuels marqueurs de la résistance ont été mis en place, en vue respectivement de :

- * produire des populations "F2" par croisements des individus "F1" produits en 1993.
- * produire des nouvelles générations "F1", en croisant des individus issus des populations sélectionnées avec des individus témoins issus du milieu naturels.

II.1.A.2.a. Production des populations F2

Pour obtenir des populations en ségrégation pour la caractère de résistance, il faut croiser des individus sensibles et des individus résistants, et recroiser ensuite entre eux des pleins-frères de cette F1, afin d'obtenir une F2 où le ou les gènes de résistance seraient en ségrégation, et où le contexte génétique serait le plus homogène possible. La population P85-G2 x Témoin a été produite en 1993 et correspond justement à une "F1" entre individus sensibles et résistants. Cette population correspond au mélange de 4 familles de plein-frères indépendantes qui ont été regroupées pour des raisons d'élevage. La première étape a donc été de biopser les individus pour tenter, par l'analyse de leur polymorphisme microsatellitaire, de retrouver les familles initiales et d'assortir les géniteurs en conséquence (ce travail a été effectué par Yves Vigouroux au Laboratoire Génome et Population à Sète). Les résultats ont permis d'identifier 5 couples de plein-frères présumés qui ont été placés en maturation fin mars. Fin avril 1995, une famille "F2" a été obtenue, qui a été inoculée en mars 1996.

II.1.A.2.b. Production des nouvelles populations F1

Dès début janvier, 10 croisements ont été mis en maturation:

- * 5 croisements P89-G1 x Témoin
- * 5 croisements P85-G2 x Témoin

A l'arrêt des maturations fin mai, 4 familles avaient été produites (respectivement 2 des deux différents types).

Une seule famille F2 ayant été obtenues en 1995, des croisements biparentaux ont été mis en place au printemps 1996 à partir des F1 produites en 1995, afin d'obtenir de nouvelles familles F2, qui seront inocuées en 1997. (voir Figure 2)

II.2. MARQUEURS MOLECULAIRES

L'effort sera particulièrement axé sur deux types de marqueurs:

- * marqueurs microsatellites,
- * marqueurs anonymes simple copie (Karl & Avise, 1993).

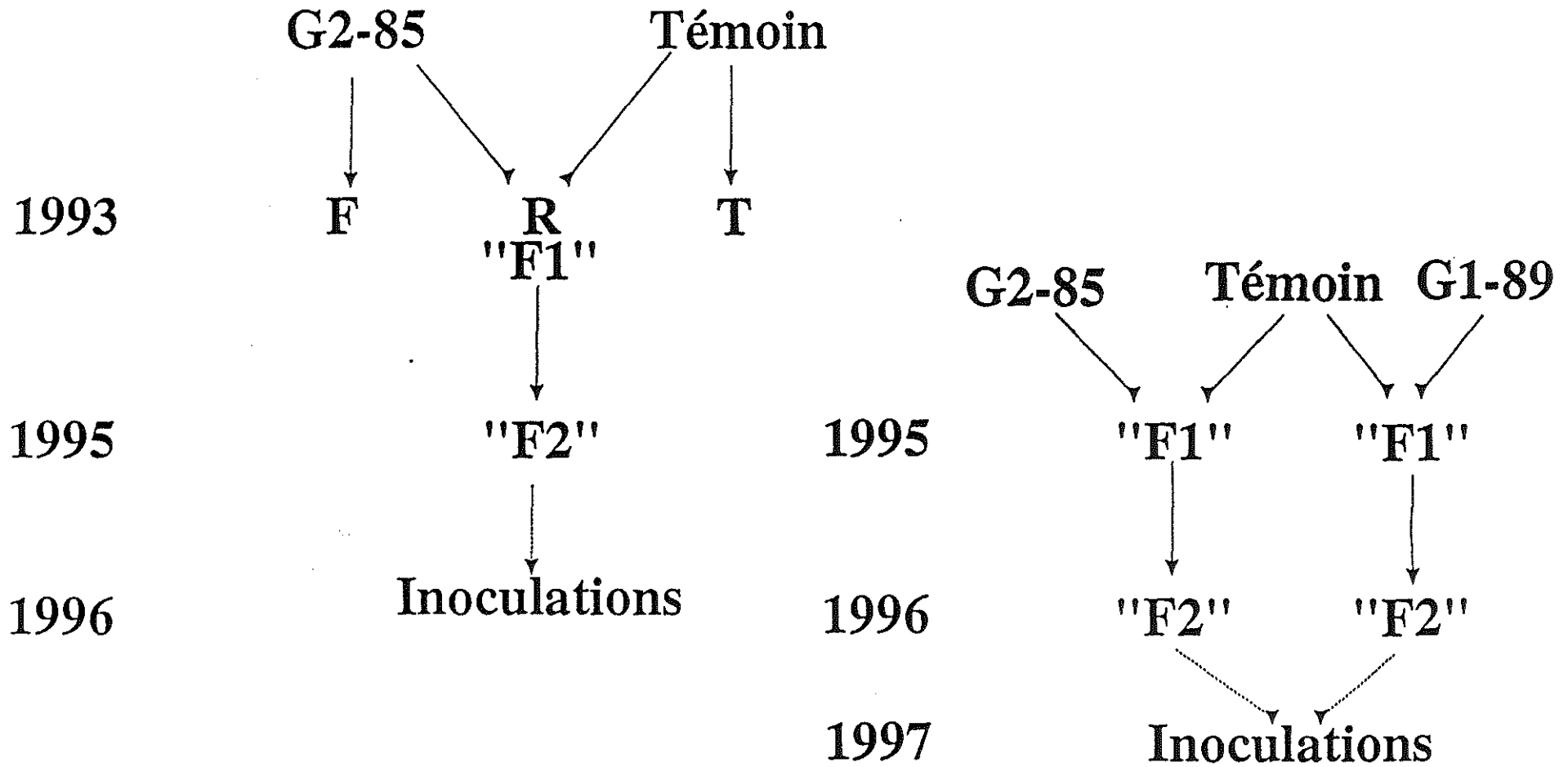
II.2.A. Microsatellites

II.2.A.1. Description

Parmi les marqueurs disponibles, les microsatellites sont ceux qui ont pris récemment le plus d'essor. Ils s'agit de séquences répétées de motifs de 1 à 5 pb, pour une longueur totale souvent inférieure à 200 pb (Rassman *et al.*, 1991). Ils semblent distribués aléatoirement tout le long du génome (Hearne *et al.*, 1992). La spécificité d'un locus microsatellite est déterminée par la séquence des régions flanquantes, très peu variables, et son polymorphisme résulte alors de la variation du nombre de motifs répétés (voir Figure 3). Ces séquences montrent un grand polymorphisme dans les espèces étudiées jusqu'à présent, chez des organismes aussi distants que la drosophile (Tautz, 1989) et l'homme (Weber & May, 1989). Les cartes génétiques humaine (Hazan *et al.*, 1992; Weissenbach *et al.*, 1992; Todd, 1992), bovine (Fries *et al.*,

FIGURE 2

Recherche d'un marqueur de résistance et cartographie de liaison



1990) et porcine (Gellin & Chevalet, 1994) ont été construites en grande partie grâce à ces marqueurs. D'après les premières données obtenues par Y. Naciri (IFREMER-URGE), le pourcentage de VNTR se situerait entre celui des algues (R. Wattier, comm. pers.) et celui des poissons (F. Bonhomme, comm. pers.).

Par rapport à d'autres techniques couramment utilisées, l'identification des marqueurs microsatellites présente des avantages certains :

- elle permet d'analyser la variabilité locus par locus par simple visualisation sur gel des produits d'amplification et sans étapes intermédiaires de digestion par des enzymes de restriction. Une fois mise au point (identification des locus et sélection des amorces), cette technique est facile à mettre en oeuvre en routine.
- le recours à l'amplification *in vitro* dite PCR permet de travailler sur de petits échantillons, ce qui fait des microsatellites une technique d'analyse non destructive pour des animaux tels que les huîtres (Horn *et al.*, 1989 ; Litt & Luty, 1989). Ce même recours à la PCR permet également de travailler sur des animaux très petits, par exemple sur les stades larvaires de nombreux organismes.
- le nombre élevé de microsatellites détectés dans les organismes jusque-là analysés et leur distribution à l'ensemble du génome ainsi que le degré de polymorphisme attendu permet une caractérisation très fine des individus : l'application est évidente dans les recherches de filiation. Le nombre élevé de microsatellites potentiellement identifiables permet également d'obtenir des cartographies très précises des génomes étudiés, et d'espérer ainsi pouvoir trouver de fortes corrélations entre marqueurs microsatellites et caractères simples (résistance dans le cas qui nous concerne) ou complexes (recherche de QTL : Groupe MMM, 1994). Ceci représente un net progrès par rapport à d'autres techniques de caractérisation (électrophorèse de protéines par exemple) qui ne rendent compte que d'une très faible fraction du génome et du polymorphisme existant et sont donc inopérantes dans le cas de la recherche de marqueurs spécifiques de certaines fonctions ou caractères.

II.2.A.2. Identification de marqueurs microsatellites

Une première banque génomique a été réalisée en 1993-1994 par Yamama Naciri, conduisant à l'identification de 12 locus microsatellites (Naciri *et al.*, 1995). Trois de ces locus ont pu être utilisés en routine. Afin d'augmenter le nombre de marqueurs potentiellement utilisables, une deuxième banque a été construite et criblée, lors d'un séjour de quatre mois (septembre-décembre 1995) au laboratoire CNRS Génome et Populations, dirigé par François Bonhomme, dans le cadre de l'URM n°16 (GENEMAR). Ce travail a été réalisé avec l'aide de Claude Delsert, chercheur rattaché à l'URGE (Unité de Recherche en Génétique).

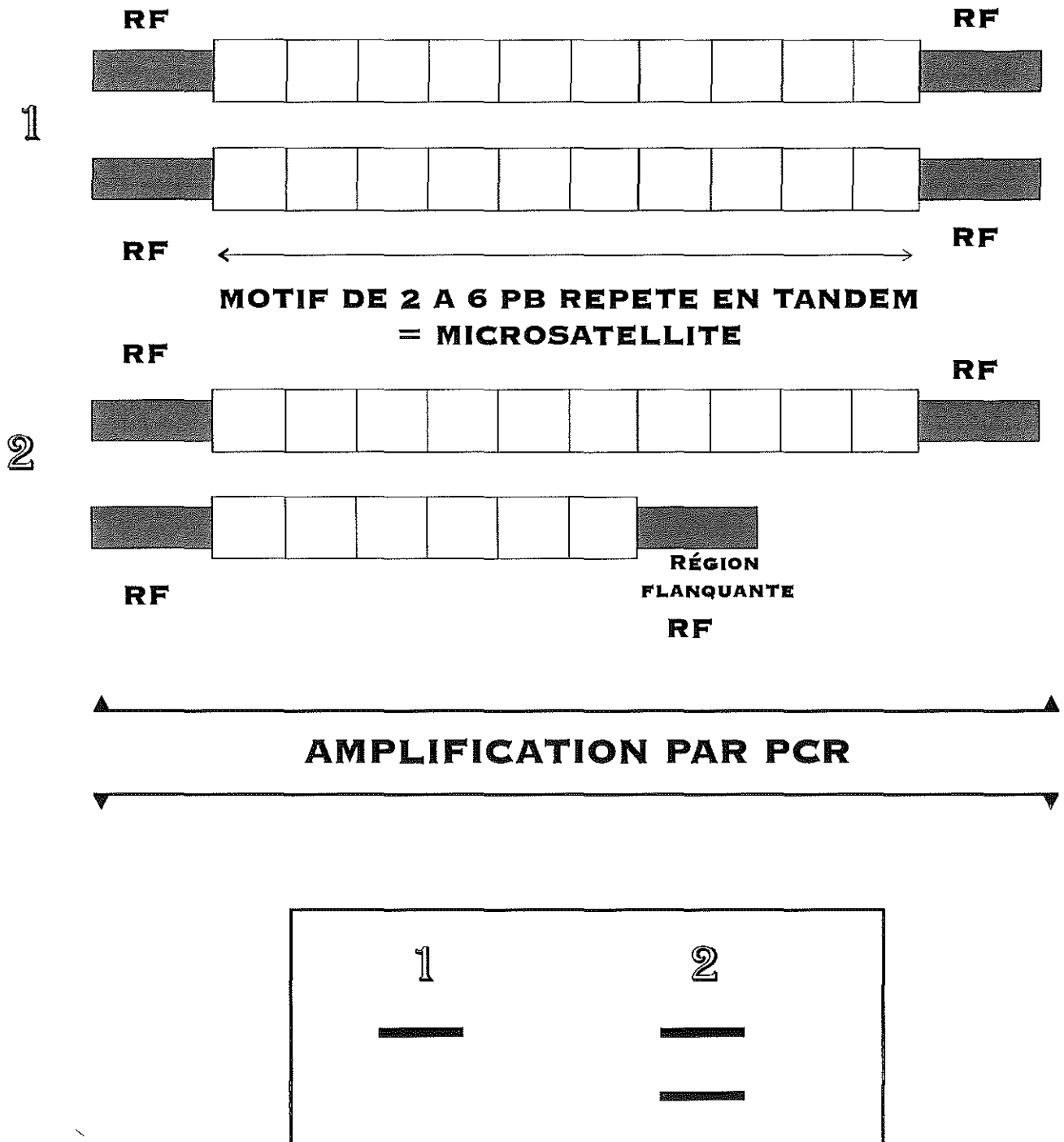
II.2.A.2.a. Matériel biologique

L'ADN a été extrait à partir d'un unique individu. Après élimination de la glande digestive, les tissus (branchies + manteau + muscle) ont été broyés dans l'azote liquide puis récupérés dans 50 ml de tampon d'extraction (Tris 50 mM, EDTA 125 mM, SDS 0.1%). Après ajout de 1 ml de NaCl 5M et 0.5 ml de protéinase K (10 mg/ml), le mélange a été mis en incubation toute une nuit à 55°C.

Après une rapide centrifugation destinée à éliminer les plus grosses particules, un demi-volume de phénol a été ajouté. Après quelques minutes d'agitation douce, un demi-volume de chloroforme a été ajouté. Après une centrifugation à 2000 tr/min pendant 15 minutes, le surnageant a été prélevé et l'ADN a été précipité à l'isopropanol (isovolume) pendant 2 heures à -20°C. Une centrifugation "moyenne vitesse" (9000 tr/min) pendant 30 minutes a permis d'obtenir un culot d'ADN, lequel, après lavage à l'éthanol 70 et séchage, a été repris dans de l'eau distillé et dosé au spectrophotomètre.

Figure 3

Description schématique
d'une séquence microsatellite



II.2.A.2.b. Clonage

Deux techniques de clonages ont été utilisées.

II.2.A.2.b.1. Clonage I.

Il s'agit d'un clonage en blunt, reproduisant la technique utilisée par Y. Naciri lors de la réalisation de la première banque.

Après digestion de l'ADN par *AluI*, *RsaI* et *HaeIII* (10 U de chaque pour 25 µg d'ADN), et migration sur gel d'agarose à 2%, les fragments de 400 à 800 pb ont été récupéré par électroélution, utilisant du papier chromatographique DE81 (Whatman). Après élution, les fragments ont été traités au phénol-chloroforme et précipité à l'isopropanol. La taille des fragments récupérés a été contrôlée sur minigel d'agarose.

Le plasmide utilisé pour la ligation est le pBluescript II KS- (Stratagene), digéré par *SmaI* et, pour empêcher la recircularisation, déphosphorilé à la CIP (Calf Alkaline Phosphatase) selon le protocole d'Eurogentec. La ligation a été effectuée à 4°C pendant toute une nuit, en utilisant 100 ng de plasmide et des quantités d'ADN variant entre 100 et 300 ng, avec 1 µl de T4 DNA Ligase Haute concentration (600 U/µl, Eurogentec.).

II.2.A.2.b.2. Clonage II (clonage en bouts collants)

L'ADN a été digéré par *BspI43I* (Eurogentec, isoschizomère de *Sau3A*) (250 U pour 25 µg d'ADN), et les fragments d'une taille comprise entre 400 et 800 pb ont été récupérés de la même façon que précédemment. Ces fragments ont été ensuite traité à la Klenow en partial filling, avec seulement deux nucléotides (dATP et dGTP).

Le plasmide utilisé est le pBluescript II KS+ (Stratagene), digéré par *XhoI*, et traité également à la Klenow en partial filling, avec les seuls nucléotides dCTP et dTTP (voir Figure 4).

L'intérêt de ce protocole est triple:

- les extrémités du plasmide et des fragments d'ADN sont complémentaires.
- le plasmide ne peut plus se refermer sur lui-même (d'où un plus fort pourcentage de clones recombinants)
- les fragments d'ADN ne sont pas complémentaires entre eux (pas de risques d'apparition de chimère, c'est à dire de fragments composés de deux fragments qui n'étaient pas voisins dans le génome).

La ligation a été effectuée à 4°C pendant toute une nuit, en utilisant 50 ng de plasmide et des quantités d'ADN variant entre 100 et 400 ng, avec 1 µl de T4 DNA Ligase Haute concentration (600 U/µl, Eurogentec).

II.2.A.2.c. Transformation

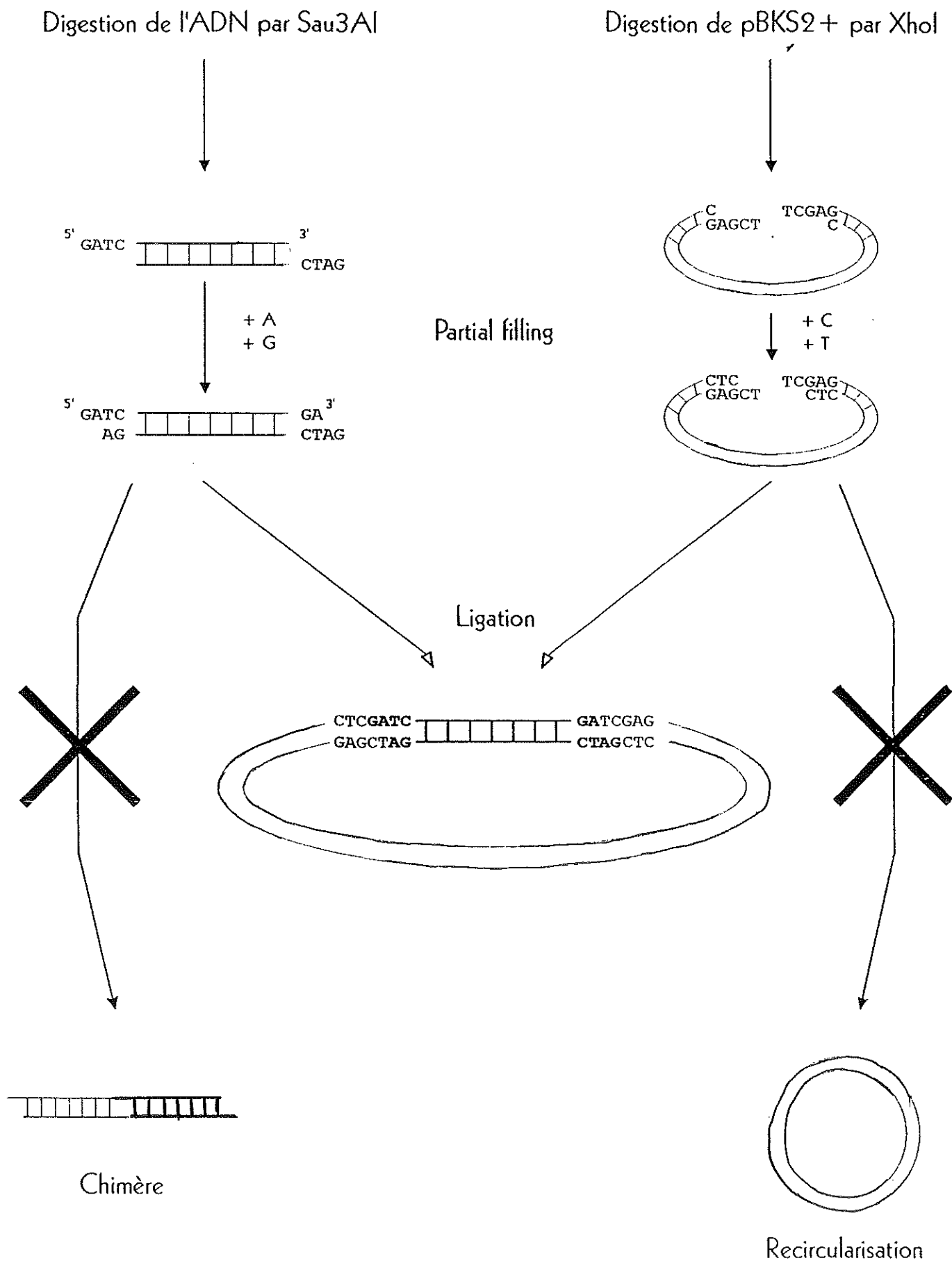
Des cellules de *E. Coli* (DH5α souche K12) ont été rendues compétentes par lavage au CaCl₂ 0,1M à froid, et transformées avec les plasmides potentiellement recombinants, sur milieu 2XYT, contenant de l'IPTG et du Xgal. Les colonies contenant un insert sont repérables à leur coloration blanche, due à la rupture d'un gène participant à l'activité de la β-galactosidase. L'IPTG est l'inducteur du promoteur de cette enzyme, et le Xgal est son substrat; il se colore en bleu quand l'activité enzymatique est préservée.

II.2.A.2.d. Criblage de la banque

Les clones recombinants ont été repiqués individuellement puis transférés sur une membrane de nylon (Biodyne A). La librairie ainsi constituée a été criblée avec un mélange équimolaire de trois sondes dinucléotidiques : (dAdC)_n/(dTdG)_n, (dAdG)_n/(dTdC)_n, (dAdT)_n/(dTdA)_n (Pharmacia). Ces sondes ont été marquées au α³³P-dATP par random priming (Kit Gibco BRL). L'hybridation a été effectuée en milieu 5X SSC, 0.1% SDS, 5% Denhardt, à 65°C.

FIGURE 4

Schématisation de la technique de clonage en bouts collants (clonage II)



Des essais de criblage ont été effectués avec des sondes trinuécléotidiques ((TGT)₈, (TCT)₈, (TAT)₈, (TAG)₈) et tétranuécléotidiques ((TACT)₇, (TTAT)₇ et (ACTC)₇). Ces sondes oligonucléotidiques ont été marquées par kination en 5' avec du $\gamma^{33}\text{P}$ ATP. L'hybridation a été effectuée en milieu 5X SSC, 0.1% SDS, 5% Denhardt, à 42°C.

Les clones positifs après criblage ont été repiqués, puis mis en culture en milieu liquide, et l'ADN en a été extrait par minipréparation (lyse alcaline).

II.2.A.2.e.Séquençage

La séquence des clones positifs a été déterminée par la technique du séquençage alcalin double brin (Sanger *et al.*, 1977, Sambrook *et al.*, 1989), à l'aide du Kit de séquençage T7 (Pharmacia), en utilisant le primer universel T7 et le primer M13 reverse. Chaque fois que cela a été possible, des amorces ont été déterminées autour de la séquence microsatellite, à l'aide du logiciel Primer. En raison d'une taille un peu élevée des inserts, il a parfois été nécessaire de déterminer une amorce interne en amont du microsatellite et de refaire une réaction de séquence.

II.2.A.2.f.Premières amplifications

Les premières amplifications ont été tentées avec tous les couples d'amorces sur l'ADN de trois individus (ADN extrait à partir d'une biopsie de branchie). Les PCR (voir ce chapitre) ont été réalisées dans un volume de 25 μL dans des conditions standards (1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM de chaque dNTP, 20 pmol de chaque amorce, 0.2 U GoldStar Polymérase (Eurogentec)), à des températures d'annealing de 45°C ou 50°C selon les locus. Le contrôle de l'amplification se fait après migration sur minigel d'agarose 2%, par coloration au BET (Bromure d'Ethidium)

II.2.B.Marqueurs Anonymes Simple Copie (MASC) (Karl & Avise, 1993)

II.2.B.1.Description

Ces marqueurs correspondent à des locus anonymes simple copie. Le polymorphisme résulte des variations dans le profil de restriction obtenu par différents enzymes. Cette technique rappelle la technique de RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisme) mais avec une mise en oeuvre beaucoup plus légère, une fois les marqueurs polymorphes identifiés (visualisation des résultats après simple migration sur gel d'agarose des fragments amplifiés par PCR puis digérés, voir Figure 5).

II.2.B.2.Méthodes

Les amorces pour 14 marqueurs de ce type ont été publiées sur *Crassostrea virginica* (huître américaine) (Karl & Avise, 1993). Six de ces amorces ont conduit chez cette espèce à l'amplification de fragments montrant un polymorphisme de restriction avec une à quatre enzymes.

Dans un premier temps, ces amorces ont été testées sur *Ostrea edulis*, dans l'espoir d'obtenir une amplification et des marqueurs polymorphes. En l'absence de données précises sur la proximité phylogénétique des deux espèces, cette approche est bien sûr aléatoire.

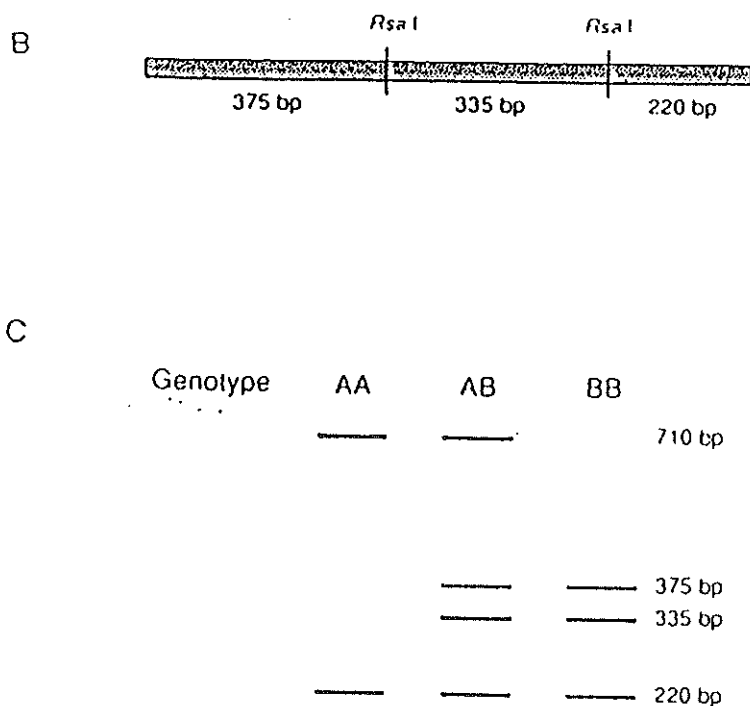
II.2.C.Technique d'étude du polymorphisme des marqueurs moléculaires: la PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par Polymérisation).

L'analyse du polymorphisme microsatellitaire de l'ADN se fait par la méthode de la PCR. La PCR est une technique originale permettant d'amplifier sélectivement une séquence d'ADN, pourvu que l'on connaisse la séquence des régions flanquant immédiatement cette séquence

FIGURE 5

Polymorphisme des marqueurs anonymes simple copie

D'après Karl & Avise, 1991



Exemple de profil de restriction à partir de locus simple copie chez la tortue verte. Les locus sont amplifiés par PCR et digérés (ici par *Rsa I*) et les fragments migrent par électrophorèse sur un gel.

B: présentation de deux sites de reconnaissance de l'enzyme, l'un variable (à gauche) et l'autre non variable (à droite).

C: profil de restriction prévu pour les individus homozygotes pour l'absence du site variable (AA), hétérozygotes (AB) et homozygotes pour la présence du site variable (BB).

sur le chromosome. Ces régions flanquantes servent d'*amorces*. Cette amplification se réalise en une série de cycle comportant chacun trois étapes (voir Figures 6 et 7) :

- * la *dénaturation* : l'ADN double brin se sépare en deux monobrins.
- * l'*annealing* (ou appariement des amorces) : les amorces s'hybrident sur la séquence de l'ADN qui leur correspond. Lorsque l'ADN est séparé en deux brins, une amorce se place sur un brin d'ADN, d'un côté de la séquence à amplifier, et l'autre se place sur l'autre brin, de l'autre côté de la séquence.
- * l'*élongation* : une enzyme polymérase allonge la chaîne de nucléotides à partir de chaque amorce. A la fin de ce cycle, on obtient donc deux doubles brins d'ADN contenant la séquence microsatellite. Un nouveau cycle (dénaturation-annealing-élongation) peut alors commencer.

Chaque cycle permettant de doubler le nombre de copies de la séquence que l'on cherche à amplifier, au bout de n cycles se trouvent dans le mélange réactionnel 2^n exemplaires de cette séquence. Chaque étape de cycle se fait à une température particulière : la dénaturation s'effectue à 94°C, l'élongation à 72°C (température optimale de travail de l'enzyme polymérase). La température d'annealing dépend du microsatellite étudié et est déterminée par la séquence des amorces :

$$T^{\circ}\text{annealing} = 4(nG + nC) + 2(nA + nT)$$

Les deux amorces doivent avoir des températures d'annealing identiques. Chaque étape dure une quarantaine de secondes. En général, on effectue une trentaine de répétitions du cycle d'amplification. Cet ensemble est précédé d'une première dénaturation (94°C) pendant 5 minutes, et suivi d'une dernière amplification plus longue (72°C pendant 10 minutes).

L'amplification par PCR peut être de deux types: PCR dite "froide" (non radioactive) et PCR dite "chaude" (radioactive). L'utilisation de l'une ou l'autre des méthodes dépend de problèmes liés à la visualisation des produits amplifiés. De la réalisation d'une PCR froide ou chaude dépendent la nature et la quantité des ingrédients du mélange réactionnel. Pour l'une ou l'autre des PCR, il faut impérativement que ce mélange contienne:

- * un aliquote de l'ADN à amplifier;
- * des nucléotides (A,T,G,C) en quantité équivalente;
- * les deux amorces
- * une unité d'enzyme polymérase ;
- * du tampon réactionnel pour l'enzyme;
- * du $MgCl_2$, cofacteur de la réaction enzymatique.

Une petite quantité de BSA (Bovine Serum Albumine) qui a la propriété de "nettoyer" l'ADN. (Estoup, comm. pers.) peut être ajoutée au mélange réactionnel.

La visualisation des produits de PCR se fait après migration par électrophorèse sur un gel d'agarose ou de polyacrylamide.

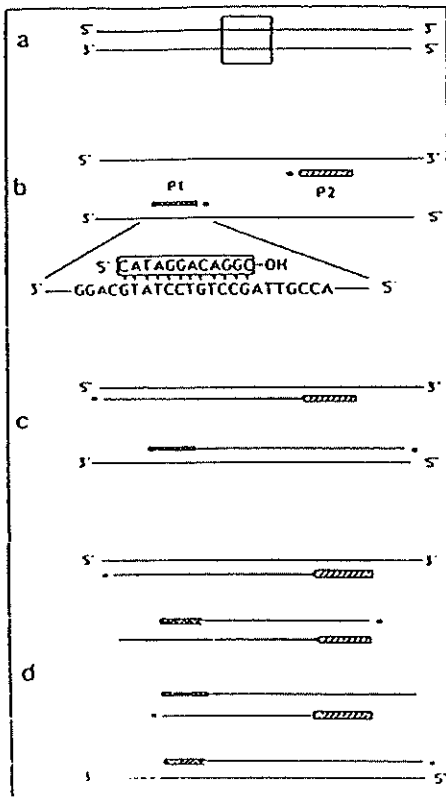
II.3. ANALYSE DE LA VARIABILITE GENETIQUE DANS LES POPULATIONS SELECTIONNEES

Le suivi des nouvelles populations et l'analyse du polymorphisme par les différents marqueurs permettra

- * l'évaluation du polymorphisme génétique dans les populations sélectionnées, en comparaison avec les familles témoins
- * l'étude relative des performances (croissance et résistance) des populations sélectionnées, toujours en référence aux familles témoins issues du milieu naturel.
- * le calcul de l'hétérosis entre les deux populations (P89-G1 et P85-G2).

FIGURE 6 Principe de la PCR

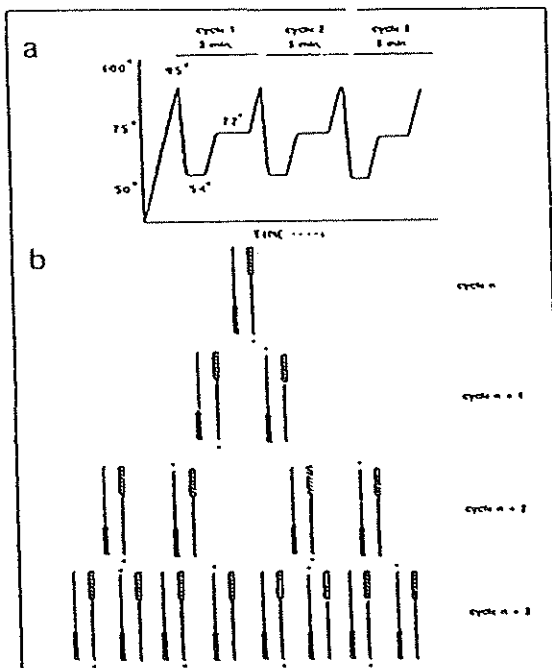
D'après Arnheim *et al*, 1990



- a) La boîte symbolise la séquence d'ADN à amplifier
- b) Après dénaturation de l'ADN, les deux amorces s'apparient aux séquences flanquants la région à amplifier. L'astérisque indique l'extrémité 3' de l'amorce, à partir de laquelle va se faire l'élongation.
- c) Elongation grâce à la polymérase. Les pointillés indiquent la zone du produit d'extension qui est complémentaire à l'autre amorces.
- d) Lors du second cycle, chacun des 4 brins s'apparie à une amorce et l'élongation se produit

FIGURE 7 Profil de température de trois cycles d'amplification successifs

D'après Arnheim *et al*, 1990



- a) Profils de température
- b) Augmentation exponentielle du produit d'amplification

II.3.A. Evaluation du polymorphisme génétique

Tous les géniteurs potentiels de la P85-G2, de la P89-G1 et de la population témoin, qu'ils aient ou non participé à la création des familles en 1995, ont été biopsés. Une analyse du polymorphisme de chaque lignée sera faite à l'aide des marqueurs microsatellites et des marqueurs enzymatiques.

Les résultats sont difficile à prévoir, surtout en l'absence de données précises sur le nombre de géniteurs à l'origine de chacune des lignées. Ils seront à rapprocher des résultats obtenus par Vrijenhoek *et al.* (1990), dans le seul autre cas connu de sélection pour la résistance à une maladie chez les mollusques bivalves, en l'occurrence *Crassostrea virginica* sélectionnée pour la résistance à *Haplosporidium nelsoni* (MSX). Un programme de sélection en ce sens a été engagé en 1960 (Haskin *et al.*, 1966; Haskin & Ford, 1979). Une nette amélioration de la survie a été notée dans les lignées sélectionnées (Ford & Haskin, 1987). Cependant, une baisse des performances est apparue dans certaines lignées à partir de la 4^{ème} génération de sélection, pouvant laisser songer à une dépression de consanguinité due à d'éventuels goulets d'étranglements ("bottleneck"). L'étude du polymorphisme enzymatique a cependant montré que la sélection n'avait pas entraîné de baisse de l'hétérozygotie, malgré la perte de certains allèles, du fait d'une homogénéisation des fréquences alléliques (augmentation de l'"evenness").

II.3.B. Etude des performances des lignées sélectionnées

II.3.B.1. Résistance

Pour estimer les performances de résistance des familles du programme de sélection, toutes les familles produites en 1995 dans ce cadre ont été inoculées au printemps 1996, à savoir, les familles de la génération P85-G3, les familles de la génération P89-G2, les familles de l'intercroisement entre les deux lignées et les familles témoins.

Les purifications et les inoculations ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de l'URPIG (Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales, La Tremblade). Les purifications du parasite *Bonamia ostreae* ont été effectuées selon le protocole décrit par Mialhe *et al.* (1988) (voir Figure 8). Quarante animaux de chaque famille ont été numérotés et trente d'entre eux environ inoculés avec une suspension de 60.000 cellules de *B.ostreae* purifié dans 50 µl.

Les animaux ont été répartis dans 4 bacs, avec nourriture non limitante. La mortalité sera suivie quotidiennement (jusqu'à septembre 1996) et des frottis cardiaques seront effectués sur chaque animal mort afin de réaliser une recherche de *Bonamia*. L'observation des frottis sera assurée également par l'URPIG. Les animaux seront pesés régulièrement. Au terme de l'expérience, tous les animaux seront sacrifiés afin de connaître la prévalence du parasite dans les animaux résistants.

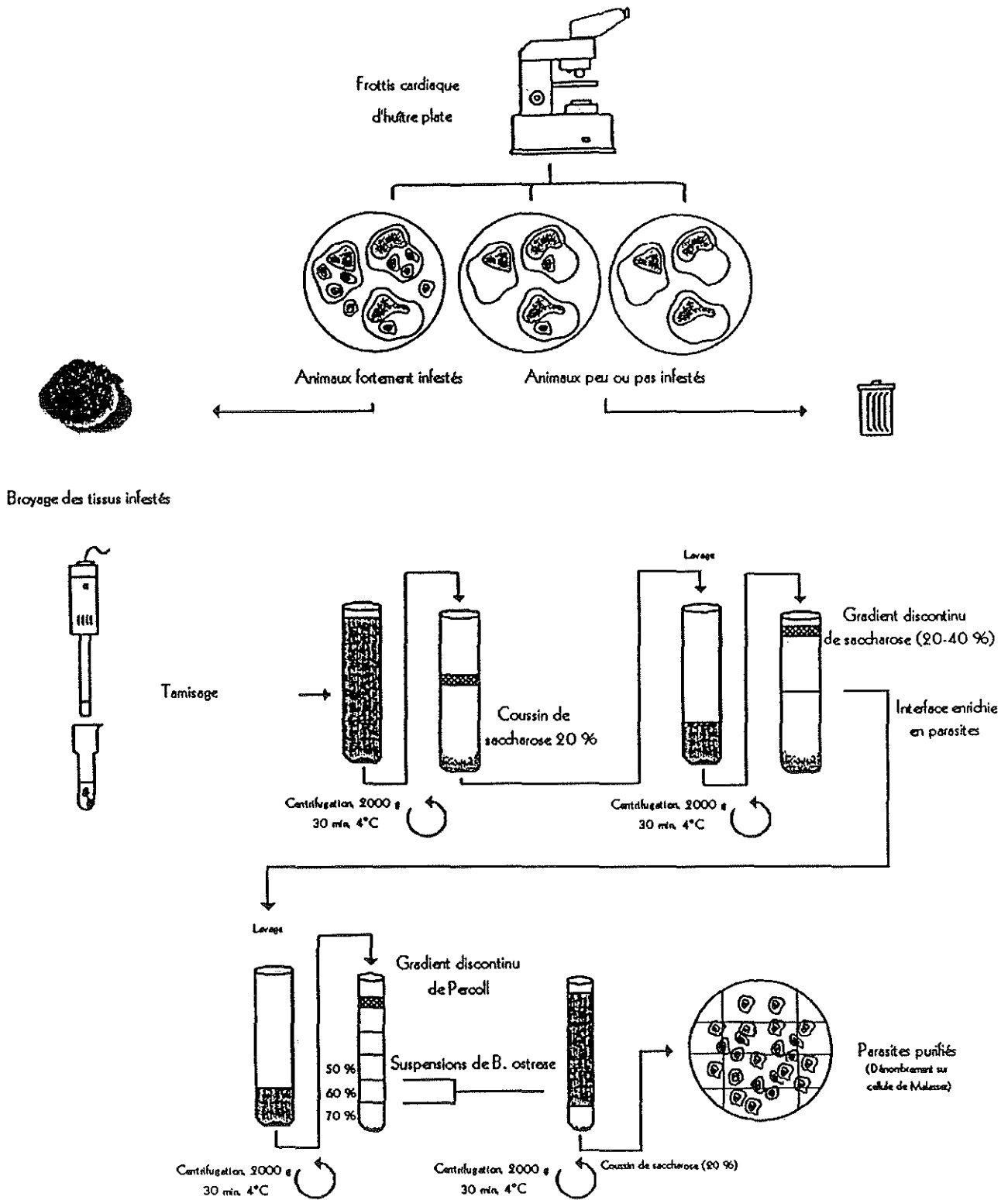
II.3.B.2. Croissance

Afin d'évaluer les paramètres génétiques de la croissance chez *Ostrea edulis*, un dispositif expérimental a été mis en place au printemps 1996 à la station de Bouin. Il s'agit d'un plan expérimental en bloc complet, constitué de deux couloirs, chacun avec deux "super-blocs" contenant chacun 100 individus de chaque famille. Au total, ce sont donc 400 individus de chaque famille qui seront étudiés. Au préalable à la mise en place, des mesures de taille et poids total sont effectuées sur chaque lot. Dans chaque famille, 40 individus (4 x 10) seront numérotés individuellement, pesés et mesurés. Le suivi mensuel des performances consistera en une pesée moyenne de chaque famille et une pesée individuelle des animaux marqués.

FIGURE 8

Protocole de purification de *Bonamia ostreae*

D'après Cochenec.



L'expérience sera suivie jusqu'à l'automne 1996, et des mesures de taille, poids total, poids sec, poids de coquille seront effectuées sur 40 individus de chaque famille.

II.4. REALISATION D'UNE CARTE DE LIAISON

Si le nombre de marqueurs le permet, un début de cartographie génique sera réalisé. Il ne pourra s'agir dans un premier temps que de mettre en évidence des groupes de liaison, qui seront établis par une analyse des recombinaisons des différents marqueurs à l'aide des croisements établis précédemment.

La méthode suivie est décrite dans Gellin & Chevalet (1994):

① Création de familles de référence

Des familles "F1" issues du croisement entre un individu d'une lignée sélectionnée (L85 ou L89) et d'un individu du milieu naturel ont été réalisés en 1995. Les 2 parents de chaque famille ont été choisis le plus éloigné possible du point de vue génétique, afin de maximiser les chances d'observer des ségrégations alléliques en première génération.

Du fait que les populations parentales ne constituent pas des lignées pures, et du fait du polymorphisme attendu dans les marqueurs utilisés, il est probable que les parents seront hétérozygotes pour une partie des locus étudiés, et donc que des ségrégations seront observables dès cette génération F1. Cependant, pour avoir le maximum de chance d'observer des ségrégations alléliques à un grand nombre de locus, des familles biparentales "F2" ont été réalisées en 1996 en croisant des pleins-frères issus des familles F1 de 1995. Il s'agit là des mêmes familles que celles utilisées pour la recherche d'un marqueur de résistance.

② Choix des marqueurs : tous les marqueurs disponibles sur l'huître plate seront utilisés : microsatellites, MASC et enzymes.

③ Typage des animaux : tous les géniteurs ont été biopsés (prélèvement d'un morceau de branchie après anesthésie au Chlorure de magnésium), et l'ADN est extrait soit par la méthode classique phénol/chloroforme (Naciri *et al.*, 1995), soit par Chelex® (Walsh *et al.*, 1991). Les animaux plus âgés et pouvant être sacrifiés seront analysés pour les enzymes (Saavedra *et al.*, 1993).

Cela permettra ensuite d'avoir des données sur les différents marqueurs, d'analyser les ségrégations et d'identifier des groupes de liaisons dans des familles biparentales.

Cette étape permettra d'établir un réseau de marqueurs, le plus dense possible. Plus le nombre de marqueurs sera important, plus l'étape suivante (recherche de marqueur de résistance) sera facilitée.

L'huître plate possède 10 chromosomes ($2N=20$) mais la taille du génome en centimorgans n'est pas connue. Le nombre minimum de marqueurs envisagé est de 5 par chromosome, soit au minimum 50 marqueurs.

II.5. MISE EN EVIDENCE D'UN MARQUEUR DE LA RESISTANCE A *BONAMIA OSTREAE*

Le problème auquel se heurte actuellement le programme de sélection est celui de la difficulté à déterminer précisément l'état de résistance ou sensibilité d'un individu à la bonamiose. Pour l'instant, la technique utilisée est celle de la confrontation directe des animaux au parasite : le parasite purifié est inoculé aux animaux. Les animaux qui ne meurent pas sont considérés résistants. On ne peut donc pas savoir a priori si un individu est résistant ou sensible, et la non-résistance d'un individu est connue trop tard! De plus, l'intervalle de génération est actuellement de deux ans; les animaux sont inoculés au bout d'un an et il faut attendre la deuxième année pour connaître les résultats de cette inoculation.

Le mode d'action du parasite étant très mal connu, on ne sait pas exactement quelle est la nature génétique d'une éventuelle résistance (ou tolérance). Toutefois, les résultats obtenus récemment par le laboratoire montrent qu'il y a effectivement une base génétique, et que cette résistance (ou tolérance) serait contrôlée par un nombre de gènes limité à effets additifs importants. (Naciri-Graven *et al.*, soumis). Ceci est soutenu par la rapidité de la réponse à la sélection effectuée, par les performances du croisement Lignée sélectionnée x témoin (performances intermédiaires à celles des deux lignées parentales) et également par le fait que les caractères de résistance/tolérance sont rarement des caractères quantitatifs, mais plutôt des caractères oligogéniques ou même monogéniques. (Naciri, comm. pers.).

D'autre part, un travail a été mené par l'équipe de l'URPIG sur l'identification et les comptages des différents hémocytes, *Bonamia ostreae* étant un parasite intra-hémocytaire (Cochennec *et al.*, 1995). Une étude comparée des hémocytes chez les individus sélectionnés au laboratoire (considérés résistants) et des individus issus du milieu naturel (considérés sensibles) a mis en évidence une différence dans les proportions des différents types hémocytaires, les hémocytes préférentiellement attaqués par *Bonamia ostreae* étant en proportion beaucoup plus faibles chez les individus résistants. Ce travail ouvre une première voie dans la compréhension des mécanismes de la résistance à *Bonamia* et éventuellement à une méthode de sélection.

Une partie de mon travail va s'attacher à trouver un marqueur lié à ou aux locus expliquant la résistance. La connaissance d'un tel marqueur permettrait de s'affranchir de toutes les contraintes de l'inoculation et permettrait une sélection précoce des individus résistants.

II.5.A. Inoculation de la F2 en vue de l'identification d'un marqueur de résistance

300 animaux de la famille F2 produite en 1995 ont été inoculés avec une suspension de *Bonamia ostreae* purifié (Mialhe *et al.*, 1988) à raison de 60.000 *Bonamia* par animal. Tous les animaux ont été biopsés préalablement à l'inoculation. Les animaux ont été répartis dans 4 bacs, avec nourriture non limitante. Les mortalités sont relevées quotidiennement et un frottis cardiaque est réalisé pour recherche de *Bonamia*.

Comme nous n'avons à disposition qu'une seule famille F2 au printemps 1996, deux des 4 familles F1 produites en 1995 ont également été inoculées, à raison de 150 animaux (préalablement biopsés) par famille. Comme les parents (lignée sélectionnée et témoin) ne sont pas issus de lignées pures, on peut espérer observer une ségrégation allélique dès la F1, en particulier pour le (ou les) gènes de résistance.

II.5.B. Tests statistiques

L'identification rapide d'un marqueur lié à un gène spécifique se fera par la méthode dite "BSA" (bulked segregant analysis) (Michelmore *et al.*, 1991). Cette méthode consiste à comparer deux "pool" d'ADN issus d'une même population ségrégeante mais dont les individus diffèrent pour un caractère particulier (dans le cas qui nous intéresse, résistance ou sensibilité à la bonamiose). Les marqueurs qui sont polymorphes entre les deux pools sont génétiquement liés au(x) locus intervenant dans ce caractère. La BSA est un moyen de se focaliser sur des régions intéressantes où les marqueurs sont rares.

Le nombre d'individus nécessaires par pools dépend du type de marqueurs dominants ou codominants et le type de population utilisé (F2, backcross, etc...)

Cette technique suppose que les marqueurs adjacents au gène ciblé soient en déséquilibre de liaison. Les marqueurs ayant une fréquence de recombinaison de 10% autour du gène ciblé seront toujours identifiés, ceux avec une recombinaison de 30% également, au moins par une différence d'intensité des bandes entre les deux pools. En terme de distance génétique, tout

locus situé à moins de 15 centimorgans du locus ciblé est susceptible d'être identifié. Une fois les marqueurs identifiés, les distances de liaison peuvent être déterminées par des analyses de ségrégations (Michelmore *et al.*, 1991).

III.RESULTATS

III.1.PRODUCTION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

III.1.A.Production des nouvelles générations de sélection

Dès janvier 1995 a été mis en place le dispositif expérimental pour la production des nouvelles générations desélection (P89-G2 et P85-G3).

Les premières familles ont été obtenues à partir du 5 mars, et la trentième famille, pour chaque nouvelle génération, a été obtenue courant mai.

Dès les premières pontes, les croisements interpopulations ont été mis en place et les premières familles obtenues début avril. La vingtième famille a été obtenue le 21 mai. 4 familles n'ont pas survécu aux premiers stades d'élevage et fin août, 16 familles issus d'un intercroisement entre les deux lignées étaient encore à notre disposition.

Les croisements témoins ont été mis en place avec des individus issus de captage dans le milieu naturel. Les premières pontes ont eu lieu fin avril. Au lieu des 20 familles prévues, 21 ont été produites, dont une a disparu au cours des premiers stades d'élevages.

La quasi-totalité des familles ont été transférés pour prégrossissement à la station de Bouin entre la mi-avril et fin juin. Des mesures prophylactiques strictes ont été prises pour empêcher sinon l'apparition, du moins la prolifération de l'*Herpès* virus. Cependant, certaines familles ont présenté des mortalités anormales (12 familles au total). Les travaux de Claude Delsert (URGE) et de l'URPIG ont permis de mettre au point un test diagnostique de l'*Herpès* par PCR. Un échantillon de 5 individus de chacune des familles a été testé par cette méthode. Seuls trois lots ont donné une réponse positive (voir Figure 9), dont un n'avait pas (et n'a toujours pas à cette date) présenté de mortalité anormale. Cependant, le test diagnostique n'est pas fiable à 100%. En effet, il n'est actuellement pas possible de détecter le virus en faible quantité dans les cellules sur des aussi gros animaux. En conséquence, une réponse négative au test n'indique pas de façon sûre que le lot est indemne. Dans le doute, toutes les familles ayant connu des mortalités anormales, ainsi que la famille donnant une réponse positive au test *Herpès*, ont été écartées des expérimentations à la Station de Bouin.

Une partie des familles a été transférée à la station de La Trinité au début et à la fin de l'été, dans le but de faire un test de performances en milieu naturel et également d'avoir une réserve de géniteurs.

III.1.B.Production des familles F2

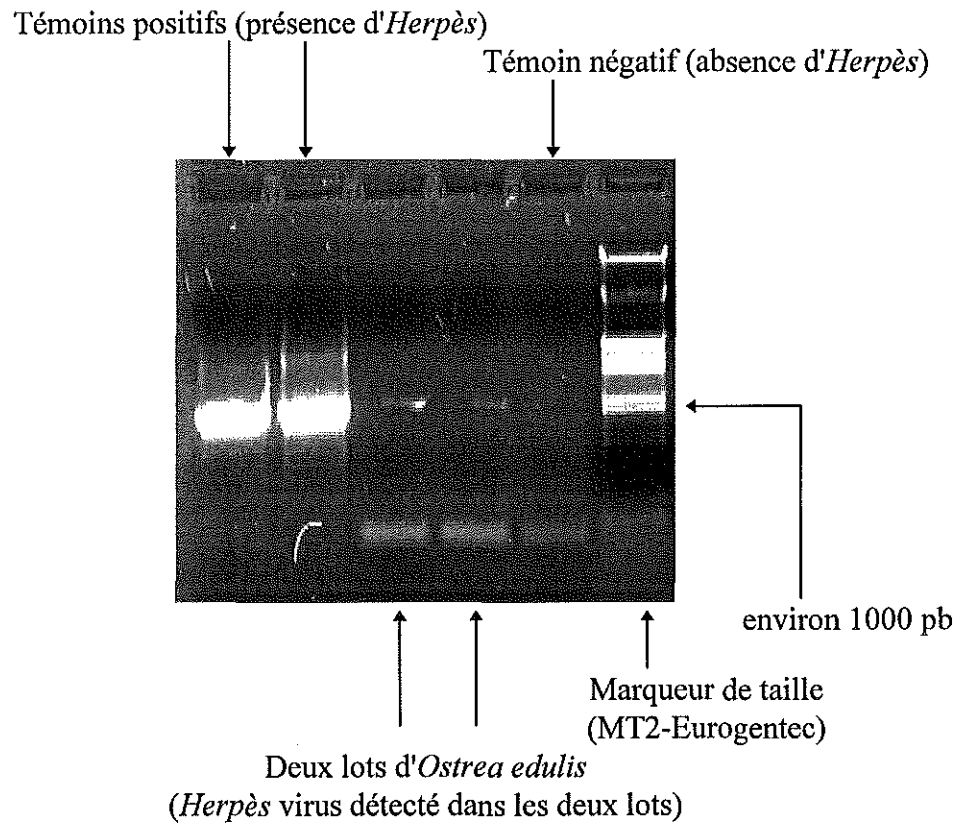
En 1996, nous avons mis en place 10 couples de plein-frères issus des deux premières familles F1 produites en 1995, qui sont toutes les deux du type P89 x Témoin. Les animaux n'avaient pas un an à la date de mise en place des couples, et ces géniteurs potentiels ont été choisis parmi les plus gros individus disponibles, afin de maximiser les chances d'obtenir une maturation. Au 10 avril, 6 familles F2 ont été obtenues.

III.2.INOCULATIONS DES FAMILLES PRODUITES EN 1995

Toutes les familles n'ont pas été inoculées, soit en raison de faible survie, soit en raison de suspicion d'*Herpès* virus. En définitive, ce sont 25 familles de la P85-G3, 30 familles de la P89-G2, 16 familles interlignées P85xP89 et 19 familles témoin qui ont été inoculées en mars 1996.

FIGURE 9

Diagnostic de la présence d'*Herpès* virus par PCR



Une trentaine d'animaux de chaque famille ont été inoculés, à raison de 60.000 *Bonamia* dans 50 µl par animal. Ces inoculations ont été effectuées en 4 fois (21, 22, 26 et 28 mars 1996), ce qui correspond aux 4 bacs d'élevage prévus. Les animaux n'étaient pas tous de même âge au moment de l'inoculation (de 10 mois pour les familles témoins et interlignées à 1 an pour les familles intralignées). Au 10 avril, seuls les animaux du premier bac ont été pesés, soit environ 7 animaux par famille. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1: Poids des individus inoculés au 10/4/96

Population	Effectif	Moyenne	Test de Student-Newman-Keuls *
P85-G3	167	12,9	A
P89-G2	188	12,4	A
P85 x P89	95	10,1	B
Témoin	115	6,6	C

* Une lettre différente signifie que les poids sont significativement différents (à 5%)

Les animaux n'étant pas tous de même âge, on ne peut comparer entre eux que

* les deux nouvelles générations de sélection (P85-G3 et P89-G2) qui ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre.

* Les familles de l'intercroisement (P85xP89) et les familles témoins, les premières ayant une croissance significativement plus importante.

III.3.MARQUEURS MOLECULAIRES

III.3.A. Identification et caractéristiques des microsatellites

Les résultats sont présentés ci-dessous en séparant les deux types de clonage utilisés.

III.3.A.1. clonage I (en blunt)

Un nombre total de 3639 clones a été repiqué, d'une taille d'insert moyenne de 650 pb. En supposant que chaque insert est unique, la taille du génome ainsi criblée a été estimée à 2300 kb. En se basant sur une moyenne des tailles du génome chez deux autres espèces du genre *Ostrea* (Hinegardner, 1974), il est possible d'estimer la taille du génome haploïde d'*Ostrea edulis* à 1100 Mb; la librairie étudiée représente alors 0.2% du génome.

Le criblage à l'aide des sondes dinucléotidiques a permis l'identification de 30 clones positifs (soit 0,82 % des clones). Dix-sept clones contenaient un microsatellite, et un clone contenait deux microsatellites.

Sur les 19 microsatellites mis en évidence, 9 sont constitués de motifs dinucléotidiques purs (type (AC/GT)_n ou (AG/CT)_n), un est constitué d'un motif dinucléotidique impur, 8 sont des motifs composés, et un est un tétranucléotide.

III.3.A.2. clonage II (en bouts collants)

Un nombre total de 4259 clones a été repiqué, d'une taille d'insert moyenne de 650 pb. La taille de la portion de génome ainsi criblée est évaluée à 2700 kb, soit 0.25% du génome.

Le criblage par les sondes dinucléotidiques a permis de mettre en évidence 19 clones positifs (soit 0.45 % des clones). Dix-huit ont été séquencés à ce jour. Onze clones contenaient un microsatellite, et un clone en contenait deux.

Sur les 14 microsatellites mis en évidence, 7 sont des motifs dinucléotidiques purs , 2 sont des motifs dinucléotidiques impurs, 4 sont des motifs composés, et un est un motif trinucléotide.

Les caractéristiques des différents microsatellites identifiés sont présentés dans le tableau 2. Les essais d'hybridation avec les sondes tri et tétranucléotidiques n'ont pas été concluants, probablement faute d'avoir trouvé les bonnes conditions d'hybridation.

Tableau 2: Caractéristiques des microsatellites identifiés.

Nom du locus	Clone	Motif	Clonage	Amorces	Amplificatio
J12		(GT) ₁₄	II	O	OK (P)
F2		(GT) ₁₄	II	=J12	
I9		(CA) ₂₆	II	O	OK (N)
T5		(CA) ₁₅	II	O	OK (P)
B16		(GT) _n	II	O	OK (N)
B113		(GA) ₂₂	II	O	OK (N)
G11		(AT) ₂₀	II	O	OK (P)
W18		(GT) ₂₄ ..(GTGTGC) ₆ (GT) ₄	II	O	
G9		(AT) ₄ (GT) ₃₅	II	O	OK (P)
Z44		(AT) ₆ (GT) ₁₄	II	N	
M14		(TA) ₂₀ (CA) ₁₃	II	O	OK (N)
R9		(CT) ₂₇ C(CA) ₁₉	II	O	OK (N)
D1		(AGG) ₅	II	O	
P7		(AC) ₂₀	I	O	OK (P)
Q6		(AC) _n	I	O	
R6		(TG) ₂₁	I	N	
C16		(CT) _n	I	S	
K7		(CT) ₂₈	I	O	OK (P)
O9		(GA) ₃₆	I	O	OK (P)
E10		(AG) _n	I	S	
T18		(CT) ₂₁	I	S	
D8		(GA) ₂₄	I	O	
I22		(CT) ₁₁ CCC(CT) ₆	I	N	
H10		(CA) ₁₈ (TA) _n	I	O	OK (N)
G12		(CA) ₂₆ (TA) ₃	I	O	
O3		(TA) ₈ (GA) ₂₆	I	N	
N8		(AT) ₈ ..(AT) ₂₂ ..(CT) ₂₆	I	O	OK (P)
P8		(TA) ₇ (GA) ₂₂	I	S	
E8		(AT) ₁₇ AC(AG) ₂₃	I	O	
U2		(AC) _n (AG) _n	I	O	OK (P)
R10		(ATG) ₄ ..(CT) ₆ TTT(CT) ₂₂	I	O	OK (N)
H15		(ATCT) _n (interrompu)	I	O	OK (P)

O: Amorces définies autour du microsatellite

N: site d'insertion trop près du microsatellite pour définir des amorces

S: en cours de séquençage

OK: amplification sur quelques individus, montrant du polymorphisme (P) ou non (N)

III.3.B. Estimation des densités des microsatellites (AC/GT)_n et (AG/CT)_n

Les calculs de densité ont été effectués sur les microsatellites de types (AC/GT)_n et (AG/CT)_n, avec une méthode comparable à celle utilisée par Naciri *et al.* (1995) à partir de la première banque. On considère pour ces calculs que les motifs composés sont constitués en fait de deux microsatellites accolés. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Comparaison des résultats de clonage et des estimations de densité des microsatellites entre les 2 banques réalisées sur *Ostrea edulis*.

	Banque 1993 (Naciri <i>et al.</i> , 1995)		Banque 1995			
			Clonage I		Clonage II	
Nb de clones criblés	3560		3639		4259	
Taille moyenne des inserts	195		650		650	
Taille du génome criblé	700 kb		2300 kb		2700 kb	
% du génome criblé	0,064%		0,2%		0,25%	
% de clones positifs	0,6%		0,82 %		0,45 %	
Nb de μsatellites identifiés	12		19		13	
(AC/GT) _n	5		6		11	
Nb estimé et densité	7900	139 Kb *	3000	380 Kb	4400	250 Kb
(AG/TC) _n	8		13		2	
Nb estimé et densité	12700	87 Kb	6500	176 Kb	800	1375 Kb
(AT/TA) _n	ND		6		4	
Nb estimé et densité			3000	380 Kb	1600	840
Nb total estimé et densité	20600	54 Kb	12500	92 Kb	6800	198 Kb

*: distance moyenne estimée entre deux microsatellites

Ces résultats sont intéressants à deux titres:

① il y a tout d'abord une grande différence, dans la banque réalisée en 1995, entre les types de motifs mis en évidence par les deux techniques de clonage utilisées. Dans le cas du clonage I, on a surtout révélé des motifs du type (AG/CT)_n, ce qui était également le cas lors du criblage de la banque réalisée par Y. Naciri avec la même technique. Par contre, lors du clonage II, ce sont surtout les motifs du type (AC/GT)_n qui ont été révélés.

Il est difficile de donner une explication. On peut noter les différences essentielles entre les deux types de clonage.

Tout d'abord, on peut noter que les sites de coupure ne sont pas les mêmes selon les enzymes de restriction utilisées (voir tableau 4)

Tableau 4: Sites de restriction des différentes enzymes utilisées.

	Enzyme	Site de restriction
Clonage I	<i>AluI</i>	AG [^] CT
	<i>HaeIII</i>	GG [^] CC
	<i>RsaI</i>	GT [^] AC
Clonage II	<i>Sau3A</i>	[^] GATC

De plus, dans le cas du clonage I, la digestion enzymatique n'a été que partielle, mais a tout de même permis de couper la quasi-totalité du génome en fragments compris entre 400 et 800 pb. On aurait donc une bonne représentativité du génome dans les fragments clonés. Par contre,

dans le cas du clonage II, et malgré une digestion complète, les fragments compris entre 400 et 800 pb ne représentaient qu'une fraction du génome.

Si ce paramètre s'avère effectivement déterminant, une estimation correcte du ratio entre les motifs (AC/GT)_n et (AG/CT)_n peut être donnée en combinant les résultats du clonage I à ceux obtenus par Naciri *et al.* (1995); ce ratio serait de 1 motif (AC/TG)_n pour 3 motif (AG/TC)_n. On peut noter que c'est le ratio inverse de ce qui a été trouvé chez les vertébrés (homme, rat ou truite, Beckman & Weber, 1992; Estoup *et al.*, 1993b.)

② Il est étonnant de voir une différence aussi grande, entre les deux banques génomiques, dans les estimations du nombre et de la densité des motifs microsatellites dans le génome. La différence essentielle entre les deux banques tient au choix de la taille des fragments. Il est possible alors que l'on n'ait pas criblé la même population de microsatellites, et qu'il y ait davantage de "petits" microsatellites que de "grands".

Il est fréquent de trouver, dans les génomes humains et porcins, des microsatellites avec moins de 12 répétitions (Weber, 1990; Wintero *et al.*, 1992.). Si c'est le cas également chez *Ostrea edulis*, il est possible que dans le travail présenté ici, la (trop?) grande taille des fragments n'ait pas permis la détection de ces motifs, et que l'on ait donc sous-évalué le nombre de microsatellites potentiels et leur densité dans le génome.

La distance réelle entre deux microsatellites (de type (AC/GT)_n ou (AG/CT)_n) dans le génome d'*Ostrea edulis* doit se situer entre 54 Kb et 146 Kb. En l'absence de données analogues chez d'autres mollusques, et à titre de comparaison, les résultats obtenus chez d'autres animaux (vertébrés) et chez une plante sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Distance en Kb entre les motifs microsatellites chez différents organismes.

	(AC/GT) _n	(AG/CT) _n	Total
Homme (Stallings <i>et al.</i> , 1991; Beckmann & Weber, 1992)	30-50	115	
Rat (Beckmann & Weber, 1992)	15	30	
Chien (Rothuizen <i>et al.</i> , 1994)	42		
Porc (Wintero <i>et al.</i> , 1992)	46		
Cheval (Ellegren <i>et al.</i> , 1992)	100	750	
Saumon (Slettan <i>et al.</i> , 1993)	63		
Truite commune (Estoup <i>et al.</i> , 1993b)	23	76	
Abeille (Estoup <i>et al.</i> , 1993a)	34	15	
Bourdon (Estoup <i>et al.</i> , 1993a)	500	40	
<i>Vespula rufa</i> (Thorén <i>et al.</i> , 1995)	8	2.5	
Huître plate (Naciri <i>et al.</i> , 1995)	139	87	54
Huître plate (cette étude)	480	176	92
Riz (Wu & Tanksley, 1993)	480	225	150
Riz (Panaud <i>et al.</i> , 1995)	365	330	
Radis (Lagercrantz <i>et al.</i> , 1993)	300	90	
Blé (Lagercrantz <i>et al.</i> , 1993)	110	80	
Tabac (Lagercrantz <i>et al.</i> , 1993)	180	150	
Epicea (Lagercrantz <i>et al.</i> , 1993)	180	150	
<i>Arabidopsis</i> (Bell & Ecker, 1994)	428	245	
Maïs (Condit & Hubble, 1991)	166	111	

On peut espérer dans un futur proche, la parution d'études utilisant des microsatellites chez d'autres mollusques (en particulier *Crassostrea gigas*); nos résultats pourront alors être réexaminés à la lumière de ces nouvelles informations. Au laboratoire de La Tremblade, un

programme européen en cours sur les bases génétiques de la croissance chez *Crassostrea gigas* comprend entre autre une identification de microsatellites chez cette espèce. Ce travail va être effectué au Laboratoire Génome et Populations, et les amorces définies pour *C.gigas* pourront être testées chez *O.edulis*.

Notons simplement que les microsatellites apparaissent moins fréquent chez *Ostrea edulis* que chez les mammifères. Cela semble également être le cas chez les plantes (Lagercrantz *et al.*, 1993), chez qui l'importance relative des types (AC)_n et (AG)_n est inversé par rapport aux mammifères, comme ce qui a été trouvé chez *Ostrea edulis*. Cela semble également le cas chez le bulin, mollusque gastéropode d'eau douce (Jarne *et al.*, 1994; Jarne, comm.pers.), ainsi que chez les insectes.

Le motif microsatellite le plus fréquent chez les plantes serait en fait (AT)_n (Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante et Olivieri, 1993), lequel motif ne semble pas être le plus abondant chez *Ostrea edulis*.

III.3.B.1.Définition des amorces et premières amplifications.

A l'aide du logiciel Primer, des couples d'amorces ont été définis pour 25 microsatellites. (voir Tableau 2). Pour quatre autres microsatellites (Z44, R6, I22 et O3), il n'a pas été possible de définir des amorces en raison de la trop grande proximité du site d'insertion. Pour les autres, le séquençage est encore en cours.

Pour 19 locus, des amplifications satisfaisantes (une bande unique ou deux bandes proches) ont été obtenues. De plus, ces résultats préliminaires semblent indiquer l'existence de polymorphisme à certains locus. Le fait de ne pas avoir trouvé de polymorphisme pour certains microsatellites dans ces conditions préliminaires (faible nombre d'individus, migration des produits de PCR sur minigel d'agarose, peu résolutif, qui ne permet pas de distinguer des fragments ayant moins d'une vingtaine de paires de bases de différence) ne permet pas de conclure sur le polymorphisme réel des ces marqueurs. Par contre, les résultats de polymorphisme, obtenus pour certains marqueurs (J12, T5, G11, G9, P7, K7, O9, N8, U2 et H15) dès ces stades préliminaires est très encourageant pour la suite! (voir Figure 10)

La prochaine étape consistera à évaluer le polymorphisme réel de tous ces loci, en analysant un plus grand nombre d'individus et en utilisant des techniques de visualisation plus résolutive (migration sur gel de polyacrylamide dénaturant après marquage radioactif d'une amorce).

III.3.C.Marqueurs anonymes simples copies

5 paires d'amorces issues de Karl & Avise (1993) ont été testées une fois sur *Ostrea edulis*. Il s'agit des locus CV233, CV195, CV 36, CV20 et CV32.

Les résultats d'amplification par PCR sont variables, entre aucune bandes (CV20) et un très grand nombre de bandes (CV36). Le locus CV195 a donné de une à deux bandes suivant la quantité d'ADN. Il serait intéressant de poursuivre l'étude de ce locus chez *Ostrea edulis*, en optimisant la quantité d'ADN à utiliser puis en procédant à des restrictions enzymatique sur le produit de PCR. (voir Figure 11)

La mise au point des amplifications va se poursuivre au cours de l'année 1996 et la première utilisation des marqueurs sera l'évaluation de la variabilité génétique dans les populations d'huîtres plates sélectionnées pour la résistance à *Bonamia*, en comparaison avec des populations issues du milieu naturel.

III.4.ETUDE DES PERFORMANCES DES LIGNEES SELECTIONNEES

Que ce soit pour l'étude des performances de résistance que pour l'étude des performances de croissance, les dispositifs expérimentaux sont en place. A La Tremblade, toutes les inoculations ont été effectuées. A Bouin, ce sont au total 51 familles des différentes populations qui participent à l'expérimentation. Cependant, la mise en place de ces dispositifs est trop récente pour que des résultats significatifs en soient tirés à la date de la rédaction de ce rapport.

FIGURE 10

Migration sur gel d'agarose du microsatellite T5 amplifié chez 4 huîtres plates

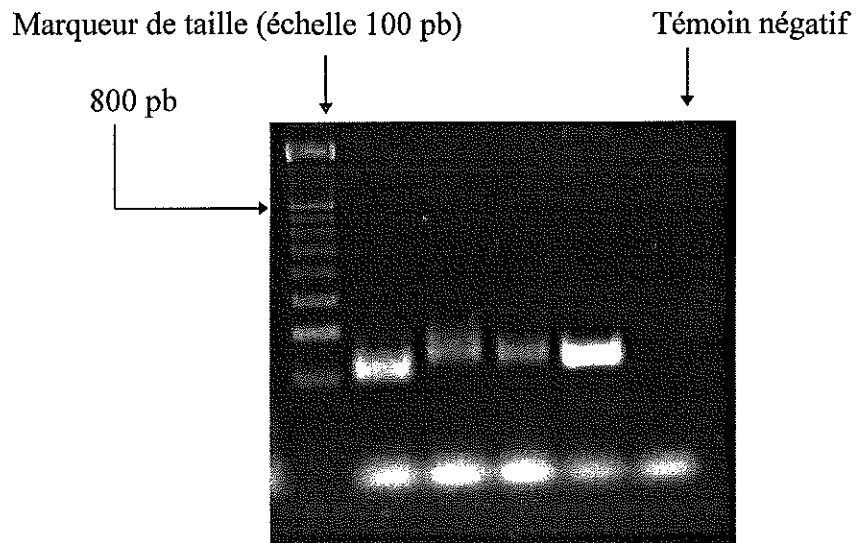
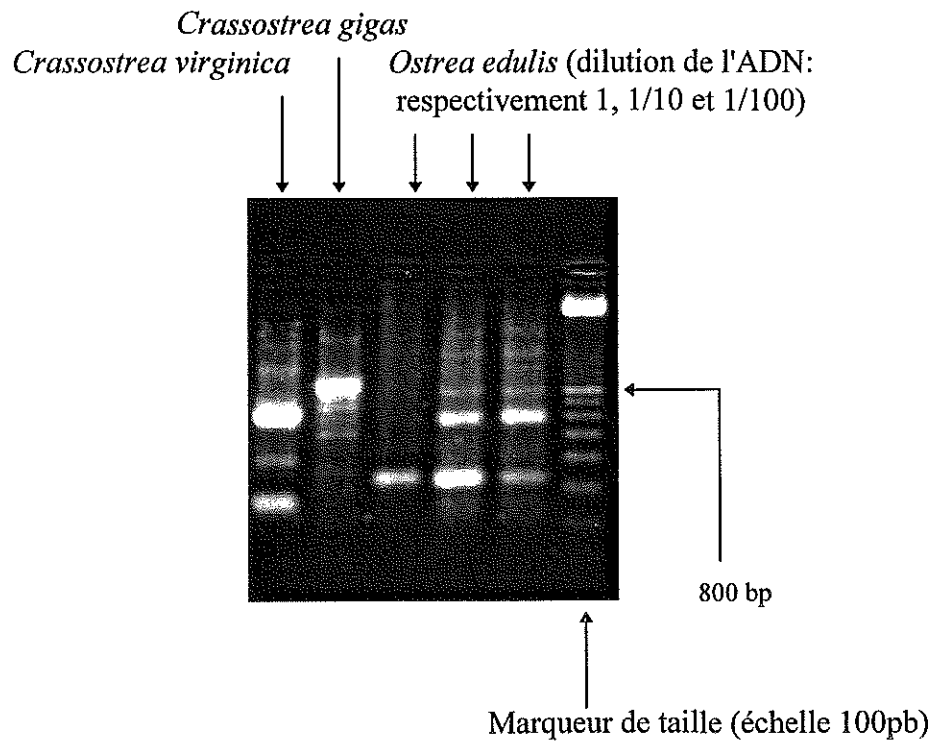


FIGURE 11

Migration sur minigel d'agarose du locus MASC CV195



IV.CONCLUSION

IV.1.BILAN POUR L'ANNEE 1995-1996

Le travail effectué respecte à ce jour globalement le calendrier prévu. Je présenterai ci-dessous les principaux points de blocage et les points forts de mon travail.

IV.1.A.Points de blocage

IV.1.A.1.Herpès virus

Le principal point de blocage de mon travail à l'heure actuelle est la menace d'*Herpès virus* sur l'ensemble du matériel biologique. Au cours de l'année 1995, les mesures prophylactiques envisagées semblent avoir sinon supprimé, du moins limité le problème. Sur les 100 familles produites pour le programme de sélection, seules 11 ont été écartées de la suite des expérimentations pour suspicion d'*Herpès virus*. Le test diagnostique par PCR de l'herpès est actuellement en cours de validation à l'URPIG et on peut espérer pour la suite du programme des possibilités de test sur les géniteurs préalablement à leur utilisation.

Pour 1996, sont particulièrement menacés les animaux inoculés au printemps, maintenus à La Tremblade, et surtout les animaux qui vont être mis en expérimentation à la station de Bouin, en vue de l'évaluation des paramètres génétiques de la croissance. Toutes les familles ont subi un test diagnostique, et les lots douteux ont été écartés, mais en l'état actuel de la sensibilité du test, il est possible que l'on n'ait pas identifié tous les lots contaminés.

IV.1.A.2.Evaluation de la variabilité génétique

L'évaluation de la variabilité génétique dans les populations sélectionnées, prévue initialement pour 1995, sera en fait réalisée en 1996, avec la totalité des marqueurs actuellement disponibles. Le retard est dû en particulier au fait que les mises au point de marqueurs se sont poursuivies jusqu'à janvier 1996. Cependant, le programme relativement léger prévu initialement pour 1996 devrait permettre de réaliser ces études de variabilité génétique sans prendre de retard sur l'année prochaine.

IV.1.A.3.Localisation chromosomique des marqueurs

Les projets de localisation des marqueurs sur les chromosomes par les techniques de fluorescence *in situ* est pour l'instant mis de côté. La technique n'existant pas au laboratoire, cette étude supposerait un lourd investissement en temps et en matériel.

IV.1.B.Points forts

IV.1.B.1.Identification de marqueurs moléculaires

Le séjour au Laboratoire Génome et Populations, dans le cadre de l'URM n°16, a permis d'atteindre l'objectif initial qui était d'augmenter le nombre de marqueurs moléculaires utilisables chez l'hôte plate. En effet, 33 nouveaux microsatellites potentiellement utilisables ont été identifiés. Les premiers essais d'amplification, avec un succès de 100%, laissent espérer que le nombre de locus effectivement utilisables en routine ne sera pas très éloigné de 20. Avec les résultats déjà obtenus (Naciri *et al.*, 1995), on peut espérer avoir entre 20 et 30 microsatellites polymorphes utilisables. Il est alors tout à fait envisageable d'utiliser ces marqueurs pour la réalisation d'un début de carte de liaison du génome d'*Ostrea edulis*, sachant que celle-ci n'a que 10 chromosomes ($2N=20$).

IV.1.B.2. Production des familles nécessaires au programme de sélection , à la cartographie et à la mise en évidence d'un marqueur de résistance.

Avec une technique de croisement utilisée pour la première fois à grande échelle (maturation par couple en aquarium), la production des familles a été très satisfaisante. Toutes les familles envisagées pour la poursuite du programme de sélection ont été produites. Les familles F1 (Lignée sélectionnée x Témoin) et F2, nécessaires aussi bien à la cartographie qu'à la recherche d'un marqueur de résistance, sont en élevage à La Tremblade. Notons que les familles F2 produites en 1996 l'ont été à partir d'animaux qui n'avaient pas un an.

IV.1.B.3. Inoculations

Grâce à l'aide précieuse de l'équipe de l'URPIG, 3300 animaux ont été inoculés après purification du parasite à partir d'huîtres infectées (maintenues expérimentalement par l'URPIG dans la salle de quarantaine du GAP). Ces inoculations concernent aussi bien les familles du programme de sélection, en vue d'une comparaison des performances de résistance, que les famille F2, en vue de l'éventuelle mise en évidence d'un marqueur de la résistance. C'est la première fois qu'un aussi grand nombre d'animaux est inoculé pour une même expérience. Dans les années précédentes, seules quelques centaines d'animaux avaient été inoculés pour le programme de sélection.

IV.1.B.4. Participation à des colloques.

Les premiers résultats du programme de sélection ont été présentés sous forme de poster au XVIIème Colloque de Biologie et Génétique des Populations.

(Naciri Y., Launey S., Martin A.-G., Baud J.-P., Cochenec N. et Gérard A., 1995. Sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* pour une résistance à *Bonamia ostreae*. Poster, XVIIème Colloque de Biologie et Génétique des Populations, Lyon, 26-28 août 1995)

Les résultats du clonage de marqueurs microsatellites ont fait l'objet d'une présentation orale à la deuxième journée "Microsatellites et Génétique des Populations",

(Launey S., 1995. Utilisation des marqueurs microsatellites dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique chez un mollusque bivalve, l'huître plate *Ostrea edulis*. Communication orale, 2ème journée "Microsatellites et Génétique des Populations, Montpellier, 18 décembre 1995).

IV.2. OBJECTIFS POUR 1996-1997

IV.2.A. Variabilité génétique dans les populations sélectionnées

Les géniteurs témoins, potentiellement les plus variables, seront étudiés en premier afin d'estimer le polymorphisme des microsatellites. Tous les microsatellites disponibles seront testés.

Puis le polymorphisme microsatellitaire sera étudié sur l'ensemble des géniteurs utilisés en 1995. Une dizaine de marqueurs au maximum devraient être suffisant pour évaluer la variabilité génétique dans les populations (nombre d'allèle et hétérozygotie). Si le temps le permet, le polymorphisme enzymatique sera également étudié.

IV.2.B. Etude de familles

Quelques familles produites en 1995 seront étudiées pour vérifier la transmission mendélienne des marqueurs microsatellites, ainsi que pour détecter d'éventuelles distorsions de ségrégations.

IV.2.C.Cartographie de liaison

Cette étape consistera à étudier les ségrégations alléliques sur les familles F1 et la famille F2 produites en 1995. L'intégralité des marqueurs disponibles sera utilisée.

IV.2.D.Recherche d'un marqueur de résistance

A l'automne 1996, un bilan sera effectué sur les résultats d'inoculation des familles F1 et F2. Il s'agira de déterminer les individus sensibles à la bonamiose (ceux morts au cours de l'expérience et dont le frottis cardiaque a révélé la présence de *Bonamia ostreae*) et ceux qui sont résistants. Des lots d'ADN seront alors constitués et testés avec l'intégralité des marqueurs disponibles.

IV.2.E.Estimation des performances des populations sélectionnées

IV.2.E.1.Résistance

A l'automne 1996, un bilan sera effectué sur l'inoculation des familles, après abattage et frottis cardiaque de tous les individus survivants.

IV.2.E.2.Croissance

L'expérience mise en place à la station de Bouin avec les familles du programme de sélection permettra, après un suivi régulier pendant tout l'été, d'évaluer certains paramètres génétiques de la croissance chez l'huître plate, en particulier l'héritabilité.

IV.2.F.Communications

Les résultats qui seront obtenus au cours du printemps sur la variabilité génétique dans les populations sélectionnées feront l'objet d'une communication orale au cours du XVIIIème Colloque de Biologie et Génétique des Populations (Grenoble, août 1996).

La publication de deux articles est envisagée avant la fin de l'année 1996: un article sur les résultats de clonage de microsatellites, une fois acquises quelques données sur le polymorphisme de ces marqueurs, et un article sur l'évaluation de la variabilité génétique dans les populations sélectionnées.

V.BIBLIOGRAPHIE

- Arnheim N., White T. & Rainey W.E., 1990. Application of PCR: organismal and population biology. *BioScience*, 40(3):174-181.
- Beckmann J.S. & Weber J.L., 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12:627-631.
- Bell J. & Ecker J.R., 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*, 19:137-144.
- Cochennec N., T. Renault, B. Chollet & P. Maffart, 1995. Comparison of haemograms from resistant and susceptible European flat oysters *Ostrea edulis* exposed to the parasite *Bonamia ostreae*. Seventh International Conference on *Disease of fish and shellfish*, Europ. Assoc. Fish Pathol., Palma de Mallorca, 10-15 Sept. 1995.
- Condit R. & Hubble S.P., 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34:66-71.
- Cornall R.J., Aitman T.J., Hearne C.M. & Todd J.A., 1991. The generation of a library of PCR-analyzed microsatellites variants for genetic mapping of the mouse genome. *Genomics*, 10:874-881.
- Dallas J.F., 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome*, 3:452-456.
- Ellegren H., Jahansson M., Sandberg K. & Andersson L., 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genetics*, 23:133-142.
- Estoup A., Solignac M., Harry M. & Cornuet J.-M., 1993a. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21:1427-1431.
- Estoup A., Presa P., Krieg F., Vaiman D. & Guyomard R., 1993b. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71:488-496.
- Ford S.E. & Haskin H.H., 1987. Infection and mortality patterns in strain of oysters *Crassostrea virginica* selected for resistance to the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX). *Journal of Parasitology*, 73:368-376.
- Fries R., Eggen A. & Stranzinger G., 1990. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, 8:1-3.
- Gellin J. & Chevalet, C., 1994. Stratégie d'établissement des cartes géniques. Exemple du porc. *Genetics, Selection, Evolution*, 26(1):35s-51s.
- Groupe MMM, 1994. Méthodes mathématiques pour l'étude des gènes contrôlant des caractères quantitatifs., *Genetics, Selection, Evolution*, 26(1):9s-20s.
- Haskin H.H. & Ford S.E., 1979. Development of resistance to *Milchinia nelsoni* (MSX^o) mortality in laboratory-reared and native oyster stocks in Delaware Bay. *Marine Fisheries Review*, 41:54-63.
- Haskin H.H., Stauber L.A. & Mackin J.A., 1966. *Minchinia nelsoni* sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae): causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic. *Science*, 153:1414-1416.

- Hazan J., Dubay C., Pankowiak M.P., Becuwe N., & Weissenbach J., 1992. A genetic linkage map of human chromosome 20 composed entirely of microsatellite markers. *Genomics*, 12:183-189.
- Hearne C.M., McAleer M.A., Love J.M., Aitman T.J., Cornall R.J., Ghosh S., Knight A.M., Prins J.-B. & Todd J.A., 1991. Additional microsatellite markers for mouse genome mapping. *Mammalian Genome*, 1:273-282.
- Hearne C.M., Ghosh S. & Todd J.A., 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, 8(8):288-294.
- Hervio D., 1992. Contribution à l'étude de *Bonamia ostreae* (*Asceptospora*), protozoaire parasite de l'huître *Ostrea edulis* (*Bivalvia*), et à l'analyse des interactions hôte-parasite. Thèse de l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand, 170 p.
- Hinegardner R., 1974. Cellular DNA contents of Mollusca. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47A:447-460.
- Horn G.T., Richards B. & Klinger K.W., 1989. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 17:2140.
- Jarne P., Viard F., Delay B. & Cuny G., 1994. Variable microsatellites in the highly selfing snail *Bulinus truncatus* (Basommatophora: Planorbidae). *Molecular Ecology*, 3:527-528.
- Jeffreys A.J., Royle N.J., Wilson V. & Wong Z., 1988. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*, 332:278-281.
- Karagyozov L., Kalcheva I.D. & Chapman V.M., 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research*, 21(16):3911-3912.
- Karl S. & Avise J.C., 1992. Balancing selection at allozyme loci in Oysters : Implications from nuclear RFLPs. *Science*, 256:100-102.
- Karl S. & Avise J.C., 1993. PCR-based assays of mendelian polymorphisms from Anonymous Single-Copy Nuclear DNA. Techniques and applications for population genetics. *Molecular Biology and Evolution*, 10(2):342-361.
- Lagercrantz U., Ellegren H. & Andersson L., 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 21:1111-1115.
- Litt M. & Luty J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44:397-401.
- Love J.M., Knight A.M., McAleer M.A. & Todd J.A., 1990. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 18:4123-4130.
- Martin A.G., Gérard A., Cochenec N. & Langlade A. 1993. Selecting flat oysters, *Ostrea edulis*, for survival against the parasite *Bonamia ostreae* : assessment of the resistance of a first selected generation. p. 545-554. In : Production, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture 92. G. Barnabé and P. Kestemont (Eds). E.A.S. Special Publication No. 18. Gent, Belgium.

- Mialhe E., Bachère E., Chagot D. & Grizel H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae*, a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 71:293-299.
- Michelmore R.W., Paran I. & Kesseli R.V., 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis : A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88:9828-9832.
- Montagutelli X., Serikawa T. & Guénet J.-L., 1991. PCR-analysed microsatellites : data concerning laboratory and wild-derived mouse inbred strains. *Mammalian Genome*, 1:255-259.
- Morgante M. & Olivieri A.M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 1:175-182.
- Naciri Y., Vigouroux Y., Dallas J., Desmarais E., Delsert C. & Bonhomme F., 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4(1):83-89.
- Naciri-Graven Y., Martin A.-G., Baud J.P., Renault T. & Gérard A. Selecting flat oyster *Ostrea edulis* for survival against the parasite *Bonamia ostreae*. Soumis à *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- Panaud O., Chen X. and McCouch S.R., 1995. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 35:1170-1176.
- Pichot Y., Comps M., Tigé G., Grizel H. et Rabouin M.-A., 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae* Gen. n., sp n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des travaux de l'institut des Pêches Maritimes*, 43(1):131-140.
- Rassman K., Schlötterer C. & Tautz D., 1991. Isolation of simple-sequence loci for use in Polymerase Chain Reaction-base DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12:113-118.
- Rothuizen J., Wolfswinkel J., Lenstra J.A. & Frants R.R., 1994. the incidence of mini- and micro-satellite repetitive DNA in the canine genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 89:403-406.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (eds.), 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 77:5463-5467.
- Saavedra C., Zapata C., Guerra A. & Alvarez G., 1993. Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 115:85-95.
- Slettan A., Olsaker I. & Lie O., 1993. Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitive sequences from atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genetics*, 24:195-197.
- Stallings R.L., Ford A.F., Nelson D., Torney D.C., Hildebrand C.E. and Moysis R.K., 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 10:807-815.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17:6463-6471.

- Thorén P.A., Paxton R.J. & Estoup A., 1995. Unusually high frequency of (CT)_n and (GT)_n microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L.) (Hymenoptera: vespidae). *Insect Molecular Biology*, 4(3):141-148.
- Todd J.A., 1992. La carte des microsatellites est arrivée! *Human Molecular Genetics*, 1:663-66.
- Vigouroux Y., 1994. Relation hétérozygotie croissance chez l'huître plate (*Ostrea edulis* L.). Marqueurs protéiques et microsatellites. Rapport de DEA Evolution et Ecologie, USTL Montpellier II. 25pp.
- Vrijenhoek R.C., Ford S.E. & Haskin H.H., 1990. Maintenance of heterozygosity during selective breeding of oysters for resistance to MSX disease. *Journal of Heredity*, 81:418-423.
- Walsh P.S., Metzger D.A. & Higuchi R., 1991. Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing of forensic material. *BioTechniques*, 10:506-513.
- Weber J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7:524-530.
- Weber J.L. & May P.E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44:388-396.
- Weissenbach J., Gyapay G., Dib C., Vignal A., Morissette J., Millasseau P., Vaysseix G. and Lathrop M., 1992. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, 359:794-801.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A. & Tingey S.V., 1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 18(51) : 704-740.
- Wintero A.K., Fredholm M. & Thomsen P.D., 1992. Variable (dG-dT).(dC-dA) sequences in the porcine genome. *Genomics*, 12:281-288.
- Wu K.-S. & Tanksley S.D., 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping in rice. *Molecular and General Genetics*, 241:225-235.

VI. CALENDRIER INITIAL

Novembre-Décembre 1994 : Une analyse bibliographique poussée sera effectuée prioritairement. Elle portera sur des aspects à la fois techniques et théoriques et concernera les techniques utilisées : microsattellites, MASC, méthodes de cartographie génomique en général, QTL (théorie et domaines d'application), analyse des séries temporelles, plans d'expérience...

L'identification de marqueurs microsattellites est actuellement en cours dans le cadre d'une coopération entre l'IFREMER-URGE et le Laboratoire Génome et Populations de François Bonhomme à Montpellier. Une quinzaine de microsattellites supposés sont actuellement en phase de séquençage. Des amorces ont été définies pour 4 d'entre eux, d'ores et déjà utilisés en routine (Vigouroux, 1994; Naciri *et al.*, 1995). Une fois les clones restant étudiés, un criblage supplémentaire sur banque enrichie (Karagyozov *et al.*, 1993) sera éventuellement nécessaire pour obtenir un nombre plus élevé de marqueurs. Dans le cas des MASC, la technique n'a pas été éprouvée au laboratoire et nécessitera donc des mises au point plus poussées. L'utilisation d'amorces mises au point sur d'autres mollusques marins sera également tentée. Pour ces deux aspects, des collaborations avec François Bonhomme (CNRS-URA 1493) et Claude Delsert (Laboratoire URGE) sont envisagées.

Un séjour au Laboratoire Génome et Population (CNRS-URA 1493) à Sète sera effectué pour poursuivre l'exploitation de la première banque génomique.

Printemps-Eté 1995 : En 1995, les expérimentations porteront sur trois points principaux :

- 1- Production de générations F2 issues des F1 produites en 93. (F1 entre huîtres résistantes et sensibles). Une stratégie similaire à celle utilisée sur les animaux domestiques sera mise en place (Gellin & Chevallet, 1994). Ces familles seront analysées par la technique de la BSA (Bulked Segregant Analysis; Michelmore *et al.*, 1991), qui permet l'identification rapide de marqueurs liés à une région particulière du génome.
- 2- Aide à la production des nouvelles générations de sélection : 3^{ème} génération pour la population 85, 2^{de} génération pour la population 89 et intercroisement des deux populations.
- 3- Poursuite de la mise au point des marqueurs.
- 4- Evaluation de la variabilité présente dans les populations sélectionnées existantes par rapport à des témoins issus du milieu naturel, cela sur les différentes générations disponibles.
- 5-Automne: Séjour au Laboratoire Génome et Population (Sète) dans le cadre de l'URM N°16 GENEMAR pour réalisation d'une nouvelle banque génomique et recherche de nouveaux marqueurs (microsattellites et éventuellement MASC).
- 6-Inoculation des populations F2 en Novembre. Suivi jusqu'en Juillet 96.

Année 1996 :

1-Suivis en conditions contrôlées des nouvelles générations de sélection produites en 95 : 3^{ème} génération pour la population 85, 2^{de} génération pour la population 89 et intercroisement des deux populations. Cela supposera deux types de suivis : en salle de quarantaine après inoculation en Janvier (IFREMER-URGE) et en élevage semi-intensif en milieu contrôlé pour le suivi des caractères quantitatifs de Mai à Novembre au moins (Station IFREMER de Bouin). L'analyse par marqueurs se fera sur les individus préalablement à leur mise en expérimentation dans les deux sites.

2-Développement des techniques d'hybridation *in situ* (FISH, PCR *in situ*). Une collaboration est envisagée sur ce point avec le Pr Noel Wilkins (University College of Galway, Irlande) dans le cadre d'un contrat CEE AIR 4.

Année 1997 : Analyse des résultats et rédaction.

1- L'analyse des résultats portera sur les aspects suivants :

- * Polymorphisme des populations sélectionnées par rapport à des témoins issus du milieu naturel.

- * Performances de croissance et de résistance des nouvelles générations de sélection.

- * "Hétérosis" du croisement entre les deux populations sélectionnées (comparaison des performances des descendants du croisement P85 x P89 et les descendants intrapopulations).

- * Début de cartographie du génome. Recherche de marqueurs éventuels de résistance dans les populations F2. Cette partie du travail dépendra du nombre de marqueurs mis en évidence, et de la possibilité de pouvoir caractériser avec précision les individus résistants et sensibles.

2- Rédaction : Cette dernière partie nécessitera un investissement important en techniques statistiques d'analyse de données.