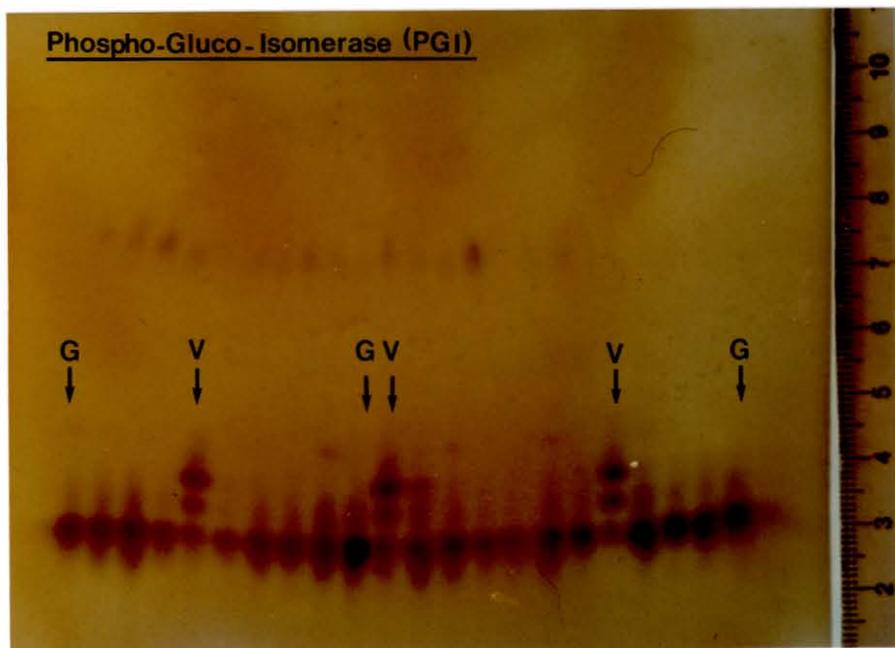


LYCEE DE LA VALLEE DE CHEVREUSE

BTS BIOTECHNOLOGIE

Rapport de Stage

MISE AU POINT DE TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES



Karine HOUDUSSE
Janvier-Février 1993

Maîtres de stage : André GERARD
Yamama NACIRI

Unité de Recherche en Génétique et Eclosionerie
BP 133, Ronce les Bains
17 390 La Tremblade



MISE AU POINT DE TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES.

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER.

Station de la Tremblade.

Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins,
Unité de recherche en Génétique et Eclosion (URGE)

Sous la direction
de : A. GERARD
et de : Y. NACIRI

AVANT PROPOS.

Je tiens à remercier André GERARD, mon maître de stage, qui m'a montré ce que signifie la gestion d'une unité de recherche appliquée, son poids et le temps que l'on doit lui consacrer.

Je remercie également Yamama NACIRI qui a su me conseiller et me guider lors des manipulations et dont l'aide a été très précieuse pour l'élaboration de ce présent rapport.

Je remercie aussi Jean-Marie PEIGNON qui a su être disponible ; Pascal PHELIPOT pour qui aider les autres est une seconde nature ; Christophe LEDU dont le "kouign Amann" fait des ravages ; ainsi que Rose-Marie pour ses renseignements sur l'électrophorèse.

Et enfin Yvette SIMIAN, Martine GRASSET et Ginette CAILLETEAU pour leur bonne humeur.

Et je remercie mon père pour son soutien.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
1ère PARTIE : STRUCTURES ET ORGANISATION	4
1. L'IFREMER	4
1.1 Missions et objectifs de l'IFREMER.....	4
1.2 Organisation de l'IFREMER.	5
2. Station de La Tremblade	6
2.1 Le contexte socio-économique.....	6
2.2 Ses différentes unités.....	7
2.3 Objectifs du LABELIM	7
3. Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE).....	8
3.1. Objectifs et programmes.	8
3.2. Le réseau génétique.	8
3.3. Moyens et effectifs.	9
3.3.1 Infrastructures.....	9
3.3.2.Matériel.....	10
3.3.3.Personnel.....	10
3.3.4.Budget.	10
2ème partie : ELECTROPHORESE DE PROTEINES CHEZ TROIS MOLLUSQUES BIVALVES : CRASSOSTREA GIGAS, CRASSOSTREA VIRGINICA ET OSTREA EDULIS.	13
1. introduction.	13
2. L'électrophorèse enzymatique.....	13
2.1 Principe général.	13
2.2 Avantages et inconvénients de l'électrophorèse enzymatique.....	16
3. Matériel et méthodes.	17
3.1 Matériel utilisé.	17
3.1.1 Crassostrea gigas.....	17

3.1.2. <i>Crassostrea virginica</i>	17
3.1.3 <i>Ostrea edulis</i>	18
3.2 Méthodes.....	18
3.2.1 Prélèvement des tissus.....	18
3.2.2 Préparation de l'extrait.....	18
3.2.3 Préparation du gel.	19
3.2.4 Coulage du gel.	19
3.2.5 Electrophorèse.....	19
3.2.6 La révélation.	20
3.2.7 Conservation des gels.	21
3.3 Gels effectués.	21
4. RESULTATS OBTENUS.....	23
4.1 Mise en place des protocoles.....	23
4.1.1 Amélioration des techniques.....	23
4.1.2 Systèmes enzymatiques pour lesquels des révélations sont obtenues.	23
4.1.3 Systèmes enzymatiques discriminant les différentes espèces.	24
4.2 Caractérisation d'espèces.....	24
4.2.1 Comparaison entre <i>C. gigas</i> et <i>C. virginica</i>	25
4.2.2 Comparaison entre <i>C. gigas</i> , <i>C. virginica</i> et <i>O. edulis</i>	26
4.3 Reconnaissance d'hybrides	27
5. PERSPECTIVES.....	28
CONCLUSION GENERALE.	29
BIBLIOGRAPHIE	
GLOSSAIRE	
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES, PLANCHES-PHOTO ET ANNEXES.

Figure I : Organigramme de l'IFREMER.

Figure II : Sites d'implantation de l'IFREMER.

Figure III : Le Bassin de Marennes-Oléron en chiffres.

Planche I : Espèces étudiées à l'URGE

Planche II : Salles de l'écloserie.

Planche III : Caractérisation des espèces *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*.

Planche IV : Reconnaissance d'hybrides entre *Crassostrea gigas* et *Crassostrea virginica*.

Annexe I : Analyse génétique d'un zymogramme.

Annexe II : Fixateur standard, tampons d'extraction et de révélation.

Annexe III : Tampons de gel et de migration.

Annexe IV : Systèmes de révélation.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Si les recherches réalisées par l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER (IFREMER) ont pour finalité première de provoquer des avancées scientifiques significatives, l'établissement a également pour vocation de valoriser auprès des secteurs économiques de son environnement direct, des résultats et des outils propres à leur permettre d'améliorer leur compétitivité. C'est dans ce cadre que s'organise la politique industrielle et que se nouent les relations avec les professionnels de la conchyliculture de la région Poitou-Charentes.

La station IFREMER de La Tremblade se situe dans cette même région Poitou-Charentes qui est au premier rang des régions françaises pour l'aquaculture et la conchyliculture. Elle est implantée dans le bassin de Marennes-Oléron (Département de la Charente Maritime). Dans ce département, la conchyliculture occupe la première place du secteur primaire, tant par le chiffre d'affaire dégagé que par le nombre d'emplois que génère cette activité. C'est dire l'importance des recherches dans ce domaine et l'impact potentiel que peuvent avoir des transferts de technologies vers les entreprises.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail de l'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE), qui tente par le biais de différents programmes de recherche, d'améliorer la qualité des produits, de sélectionner des souches plus performantes, d'introduire de nouvelles espèces....

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent rapport qui reflète un des aspects des recherches menées par l'URGE :

- la mise au point de protocoles pour la recherche de marqueurs par électrophorèse enzymatique,
- leur application à la caractérisation d'espèces et à la reconnaissance d'hybrides interspécifiques.

PREMIERE PARTIE

1ère PARTIE : STRUCTURES ET ORGANISATION.

1. L'IFREMER

"Sous la mer vous cherchez le passé, vous allez découvrir le futur."

Jean COCTEAU.

1.1 Missions et objectifs de l'IFREMER

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) a reçu de multiples missions par le texte fondateur de l'Institut (décret du 5 juin 1984). Il est le seul organisme de recherche français dont la vocation est exclusivement maritime.

L'IFREMER est ainsi :

1. un organisme de recherche menant des actions propres dans le domaine des connaissances de bases et des technologies qui leur sont associées,
2. une agence d'objectifs qui, en s'appuyant sur ses propres laboratoires, stimule l'action des autres acteurs de la recherche nationale,
3. une agence de moyens qui a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en oeuvre de la flotte océanographique française,
4. l'IFREMER assure également une mission de service public : suivi des ressources, protection de l'environnement, contrôle de la qualité des eaux,
5. enfin en tant qu'EPIC (Etablissement Public à caractères Industriel et Commercial), l'IFREMER a mission de valoriser le résultat de ses travaux dans les entreprises, et de mobiliser ses compétences pour renforcer la compétitivité des entreprises françaises du secteur maritime.

Dans le cadre de ces missions, l'IFREMER s'est donné 5 objectifs prioritaires de recherche pour lesquels un effort financier important a été consenti dès 1990. Chaque objectif est sous la responsabilité d'un Directeur qui assure une fonction consultative et de conseil pour les domaines concernés.

Le premier objectif correspond à la valorisation des substances marines ainsi que des biotechnologies associées. Les principaux thèmes abordés sont la prévention, le contrôle, l'amélioration des cheptels et enfin la valorisation des organismes et produits de la mer.

Le second objectif concerne la connaissance de l'environnement et l'aménagement du littoral. Leur maîtrise est indispensable à la recherche maritime associée aux producteurs, d'où des études axées sur : le flux, l'évolution des écosystèmes marins, les eaux, les micro-organismes et l'économie de l'environnement.

Le troisième objectif correspond au programme Géosphère-Biosphère pour lequel les études ne portent pas sur des zones géographiques limitées (bassins ostréicoles par exemple) mais sur l'ensemble de l'écosystème planétaire : c'est à l'échelle de la planète que l'environnement et son évolution sont étudiés.

Le quatrième objectif regroupe les actions de l'Institut en matière d'océanographie. Cet aspect recouvre le renouvellement de la flotte océanographique ainsi que la programmation et le fonctionnement nécessaire aux expéditions.

Le dernier objectif concerne les études juridiques et socio-économiques liées à l'activité maritime.

1.2 Organisation de l'IFREMER.

l'IFREMER est divisé en 6 directions. Les 3 premières sont sous la responsabilité directe du P.D.G. Pierre PAPON. Il s'agit de la **Direction Scientifique (DS)**, des **Directions Opérationnelles** (au nombre de 5) et de la **Direction des Relations et de la Coopération Internationales (DRCI)**.

Les autres directions sont sous la responsabilité du **Directeur Général Délégué**, Madame Françoise BOUZITAT. Il s'agit, d'une part, de la **Direction des Relations Sociales**, de la **Direction de la Politique Industrielle**, de la **Valorisation** et de la **Commercialisation** et, d'autre part de la Direction rassemblant les services administratifs et financiers, les services du plan, de la programmation et du budget, et les services des affaires juridiques et logistiques.

Ces différentes Directions sont représentées dans l'organigramme de l'IFREMER, (figure.I.)

L'IFREMER c'est aussi environ 1200 ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs qui participent aux multiples missions de l'établissement.

Ce personnel travaille dans 5 centres (Boulogne-sur-mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti), 23 stations ou délégations réparties le long du littoral français ou Outre-mer et dans son nouveau siège social à Issy-les-Moulineaux (Figure II).

Les cinq Directions Opérationnelles ont chacune la responsabilité d'un secteur d'activité. La station de La Tremblade dépend de la Direction des Ressources Vivantes (DRV), ainsi que de la Direction de l'Environnement Littoral (DEL).

Les trois autres directions sont : la Direction des Recherches Océaniques (DRO), la Direction de l'Ingénierie de la Technologie et de l'Informatique (DITI) et la Direction des Opérations et Moyens Navals (DOMN).

2. STATION DE LA TREMBLADE

2.1 Le contexte socio-économique.

La région Poitou-Charentes, qui se situe au premier rang des Régions Françaises pour la conchyliculture, attache d'une manière générale la plus grande importance aux activités liées à la mer. Un exemple est représentatif, celui du bassin de Marennes-Oléron, qui commercialise 45% des huîtres creuses consommées en France, soit, de 45000 à 60000 tonnes selon les années. Les huîtres qui y sont récoltées constituent un véritable "cru", Marennes-Oléron est le seul bassin ostréicole français ayant labelisé ses produits.

Dans ce bassin la conchyliculture représente 6000 hectares de parcs et de claires qui sont gérés par 2000 exploitants.

En 1991, les français ont dégusté 800 millions d'huîtres Marennes-Oléron et ainsi dépensé 1 milliard de francs.

La conchyliculture et les activités qui en découlent sont donc primordiales dans l'économie de la région de Marennes-Oléron, dont la situation économique actuelle est résumée dans la Figure III, "Le bassin en chiffres" (document de la Section Régionale Conchylicole de Marennes-Oléron).

Mais les activités liées à la conchyliculture peuvent encore se développer, car la Région est riche de son capital humain et des espaces nouveaux peuvent être aménagés à leur intention. Elles ne sont pas cependant à l'abri des difficultés de toutes sortes (aléas économiques et climatiques, épizooties ...).

Conscients de ces enjeux, la Région Poitou-Charentes et l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER (IFREMER), ont signé le 7 février 1985, dans le cadre du contrat de Plan Etat-Région, une convention de coopération. Cette convention a été renouvelée pour le plan Etat-Région 1988-1993.

l'IFREMER a pu ainsi accroître son potentiel de recherche dans la région. Les infrastructures ont été renforcées et, un certain nombre de programmes de recherches intéressant directement les activités maritimes de la région, ont pu être menés à bien.

2.2 Ses différentes unités.

Créé en octobre 1990, le Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins (LBEIM), placé sous la responsabilité de Maurice HERAL, comporte quatre unités de recherche

- l'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (UREA), sous la responsabilité de Maurice HERAL,
- l'Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA), sous la responsabilité d'Alain BODOY,
- l'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale (URPIG), sous la responsabilité de Tristan RENAULT. Cette Unité a été créée en Octobre 1992 pour remplacer l'URPIGM qui a rejoint Montpellier dans le cadre d'une unité mixte de recherche IFREMER/CNRS,
- l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion (URGE), sous la responsabilité d'André GERARD.

2.3 Objectifs du LBEIM

Les objectifs du LBEIM s'inscrivent dans les thèmes déclarés prioritaires par l'IFREMER. Il s'agit par exemple de l'étude de l'évolution du domaine littoral et de l'impact de la qualité des eaux sur la conchyliculture (UREA). Le thème concernant la valorisation des produits de la pêche et de l'aquaculture est abordé par l'URGE par le biais de la production de souches plus performantes et plus résistantes aux pathogènes. L'URRA participe à quelques-uns de ces derniers programmes et assure également une fonction d'institut technique fournissant études et conseils aux administrations et collectivités locales. L'URPIG contribue à l'apport en connaissances fondamentales dans les domaines de la pathologie, de l'histopathologie, de l'épidémiologie et de l'immunologie des mollusques et assure, en cas d'épizootie, la reconnaissance des pathogènes qui en sont responsables.



Le bassin en chiffres

6 000 hectares de parcs et de Claires
et 2 000 exploitations.

■ Superficies concédées sur le Domaine Public Maritime

a) parcs à huîtres	2 897 ha
b) bouchots	95 km
total (10 m ² = 1 are)	2 992 ha
nombre d'exploitations conchylicoles env.	2 000
superficie moyenne des exploitations	1,6 ha
superficie des Claires sur domaine privé	2 000 ha
répartition géographique des concessionnaires de parcs	
. rive gauche de la Seudre	27 %
. rive droite de la Seudre et Charente	39 %
. Oléron	29 %
. autres	5 %

En 1991, les français ont dégusté 800 millions de Marennes-Oléron et dépensé 1 milliard de francs.

■ Répartition des établissements (chiffres approchés)

800 établissements d'expédition
1 100 établissements d'élevage

Ventes d'étiquettes professionnelles :

. huîtres	6 579 100
. moules	194 000

■ Chiffre d'affaires (1990): 1 milliard de francs

Les prix en 1991

. à l'élevage	12 F/kg
. à l'expédition	
- Fines de Claires, le colis standard	260 F
- Spéciales de Claires, le colis standard	340 F

(le colis standard, d'un poids de 13 à 14 kg comprend 200 huîtres M3 ou 250 M4, ou 300 P5)



Photo: J-P. B.

Situation sociale

Les gars de la côte et les femmes de cabanes

■ Répartition des concessionnaires de parcs par âge

. de 18 à 35 ans	22 %
. de 35 à 55 ans	50 %
. + de 55 ans	28 %

■ Les salariés de la conchyliculture

. Ouvriers permanents	
a) inscrits maritimes	761
b) inscrits Mutualité Sociale Agricole	518

total 1279
. Ouvriers saisonniers : le travail saisonnier concerne environ 1500 personnes, dont le temps de travail va de quelques semaines à plusieurs mois

3. UNITE DE RECHERCHE EN GENETIQUE ET ECLOSERIE (URGE).

3.1. Objectifs et programmes.

Le développement des recherches dans le domaine de la génétique quantitative et de la cytogénétique des mollusques bivalves vise surtout l'obtention de méthodes et de produits présentant des caractéristiques intéressantes pour la profession conchylicole. L'objectif au niveau socio-économique est de contribuer à l'émergence de nouveaux pôles productifs créateurs ou stabilisateurs d'emplois. Les principaux thèmes au niveau scientifique sont :

- l'obtention de souches résistantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent régulièrement en cause la conchyliculture,
- la création de lignées ou de souches présentant de meilleures performances de croissance et de qualité de chair pour valoriser et promouvoir les activités conchylicoles,
- l'acclimatation de nouvelles espèces et l'hybridation pour limiter les risques liés à la monoculture,
- la recherche de marqueurs génétiques (caractères de coloration, marqueurs électrophorétiques...).

L'URGE travaille, dans le cadre de ces différents axes de recherches, sur 5 espèces de mollusques bivalves : l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*, l'huître creuse américaine *Crassostrea virginica*, l'huître plate *Ostrea edulis*, la palourde européenne, *Ruditapes decussatus* et la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* (planche Photo I).

3.2. Le réseau génétique.

La mise en place de ce réseau a été une des principales activités de l'URGE en 1991 et 1992, le but étant de créer un tissu de laboratoires pluridisciplinaires qui permette de répondre correctement aux objectifs annoncés dans les cahiers d'objectifs.

Au niveau national, ce réseau est organisé autour de deux cellules:

PLANCHE-PHOTO I.

ESPECES ETUDIEES A L'URGE

Photo 1 : *Crassostrea gigas*.

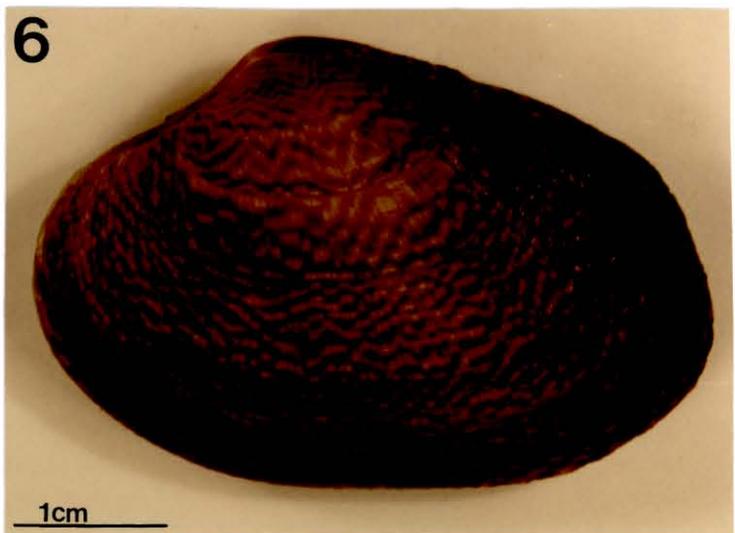
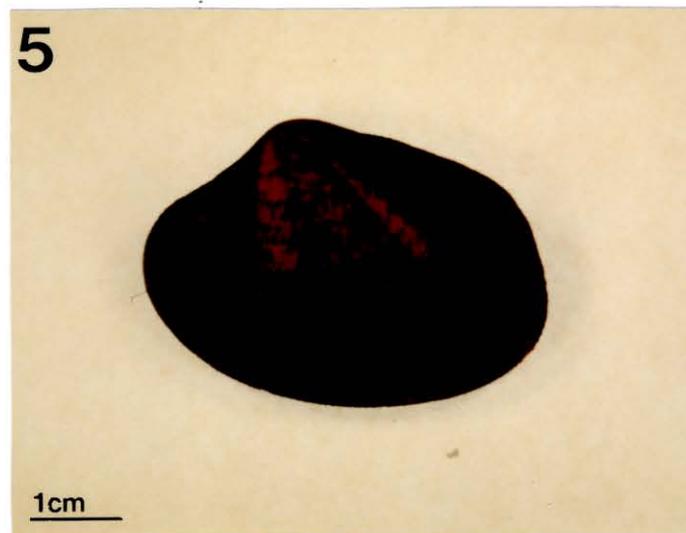
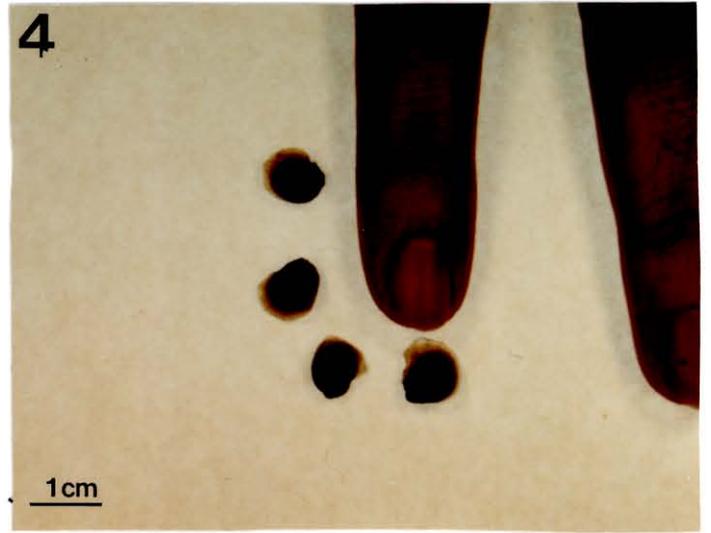
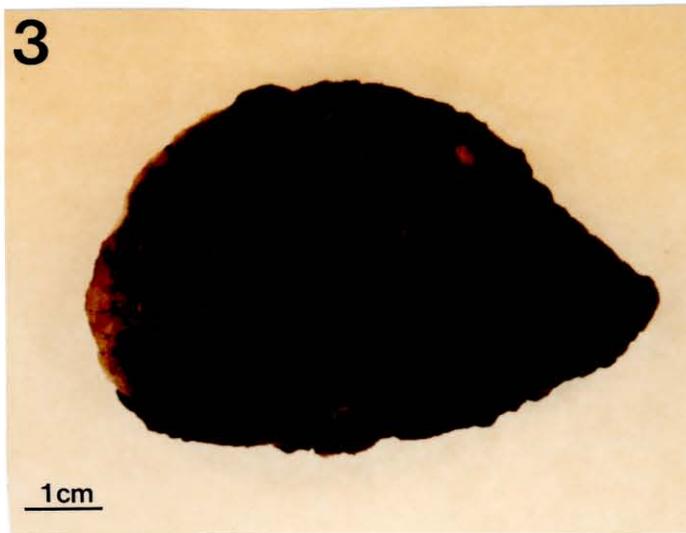
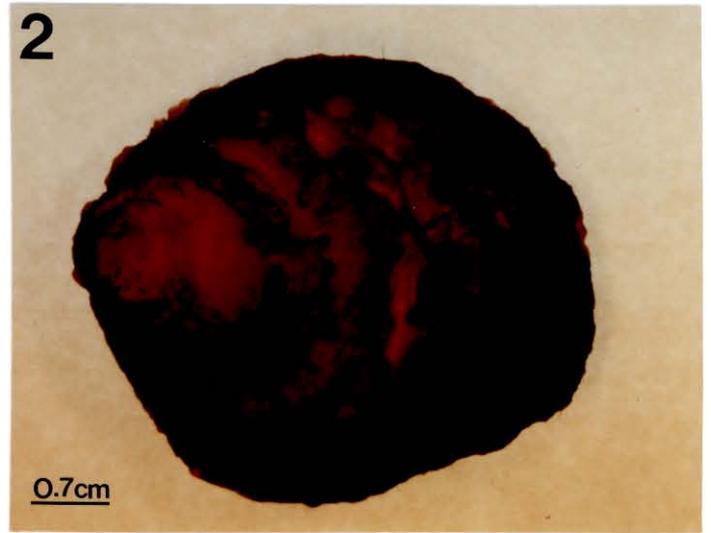
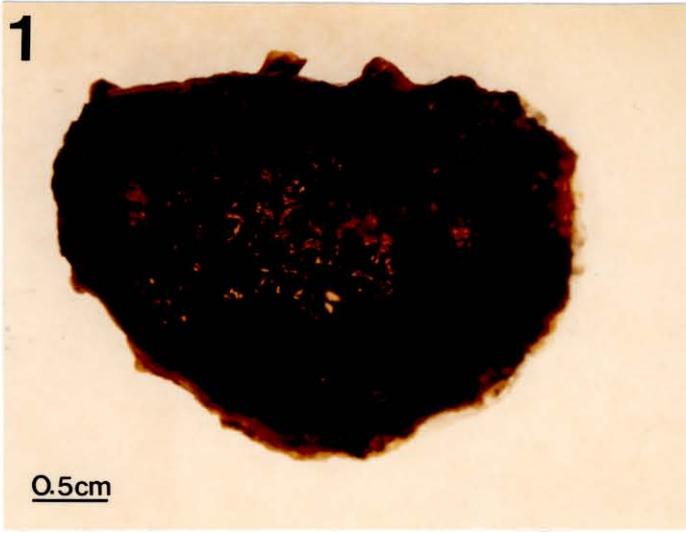
Photo 2 : *Ostrea edulis*.

Photo 3 : *Crassostrea virginica*.

Photo 4 : *Crassostrea virginica*.

Photo 5 : *Ruditapes decussatus*.

Photo 6 : *Ruditapes philippinarum*.



- une cellule de base comprenant l'écloserie de la Tremblade, la nurserie de Bouin, et les claires expérimentales de Bouin et de la Tremblade (URGE et URRRA). Cette cellule assure l'élaboration des principaux plans d'expérience, la production de toutes souches ou lignées, et le contrôle des performances biologiques dans des conditions de milieu d'élevage et de traitements zootechniques aussi homogènes que possible,
- une cellule plus spécialisée dans le contrôle des performances biologiques incluant la participation, d'une part de tous les laboratoires régionaux, pour tester la variabilité des performances en fonction des conditions de milieu, et d'autre part de laboratoires d'IFREMER, du CNRS ou d'Universités pour des études précises en physiologie, histologie de la reproduction, immunologie...

3.3. Moyens et effectifs.

3.3.1 Infrastructures.

L'URGE assure la gestion de l'outil écloserie de la Tremblade (planche Photo II). Ce bâtiment de 1200 m², est principalement constitué de :

- 6 salles humides (Quarantaine, Micronurserie, Maturation, Conservatoires de souches, Elevages larvaires, Physiologie),
- 2 salles de production de phytoplancton et une laverie,
- 1 laboratoire,
- 1 salle informatique,
- 1 laboratoire de physiologie,
- 7 annexes techniques (local des pompes, local du bromodoseur, local des compresseurs et des commandes électriques, chaufferie, groupe électrogène, garage, atelier).

A cette gestion de bâtiment, il faut encore ajouter tout le circuit hydraulique qui se compose de :

- 4 bassins de 300 m³ en réserve d'eau de mer,
- 22 pompes de 10 à 300 m³/h,
- plusieurs kilomètres de tuyauterie,
- 1 station de stérilisation des eaux de rejet.

PLANCHE-PHOTO II.

SALLES DE L'ECLOSERIE.

Photo 1 : Salle de maturation.

Photo 2 : Salle d'informatique.



3.3.2. Matériel

Le matériel scientifique principal est constitué de :

- 1 microscope BHTU Olympus,
- 1 microscope BHS Olympus asservi à un analyseur d'images,
- 1 microscope BHS Olympus équipé en épifluorescence,
- 1 stéréomicroscope SZH Olympus,
- 1 projecteur de profil V-12A Nikon avec transmission automatique des données vers l'ordinateur,
- 1 analyseur d'images SAMBA 2005 d'Alcatel TITN ANSWARE avec un logiciel dédié à l'analyse de la ploïdie et, en cours d'acquisition, un logiciel dédié à l'analyse des gels d'électrophorèse,
- 5 micro-ordinateurs : DELL 486P/33, DELL 486P/25, DELL 320N+, Goupil G6 (secrétariat), Goupil G5,
- 1 centrifugeuse JOUAN CR 4-11,
- 1 phytotron pour la conservation des souches de phytoplancton.

3.3.3. Personnel.

L'équipe au 31 décembre 1992 était composée de :

personnel scientifique

- Responsable : **André GERARD**
- Cadre : **Yamama NACIRI**
- Techniciens : **Jean-Marie PEIGNON**
Christophe LEDU
Pascal PHELIPOT

personnel administratif

- Secrétariat : **Yvette SIMIAN** (1/3 temps)
- Documentation : **Yvonne FAVINO** (1/4 temps)
- Comptabilité : **Martine GRASSET** (1/4 temps)
- Entretien : **Ginette CAILLETEAU** (1/2 temps)

3.3.4. Budget.

Chaque Unité de Recherche se voit accorder, en début d'année, des crédits d'investissement et de fonctionnement. Ces crédits sont alloués par la Direction, en fonction de l'EPRD (Etablissement Prévisionnel des Recettes et Dépenses), établi

l'année précédente. Le montant des crédits dépend fortement de la priorité des programmes et des recettes enregistrées par les laboratoires (Contrats Régionaux, Départementaux ou Communautaires).

Les crédits d'investissements servent à couvrir les besoins en matériel scientifique dont le coût unitaire est supérieur à 2500F.

Les crédits de fonctionnement recouvrent les besoins du laboratoire en :

- produits chimiques et produits d'entretien,
- petit matériel de coût inférieur à 2500F,
- missions.

Le budget de l'URGE en 1992 est présenté dans le Tableau 1.

<i>(en KF)</i>	<i>Subvention d' Etat</i>	<i>Recettes affectées</i>	<i>Total</i>
Equipement	20	335 ♣	355
Fonctionnement	155		155
TOTAL	175	355	510

♣ Recettes :	contrat Etat-Région Poitou-Charentes	200 KF
	contrat Etat-Région Bretagne	75 KF
	Conseil Général Charente-Maritime	60 KF

Tableau 1.

Ces crédits d'investissement et de fonctionnement, accordés en début d'année, peuvent faire l'objet de deux Décisions Modificatives en cours d'année :

- la DM1 (Décision Modificative 1) en Juin-Juillet,
- la DM2 (Décision Modificative 2) en Octobre-Novembre.

Ces deux décisions interviennent lors de modifications ou d'ajout de recettes, ou tout simplement de problèmes financiers de l'Unité.

Il existe également un compte "station", géré par le chef de station, pour l'ensemble des dépenses en logistique, qui comprend :

-les grosses dépenses en infrastructures (bâtiment neuf, aménagement de nouveaux laboratoires...)

-le fonctionnement général de la station (eau, électricité, gaz, contrats d'entretien, photocopieuse, gestion du courrier, véhicules de service...)

Le budget de la station en 1992 est présenté dans le Tableau 2.

<i>(en KF)</i>	<i>Subvention d' Etat</i>	<i>Recettes affectées</i>	<i>Total</i>
Equipement	39.756	0	39.756
Fonctionnement	371.8	0	371.8
TOTAL	411.556	0	411.556

Tableau 2.

DEUXIEME PARTIE

2ème PARTIE : ELECTROPHORESE DE PROTEINES CHEZ TROIS MOLLUSQUES BIVALVES : *CRASSOSTREA GIGAS*, *CRASSOSTREA VIRGINICA* ET *OSTREA EDULIS*.

1. INTRODUCTION.

Le sujet du présent stage se rattache à deux des quatre programmes prioritaires de l'URGE : la recherche de marqueurs génétiques et l'acclimatation de différentes espèces du genre *Crassostrea* et leur hybridation.

Les marqueurs ont plusieurs applications importantes en génétique :

- la caractérisation d'espèces,
- la reconnaissance d'hybrides,
- l'aide à la sélection (recherche de marqueurs de résistance, ou de caractères plus complexes...),
- l'étude du polymorphisme intra ou inter-populations.

Les essais d'acclimatation et d'hybridation entre espèces s'avèrent , quant à eux, nécessaires pour :

- l'acclimatation d'espèces nouvelles qui permettrait de pallier à la monoculture actuelle en *C. gigas*,
- la recherche de variabilité nouvelle par l'intermédiaire de l'hybridation et de l'introggression de caractères intéressants d'une espèce à l'autre.

Le but du stage était, dans un premier temps, de mettre en place des protocoles reproductibles d'électrophorèse de protéines, les différentes formes de protéines mises en évidence étant considérées comme autant de marqueurs génétiques. Les recherches se sont ensuite articulées autour de deux thèmes : la caractérisation de 3 espèces de mollusques bivalves :

- l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*,
- l'huître creuse américaine *Crassostrea virginica*,
- l'huître plate française *Ostrea edulis*.

et la reconnaissance d'hybrides supposés entre *C. gigas* et *C. virginica*.

2. L'ELECTROPHORESE ENZYMATIQUE

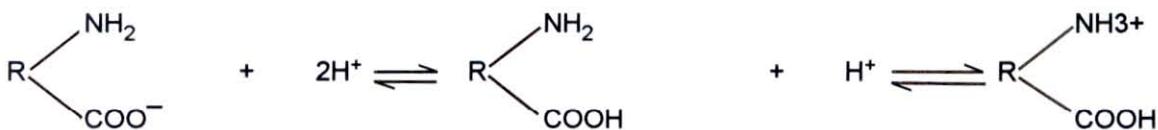
2.1 Principe général.

Il est maintenant établi que la structure primaire des protéines (c'est à dire la séquence linéaire d'acides aminés d'une chaîne polypeptidique) dépend directement de la séquence de nucléotides du gène* qui lui correspond. A ce gène correspond

un locus*, c'est-à dire une localisation géographique sur l'un des chromosomes* de l'individu. Chaque gène peut prendre différentes formes, appelées allèles*, qui déterminent chacun l'un des états possibles du caractère codé par ce gène .

Comme de nombreuses protéines sont des enzymes, catalyseurs biologiques susceptibles d'être révélés spécifiquement, la variabilité enzymatique, c'est-à dire l'existence d'allèles* différents pour un même gène (allozymes*) ou de gènes différents pour une même fonction (isozymes* au sens strict), a été utilisée comme indicateur de la diversité génétique. Cette diversité peut être mise en évidence par la technique de séparation électrophorétique d'extraits de protéines.

Le principe de l'électrophorèse (mot dérivé du grec, qui désigne le transport par électricité) est connu depuis la fin du XIXe siècle. Cette méthode d'analyse biochimique repose sur le caractère amphotère des protéines. En effet, les enzymes et les protéines non enzymatiques ou protéines de structure sont des macromolécules ayant la propriété de s'ioniser en fonction du pH du milieu extérieur. Suivant ce pH, l'ionisation touche les groupements acides ou basiques de la molécule selon les réactions suivantes :



La technique d'électrophorèse consiste à placer des extraits de tissu dans un support solide constitué d'amidon, et de soumettre ce gel à un champ électrique pendant un temps déterminé. Les protéines contenues dans l'extrait migrent alors dans le gel en fonction du ratio de leur charge et de leur poids moléculaire.

La charge des protéines est déterminée par les acides aminés qui les constituent. Parmi les 20 acides aminés entrant dans la composition de la structure primaire des protéines, 8 d'entre eux peuvent porter une charge soit positive soit négative en fonction de l'environnement ionique du milieu extérieur. Au pH physiologique (7-8), les acides aminés tels que l'aspartate, le glutamate et l'histidine sont chargés négativement et les acides aminés basiques comme la lysine, l'hydroxylysine, l'arginine, la tyrosine, et la cystéine sont chargés positivement (Pasteur et al, 1987). La charge électrique nette d'une protéine donnée est ainsi le résultat de sa constitution en ces différents types d'acides aminés ionisés mais également celui de sa structure quaternaire. En effet seuls les acides aminés de la périphérie de la protéine contribuent à sa charge nette.

Dans la plupart des enzymes protéiques solubles, la proportion des acides aminés acides excède celle des acides aminés basiques. Ainsi, au pH physiologique, beaucoup d'enzymes sont chargées négativement. Pour des pH plus faibles,

l'équilibre entre les charges + et - tend à se déplacer en faveur des acides aminés basiques chargés positivement. Le pH extérieur peut également entraîner un équilibre des charges + et - de telle façon que les protéines ont alors une charge nulle. C'est ce qu'on appelle le pH isoélectrique : pH_i qui pour beaucoup d'enzymes a une faible valeur (< 6).

En dehors de son pH_i , toute protéine migre dans un champ électrique. A un pH alcalin, la plupart des enzymes sont chargées négativement et migrent donc de la cathode (-) à l'anode (+). La distance de migration est déterminée par le ratio charge/poids moléculaire de la protéine.

Une fois que le champ électrique appliqué au gel est arrêté, le gel est découpé puis traité dans une solution contenant le substrat spécifique de l'enzyme à analyser et un sel coloré réagissant avec le produit de la réaction catalysée par l'enzyme. A l'endroit du gel où l'enzyme spécifique a migré, aura lieu une réaction colorée qui peut être ainsi schématisée :



Les taches colorées correspondent à la formation de complexes insolubles qui localisent les zones d'activité enzymatique¹ et qui définissent ce que l'on appelle un zymogramme*, chaque individu étant caractérisé par son profil enzymatique.

L'analyse génétique d'un zymogramme* commence par l'identification des allozymes* et des isozymes. Comme les allozymes correspondent à des formes différentes d'un même gène, ils ne diffèrent souvent que par un nombre réduit d'acides aminés : leur charge et leur poids moléculaire ne sont que peu modifiés et ils se situent donc dans des régions très voisines du gel. Par contre, les isozymes correspondent à l'expression de gènes différents qui n'ont en commun que l'activité catalytique. Leur localisation sur le gel sera en général très différente².

¹ La description précédente correspond à ce que l'on appelle la coloration active car elle utilise les propriétés catalytiques spécifiques des enzymes. Une autre technique, appelée coloration passive, consiste à visualiser les protéines de façon non spécifique. Cette technique repose sur l'existence de groupements chargés non-appariés, localisés à la périphérie des protéines, et susceptibles de s'associer par des liaisons non-covalentes à des substances colorées (bleu de Comassie par exemple).

² Ceci est une première approximation car toute analyse génétique poussée nécessite forcément l'étude de générations de ségrégation* issues du croisement entre individus de profils enzymatiques différents pour pouvoir vérifier les lois de transmission des différents caractères (allozymes et isozymes) (cf Annexe I).

2.2 Avantages et inconvénients de l'électrophorèse enzymatique.

Pour l'analyse du polymorphisme*, le gel d'amidon est le type de gel le plus fréquemment utilisé chez les mollusques. Ce type de gel présente un certain nombre d'avantages :

- C'est une méthode qui peut être non destructive et qui permet d'analyser des individus sans avoir systématiquement à les sacrifier.
- Dans 99% des cas il y a codominance* des allèles mis en évidence : le phénotype* observé correspond donc au génotype*.
- Il est relativement bon marché.
- Le gel est non-toxique en lui-même, et la toxicité des solutions de révélation est aisément maîtrisable.
- Il est d'utilisation facile (coulage après un simple chauffage suivi d'un refroidissement à l'air ambiant) et les résultats sont obtenus dans un court laps de temps (24 heures).
- Les électrophorèses sur gel d'amidon permettent d'analyser simultanément plusieurs systèmes de révélation différents sur vingt à trente individus : ainsi de grands échantillons peuvent être directement comparés pour différents systèmes spécifiques.

L'électrophorèse enzymatique présente aussi quelques inconvénients :

- Le nombre de locus étudiés est en général faible (de 20 à 30).
- Il y a en général sous-estimation du polymorphisme existant pour deux raisons essentielles, le cas des mutations silencieuses* dues à des changements de nucléotides qui ne se traduisent pas par des modifications de la structure primaire des protéines du fait de la redondance* du code génétique, et celui des mutations neutres* pour lesquelles il y a modification de la structure primaire mais sans altération de la structure quaternaire et de la charge des protéines. Dans ce dernier cas la conservation des propriétés de la protéine résulte, soit du fait que l'échange d'acides aminés se fait au sein d'une même classe (acide, basique ou neutre), soit du fait qu'il ne touche que les acides aminés du cœur de la protéine et qui n'interviennent pas sur sa charge.
- Il peut aussi y avoir surestimation du polymorphisme en cas de modifications post-traductionnelles des enzymes.
- L'électrophorèse enzymatique ne donne pas toujours une bonne résolution pour la caractérisation du polymorphisme intraspécifique, surtout quand elle est comparée aux techniques d'analyses de l'ADN ou de l'ARN.

3. MATERIEL ET METHODES.

3.1 Matériel utilisé.

Des échantillons de 3 espèces ont été analysés : *Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica* et *Ostrea edulis*.

3.1.1 *Crassostrea gigas*.

Cette espèce, originaire du Japon, a été introduite pour la première fois en France en 1966. Depuis, *C. gigas* est la principale espèce cultivée dans les différents bassins ostréicoles français.

L'échantillon analysé provient d'un élevage mené en 1992 à L'URGE. Pour cette expérience, des mâles et des femelles *C. gigas* et des mâles *C. virginica* uniquement étaient disponibles. La ponte des *C. gigas* et des mâles *C. virginica* a été provoquée par un choc thermique naturel. Plusieurs lots ont pu ainsi être constitués :

- un lot témoin de larves pures de *C. gigas*,
- un lot de larves issues du croisement supposé entre femelle *C. gigas* et mâle *C. virginica*. Etant donné les conditions de ponte, on ne pouvait alors assurer que les femelles utilisées n'avaient pas déjà été fécondées par des mâles de la même espèce,
- un lot de larves issues du même croisement et ayant subi une triploïdisation de son stock chromosomique par induction chimique. Ce lot n'a pas survécu.

Les *C. gigas* étudiées sont issues du lot témoin, et les hybrides supposés du deuxième lot. Les effectifs pour chacune des populations étaient différents, les objectifs étant également différents : caractérisation d'espèce dans le premier cas : (24 individus au total) et confirmation du caractère hybride dans le second cas (48 individus). Au moment de l'analyse par électrophorèse, ces individus avaient atteint une taille de 4 cm de long.

3.1.2. *Crassostrea virginica*.

Cette espèce, originaire des Etats-Unis, est actuellement fortement handicapée par un certain nombre de maladies (protozoaires).

L'échantillon analysé provient d'un élevage mené également par l'URGE en 1992. La ponte a eu lieu 1 mois après le début de l'expérience précédente et des 3 lots constitués (*C. virginica* en pur, *C. gigas* également en pur et croisement entre mâles *C. gigas* et femelles *C. virginica*) seuls les deux premiers ont survécu. L'échantillon

analysé, à raison de 100 individus, provient du premier lot. Au moment de l'analyse, ces individus avaient atteint une taille de 0.5 cm de diamètre.

3.1.3 *Ostrea edulis*.

L'huître plate est présente de la Norvège jusqu'au Maroc ainsi qu'en Méditerranée et en Mer Noire.

L'échantillon analysé provient d'un élevage mené par l'URGE en 1991 dans le cadre d'un programme de sélection pour la résistance à la bonamiose (protozoaire parasite de l'huître plate). Cet échantillon est plus particulièrement issu d'un lot ayant été inoculé par le parasite en 1992. Ont été analysés des individus (au nombre de 9) ayant résisté à cette inoculation après dix mois de suivi en salle de quarantaine.

3.2 Méthodes.

3.2.1 Prélèvement des tissus.

En raison de l'âge des différents échantillons d'individus deux protocoles de prélèvement ont été appliqués.

Le premier concerne des individus dont la taille se situe autour de 4 cm de long. Après ouverture, entre 1 à 2 cm² de tissus sont prélevés pour l'extraction, le reste de l'individu est étiqueté et congelé (-80°) en vue d'expériences ultérieures éventuelles. Pour ce type de prélèvement, l'ensemble des organes est représenté : muscle, tube digestif, manteau, branchies.

Le second protocole concerne des individus dont la taille ne dépasse pas 0.5 cm de diamètre. Dans ce cas, l'intégralité de la chair est utilisée pour l'extraction.

3.2.2 Préparation de l'extrait.

Le prélèvement est placé au fond du potter à Ultra-Turrax avec 2 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl, pH 7.0, voir Annexe II, Pasteur et al, 1987). Le broyage par Ultra-Turrax se fait dans de la glace pilée pendant environ 2 minutes. Le broyat liquide est prélevé, placé dans un eppendorf de 2 ml puis centrifugé à 2000 rpm à 4°C pendant 5 minutes. Les eppendorfs sont ensuite congelés à -70°C (culot + surnageant) dans le but d'une part de bloquer l'activité catalytique des enzymes, ce qui assure une meilleure conservation dans le cas d'utilisations répétées, et d'autre part de favoriser leur extraction après éclatement des cellules encore entières après le broyage : les cristaux de glace qui se forment dans le cytoplasme des cellules perforent les membranes cellulaires, les enzymes intracellulaires sont ainsi libérées lors de la décongélation.

Pour les individus de grande taille, chaque prélèvement a donné lieu à une extraction. Pour les individus de petite taille, ce même protocole a d'abord été appliqué puis, en raison d'une moindre concentration des extraits par rapport au premier cas, 8 individus ont été utilisés pour une même extraction.

3.2.3 Préparation du gel.

La composition, la concentration et le pH du gel varient selon les systèmes enzymatiques étudiés mais la base reste toujours la même : mélange de 400 ml de tampon de gel et d'amidon en poudre (à raison de 12 à 14% du poids total) (cf Annexe III). Le mélange obtenu est agité de manière régulière au dessus d'un bec benzène : sous l'effet de la chaleur, il y a formation d'une solution colloïdale. Cette opération est suivie immédiatement d'un dégazage par trompe à vide, ce qui permet d'éviter la formation de bulles d'air susceptibles d'altérer la migration des protéines dans le gel. Notons que le vide peut créer une implosion, d'où la nécessité d'une surveillance constante de la pression à la sortie de la trompe à vide, et la nécessité d'utiliser des fioles Erlenmeyers spécialement conçus pour résister à de fortes pressions.

Lors des différents essais plusieurs types de gels ont été testés :

- gel Tris-Phosphate, pH 7
- gel Tris-Citrate, pH 7
- gel Tris Lithium Borate, pH 7

Le choix de ces gels a été dicté par la bibliographie sur le sujet : Allen et Gaffney (1993), Pasteur *et al.* (1987) et Huelvan (1985) pour le gel Tris-Citrate, Pasteur *et al.* (1987) et pour le gel Tris-Lithium-Borate, Guyaumar (com. pers.) pour le gel Tris-Phosphate.

La composition de ces différents gels ainsi que celle des tampons qui leurs sont associés (tampon de migration) est donnée dans l'annexe III.

3.2.4 Coulage du gel.

Après dégazage, le gel est coulé sur un support en Plexiglas, dont l'horizontalité à été testé. Les puits (26 par gel) sont pratiqués en plongeant un peigne adapté, avant la prise en masse du gel.

3.2.5 Electrophorèse.

Les échantillons sont sortis du congélateur, et décongelés à température ambiante.

Le peigne est alors retiré. Des bandes de papier Wattman, préalablement découpées aux dimensions des puits, sont imbibées des différents échantillons, puis placés directement dans les puits du gel.

Notons qu'avant de placer les échantillons dans les puits il est fortement indiqué de faire le plan des échantillons, c'est à dire de repérer la position exacte sur le gel des différents échantillons.

Tout l'espace resté libre dans les puits est ensuite rempli à l'aide d'une pipette automatique, de bleu de Bromophénol, colorant inerte qui permet au manipulateur de repérer l'avancée du front de migration tout au long de la durée l'électrophorèse. Ce produit migre en effet plus vite que les protéines et donne une bonne mesure de la distance de migration ainsi que de l'homogénéité du front.

La migration peut alors débiter : le gel est déposé dans une cuve à électrophorèse couplée à un système de refroidissement faisant circuler de l'eau à 2°C sous le gel. Pour éviter une trop grande élévation de température du gel, de la glace est également déposée sur sa face supérieure. Un générateur lui délivre une intensité constante et le voltage dépend alors de la résistance du gel et évolue au cours de la migration. Les conditions de migration dépendant directement de la composition du tampon d'électrode et de la concentration du gel utilisé, elles peuvent varier d'une électrophorèse à l'autre.

3.2.6 La révélation.

La migration, dès qu'elle est jugée suffisante (10 cm minimum), peut être interrompue. Le gel est alors sorti de la cuve et peut être préparé en vue des différentes révélations.

Le coté droit anodique du gel est coupé en biais, de façon à conserver au cours des manipulations un repère de l'ordre du dépôt des échantillons. Les papiers Wattman, situés au niveau des puits, sont enlevés.

Le gel est alors découpé en plusieurs tranches horizontales (4 tranches d'environ 2 mm d'épaisseur) à l'aide d'un "fil à couper le beurre". Les différentes tranches sont placées dans des bacs de coloration et recouvertes de solution de révélation (système enzymatique). Le temps de révélation est alors fonction du système enzymatique utilisé.

Lors des différents essais plusieurs systèmes enzymatiques ont été testés :

- Phospho-gluco-isomérase (PGI)
- Leucine-amino-peptidase (LAP)
- Aspartate-amino-transférase (AAT)
- Estérases (EST)
- Phospho-gluco-mutase (PGM)

- Sorbitol-déshydrogénase (SDH)
- Malate-déshydrogénase (MDH)
- Estérases-np (EST.NP)
- Lactate-Deshydrogénase (LDH),
- Superoxyde-Dismutase (SOD),
- Mannose-Phosphate-Isomérase (MPI),
- Protéines générales (PT)

La composition de ces différentes solutions de coloration est donnée dans l'annexe IV :

Certains de ces systèmes ont été choisis d'après Allen et Gaffney (1993) car permettant de discriminer *C.gigas* de *C. virginica* : il s'agit des systèmes EST, PGI, MDH, MPI et PGM. Le choix des autres systèmes a été dicté par la bibliographie sur les huîtres ou sur les mollusques bivalves en général : Borsa (1990) pour MDH, PGM, PGI, EST.NP et LAP, Huelvan (1985) pour AAT, SOD, MDH, LAP, MPI, PGI et PGM, Moraga *et al.* (1989) et Johnson *et al.* (1972) pour AAT, Liskauskas et Ferguson (1990) pour AAT, PGI et MDH, Sarver *et al.* (1992) pour LAP, Gaffney *et al.* (1992) pour LAP, PGI, PGM et EST, Foltz et Chatry (1986) pour LAP, PGM et AAT. La composition des solutions de révélation pour ces systèmes s'est inspirée de Pasteur *et al.* (1987) et de Aebersold *et al.* (1987).

3.2.7 Conservation des gels.

Une fois la révélation faite, il faut fixer la coloration, pour éviter la diffusion des protéines dans le gel et pour pouvoir la conserver. Pour cela il faut rincer le gel et remplacer la solution de révélation par le fixateur dont la composition est donnée par Pasteur *et al.* (1987) (Voir Annexe II). Pour garder une trace de l'électrophorèse, il est souhaitable de prendre une photographie sur table lumineuse.

3.3 Gels effectués.

Au total, 10 gels et migrations ont été effectués :

- 2 migrations sur gel Tris-Citrate (TC),
- 4 migrations sur gel Tris-Lithium-Borate (TLB),
- 4 migrations sur gel Tris-Phosphate (TP).

La mise au point des protocoles s'est faite sur les deux gels TC, sur un gel TLB et deux gels TP. Pour ces migrations, les extraits de chaque individu ont été déposés dans deux puits distincts pour éviter tout problème de lecture en cas de mauvaise coloration d'une partie du gel, et l'étude s'est cantonnée à la reconnaissance

d'hybrides. Dans ces cas trois *C. gigas*, trois *C. virginica* et un *O. edulis* servant de témoins, encadrent six hybrides supposés.

Les gels suivants (3 TLB et 2 TP) ont donné lieu à une étude plus systématique des hybrides supposés, puis à une étude des différences entre les trois espèces étudiées (sans répétition des extraits).

4. RESULTATS OBTENUS.

4.1 Mise en place des protocoles.

4.1.1 Amélioration des techniques.

Ce stage a permis de donner une réponse à différents problèmes rencontrés lors du précédent passage à l'URGE :

- Une amélioration de la migration a été obtenue par une baisse de la concentration des tampons utilisés pour la préparation des gels et pour la migration dont la composition avait été relevée dans la bibliographie. Sur les conseils du Dr Guyomard (INRA, Jouy en Josas), la concentration est passée d'environ 0.1 mol/dm³ à 0.01 mol/dm³ pour les tampons de gel et d'environ 1 mol/dm³ à 0.1 mol/dm³ pour les tampons de migration.

- L'ampérage a également été modifié, toujours selon les conseils du Dr Guyomard, passant ainsi de 50 mA à 150 mA. Ces deux paramètres, trop forte concentration des tampons et faible intensité, peuvent expliquer les migrations très insuffisantes obtenues lors des essais précédents, même après 6 heures d'expérience (résistance trop importante du système pour l'ampérage appliqué).

- Une lecture plus approfondie de la bibliographie, ainsi que les échanges avec différents spécialistes de l'électrophorèse (Dr Guyomard (INRA), Dr Borsa (ORSTOM), Dr Gaffnay (University of New-Jersey, USA) a permis de diversifier les types de gel testés et d'augmenter le nombre de systèmes de révélations.

4.1.2 Systèmes enzymatiques pour lesquels des révélations sont obtenues.

Certains systèmes utilisés lors du premier passage à l'URGE avaient donné des résultats non exploitables mais prometteurs. Ces derniers ont donc été réutilisés comme base des expérimentations lors du présent stage et ont effectivement donné des zymogrammes* exploitables (PGM, PGI, AAT). D'autres systèmes enzymatiques ont également été testés (SDH, LAP, EST), et ont donné des résultats positifs.

- avec les tampons gel-migration Tris-Citrate (TC) des colorations ont été obtenues avec les systèmes AAT, EST, PGI et PGM,

- avec les tampons gel-migration Tris-Phosphate (TP) des colorations ont été obtenues avec les systèmes LAP, EST, PGM, AAT et SDH,

- avec les tampons gel-migration Tris-Lithium-Borate (TLB) des colorations ont été obtenues avec les systèmes EST, PGI et LAP.

Ces différents résultats ont permis, pour les systèmes enzymatiques révélés sur différents types de gel (par exemple EST), de choisir le support donnant les zymogrammes les plus interprétables : ainsi, après avoir été testé sur les trois types de gel, la lecture du zymogramme obtenu pour le système EST s'est révélée être optimale sur gel Tris -Phosphate. Des résultats similaires ont été observés pour PGI et LAP sur gel Tris-Lithium-Borate.

Tous les autres systèmes testés (MDH, EST.NP, LDH, SOD, MPI, PT, PGM) n'ont pas donné de résultats. L'absence de coloration spécifique pour ces enzymes peut trouver plusieurs explications :

- dénaturation spécifique des enzymes durant l'extraction,
- enzymes à $pH_i=7$, donc ne migrant pas dans les conditions de pH utilisé pour les trois gels testés,
- enzymes à $pH_i > 7$, et migrant donc vers la cathode (-).

4.1.3 Systèmes enzymatiques discriminant les différentes espèces.

Le but des expériences étant d'observer des différences interspécifiques au niveau des profils enzymatiques, n'ont été retenus que les systèmes de révélation permettant cette différenciation. Ces systèmes sont :

- les phospho-gluco-isomérases (PGI) sur gels Tris-Citrate (TC) et Tris-Lithium-Borate (TLB),
- les estérases (EST) et les sorbitol-déshydrogénases (SDH) sur gel Tris-Phosphate (TP),
- les leucine-amino-paptidases (LAP) sur gel Tris-Lithium-Borate (TLB).

Ces différents systèmes de révélation ont alors été utilisés pour les deux études effectuées, c'est à dire, dans un premier temps, la caractérisation d'espèces et, dans un second temps, la reconnaissance d'hybrides supposés entre *C. gigas* et *C. virginica*.

4.2 Caractérisation d'espèces

La Planche-Photo III illustre les différents résultats obtenus, qui permettent, pour certains systèmes, de distinguer les différentes espèces analysées. A ce niveau d'étude, on ne peut qu'émettre des hypothèses sur les bases génétiques des variations observées (allozymes ou isozymes, protéines monomériques, dimériques..., homozygotie* ou hétérozygotie* ?) (cf Annexe I). Pour pouvoir répondre à ces questions, il faudrait pouvoir croiser entre eux des individus de

PLANCHE-PHOTO III.

CARACTERISATION DES ESPECES *OSTREA EDULIS*, *CRASSOSTREA GIGAS* ET *CRASSOSTREA VIRGINICA*.

Photo 1 : Phospho-gluco-isomérasés (PGI).

Photo 2 : Leucine-amino-peptidases (LAP).

Photo 3 : Estérasés (EST).

Photo 4 : Sorbitol-déshydrogénases (SDH).

Légende : G pour *C. gigas*, V pour *C. virginica* et E pour *O. edulis*.

profils enzymatiques différents et étudier leurs descendance. Seule cette étude permettrait de vérifier la validité des hypothèses par l'analyse statistique, dans la descendance, des proportions entre les différents zymogrammes obtenus (ajustement aux lois de Mendel, cf Annexe I). Le matériel pour une telle analyse n'étant pas disponible pour l'instant, les interprétations se réduiront à des hypothèses.

4.2.1 Comparaison entre *C. gigas* et *C. virginica*.

Leucine-amino-peptidases (LAP) : Pour ce système, il ne semble pas y avoir de différences entre *C. gigas* et *C. virginica*.

Phospho-gluco-isomérase (PGI) : Des différences significatives apparaissent entre les deux espèces considérées. *C. gigas* se caractérise, dans 5 cas sur 6, par un zymogramme réduit à une bande, à migration moyenne, alors que *C. virginica* se caractérise dans tous les cas par 3 bandes à migration rapide, la bande la plus lente des 3 se situant au niveau de celle de *C. gigas*, la bande la plus rapide étant la plus colorée. Un tel zymogramme se rapproche de celui relevé par Huelvan (1985) sur *Pecten maximus* pour la même enzyme. Selon cet auteur, les PGI sont des enzymes dimériques, ce qui permet de faire un certain nombre d'hypothèses :

- l'ensemble des bandes, du fait de leur chevauchement, semble ne procéder que d'un seul gène. Ils constitueraient donc des allozymes différents.
- l'ensemble des *C. virginica* seraient à l'état hétérozygote et possèderaient donc 2 allèles différents, l'un à migration moyenne (M) et l'autre à migration rapide (R).
- pour *C. gigas*, 5 individus seraient à l'état homozygote et ne possèderaient donc qu'une seule forme allélique : M. Le sixième individu semble présenter un phénotype intermédiaire à 3 bandes (type *C. virginica*), dont la plus lente (M) est cependant la plus colorée (type *C. gigas*). Il serait intéressant pour la validation des hypothèses de pouvoir croiser entre eux 2 deux types de *C. gigas*. Une autre hypothèse serait de considérer que ce type particulier est dû à une contamination entre deux puits adjacents.

Quelque soit l'hypothèse retenue, PGI reste cependant un système permettant une bonne discrimination entre les deux espèces analysées.

Estérases (EST) : Pour la quasi totalité des 2 échantillons, il n'y a à priori pas de différences entre *C. gigas* et *C. virginica* qui présentent une bande lente (L) pour ce système enzymatique. Toutefois, deux individus *C. virginica* font exception : l'un présente une bande rapide (R) et l'autre présente à la fois les deux bandes L et R.

Il semblerait donc que l'échantillon de *C. gigas* est homozygote pour l'allèle L, alors que l'échantillon de *C. virginica* se compose d'un mélange d'individus soit homozygotes pour L ou R, soit hétérozygotes. L'étude de la planche IV corrobore cette hypothèse dans la mesure où les 3 *C. virginica* qui y figurent sont cette fois-ci hétérozygotes RL. Les développements précédents supposent bien entendu, que les formes L et R soient codées par un même gène et que l'enzyme étudiée soit monomérique, puisque l'hétérozygote supposé ne présente que deux bandes (cf Annexe I).

Sorbitol-déshydrogénases (SDH) : Pour ce système, l'interprétation est plus difficile du fait d'une coloration insuffisante pour les individus *C. gigas* et *C. virginica*.

En conclusion, un seul système enzymatique, PGI, permet une bonne discrimination (sous certaines réserves) entre *C. gigas* et *C. virginica*. Pour EST, la situation est plus compliquée du fait du polymorphisme intra-spécifique de *C. virginica*. Dans certaines conditions cependant ce système enzymatique pourra tout de même servir de marqueur.

4.2.2 Comparaison entre *C. gigas*, *C. virginica* et *O. edulis*.

Leucine-amino-peptidases (LAP) : Pour ce système, les huîtres plates *O. edulis* se différencient nettement des deux espèces d'huîtres creuses. *O. edulis* se caractérise par une bande rapide (R) alors que les *Crassostrea* se caractérisent par une bande lente (L). On peut donc faire l'hypothèse de l'existence d'un seul gène à deux allèles L et R, et celle de l'absence de polymorphisme intraspécifique. Le système enzymatique LAP permet de discriminer, sans erreurs possibles, les huîtres plates des huîtres creuses.

Estérases (EST) : Comme pour le système précédent, les *O. edulis* présentent une bande rapide (R), alors que *C. gigas* se caractérise par une bande lente (L) et que *C. virginica* présente un polymorphisme intraspécifique pour les bandes L et R. Avec les hypothèses énoncées précédemment (un seul gène, 2 allèles pour une protéine monomérique), ce système permet de faire la différence entre *O. edulis* et *C. gigas*, mais ne permet pas une discrimination systématique d'*O. edulis* et de *C. virginica*.

Phospho-gluco-isomérases (PGI) :

Une différence est observée entre huîtres plates et huîtres creuses. Cependant une différence de concentration manifeste (observée dès l'extraction) entre ces deux groupes d'espèces peut être la source d'erreurs d'interprétation. En reprenant les

mêmes hypothèses que dans le paragraphe précédent (§ 3.2.1 : un seul gène à deux allèles M et R, et une enzyme dimérique), on peut faire l'hypothèse supplémentaire que les individus *O. edulis* sont tous hétérozygotes pour un nouvel allèle à migration lente (L) et l'allèle M : on observe en effet trois bandes sur les profils enzymatiques des *O. edulis*. Cette interprétation reste cependant incertaine du fait des différentes intensités de coloration enregistrées, et concerne essentiellement la discrimination entre *C. gigas* et *O. edulis*. Malgré cette restriction, PGI reste néanmoins performant pour dissocier *C. virginica* d'*O. edulis*.

Sorbitol-déshydrogénases (SDH) : Pour ce système, le même problème de concentration se repose et peut invalider l'interprétation consistant à associer une bande lente (L) aux huîtres creuses et deux bandes lente (L) et rapide (R) aux huîtres plates. L et R seraient donc les deux allèles d'un même gène codant pour une enzyme monomérique. La confirmation de cette hypothèse supposerait dans un premier temps de travailler, pour toutes les espèces avec des extraits plus concentrés.

En conclusion, il apparaît que les quatre systèmes enzymatiques étudiés permettent une bonne discrimination entre les huîtres plates et les huîtres creuses. Ceci est particulièrement vrai pour LAP et SDH (sous réserve de vérification pour ce dernier système). PGI et EST donnent des résultats moins systématiques.

4.3 Reconnaissance d'hybrides

Les résultats obtenus lors de la caractérisation d'espèces (§ 3.2.1, Planche Photo III) montrent une différence entre les profils enzymatiques de *C. gigas* et de *C. virginica*, pour les deux systèmes EST et PGI. La confirmation de la nature hybride des individus étudiés sera donnée par la présence d'un allèle spécifique de *C. virginica* dans le profil enzymatique des hybrides supposés qui, de par leur origine, ont un profil enzymatique de type *C. gigas* : il s'agirait donc de retrouver une bande R pour EST et une bande R pour PGI (avec la bande intermédiaire entre R et M qui est la bande caractéristique des *C. gigas*).

Quarante-huit hybrides supposés ont au total été analysés. Tous ces individus présentent des profils enzymatiques semblables à celui du parent femelle *C. gigas* pour les deux systèmes EST sur gel TP et PGI sur gel TLB, (Planche-Photo IV). On peut donc conclure au caractère non hybride des individus étudiés. Ceci va dans le même sens que les résultats obtenus par Allen et Gaffney (1993) pour qui l'hybridation interspécifique entre *C. gigas* et *C. virginica* est impossible.

PLANCHE-PHOTO IV.

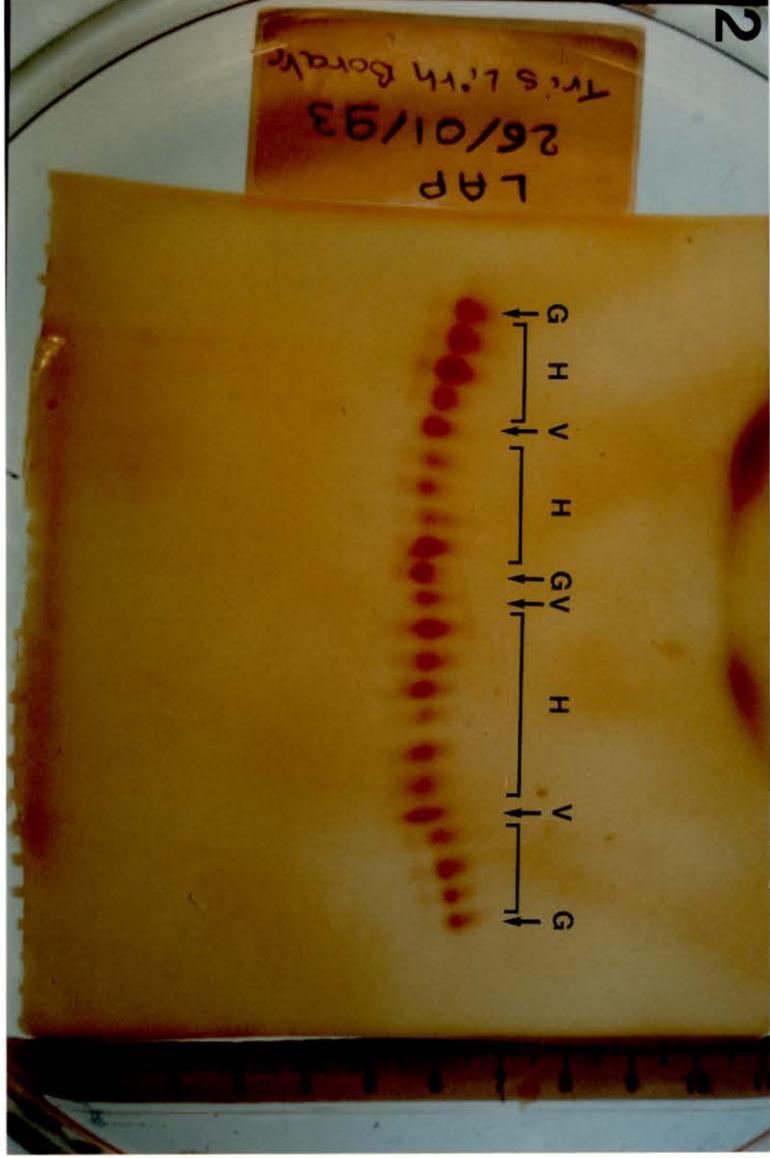
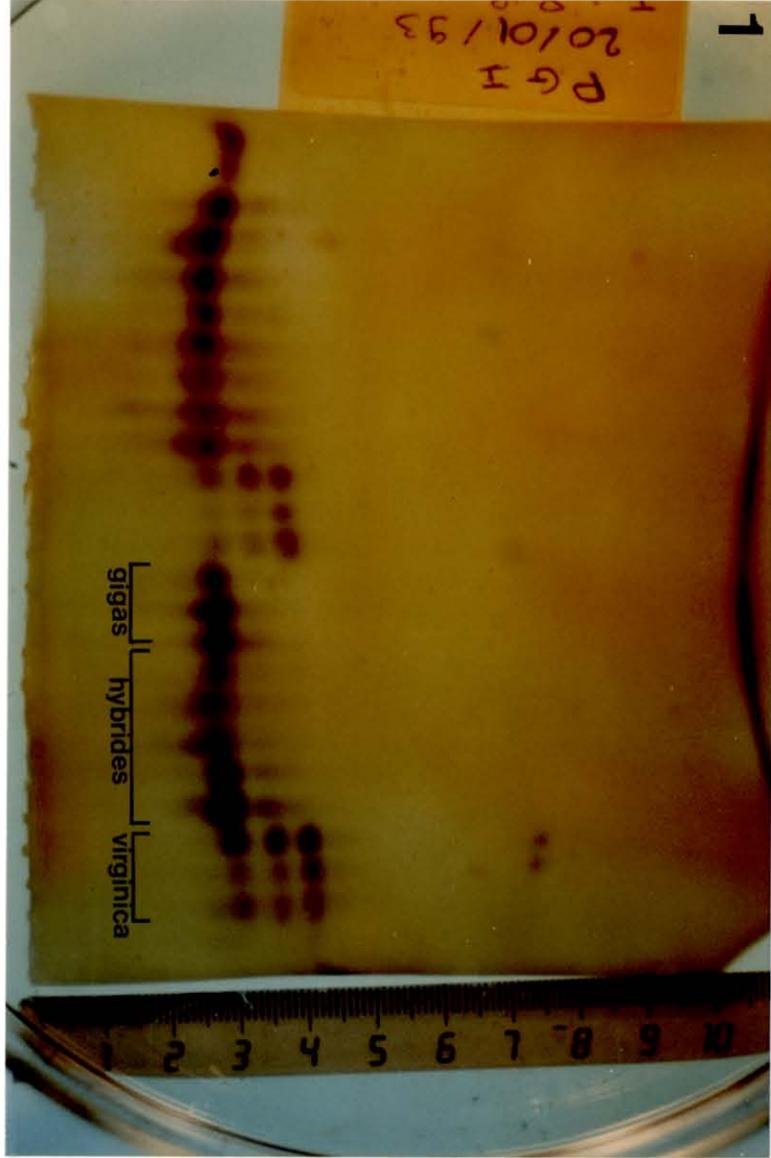
RECONNAISSANCE D'HYBRIDES SUPPOSES ENTRE *CRASSOSTREA GIGAS* ET *CRASSOSTREA VIRGINICA*.

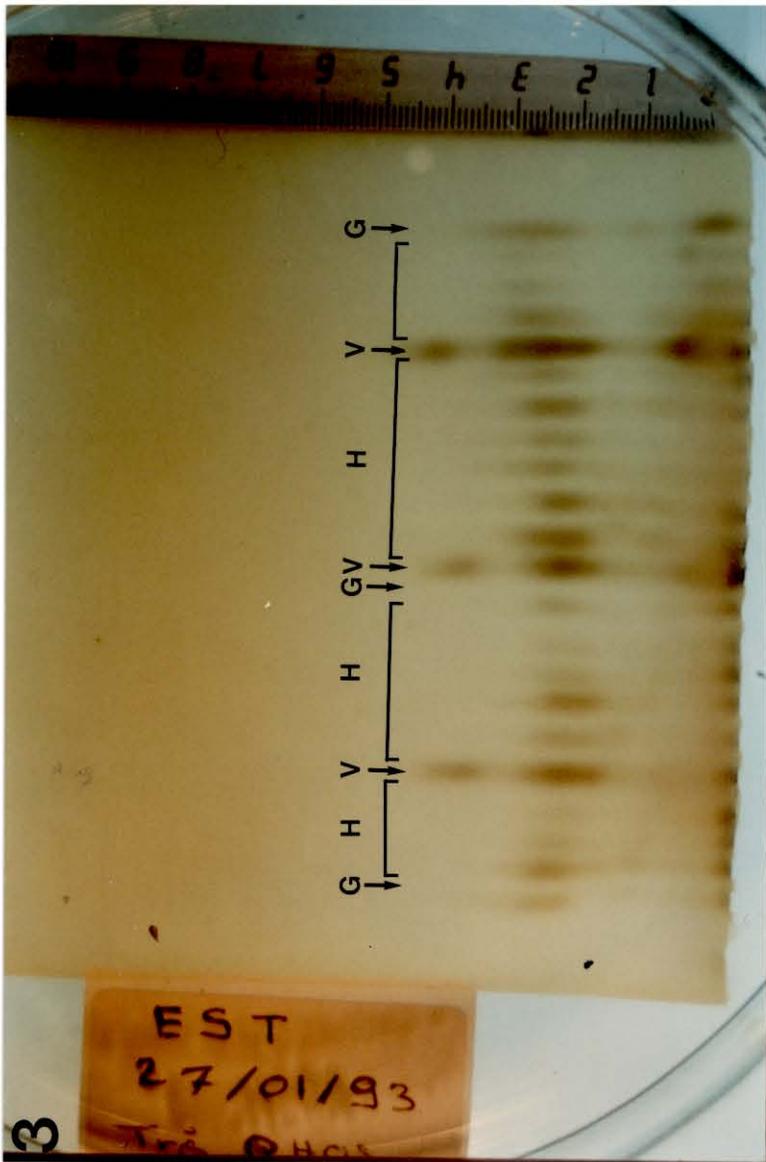
Photo 1 : Phospho-gluco-isomérases (PGI).

Photo 2 : Leucine-amino-peptidases (LAP).

Photo 3 : Estérases (EST).

Légende : G pour *C. gigas*, V pour *C. virginica* et H pour les hybrides supposés.





5. PERSPECTIVES

Les analyses effectuées ont permis de jeter les bases de la caractérisation de trois espèces de mollusques bivalves. Bien qu'incomplète et ne permettant que d'émettre des hypothèses quant aux bases génétiques des variations observées, cette caractérisation a permis d'identifier la vraie nature d'individus supposés hybrides. Un certain nombre d'amélioration s'avèrent cependant indispensables :

- Augmentation du nombre de systèmes enzymatiques utilisables. Pour les systèmes enzymatiques n'ayant donné aucune coloration (MDH, LDH, SOD...), il est nécessaire de procéder à d'autres expérimentations en utilisant des conditions de pH différents permettant de sortir de la zone de pH isoélectrique de certaines enzymes.

- Amélioration de la migration. Pour certains systèmes (PGI par exemple), une meilleure résolution des bandes (coloration plus marquée, bandes moins étalées...) peut également être obtenue en travaillant à des pH différents de celui utilisé.

- Amélioration de l'interprétation génétique. Elle ne pourra se faire qu'en travaillant sur les descendance entre individus de profils enzymatiques différents. L'hybridation interspécifique semblant impossible entre *C. gigas* et *C. virginica* (résultats présentés et travaux d'Allen et Gaffnay (1993)) et étant impossible entre *Crassostrea* et *Ostrea*, l'étude de telles descendance passera forcément par des croisements intraspécifiques. Cela suppose de mettre en évidence un minimum de polymorphisme au sein de chaque espèce. Cela semble possible sur *C. virginica* et *C. gigas* pour certains des systèmes étudiés.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE.

La mise au point de protocoles pour l'électrophorèse enzymatique trouve des applications immédiates dans les différents domaines de recherches abordés par l'URGE. Certains de ces domaines ont fait l'objet de ce présent rapport : caractérisation d'espèces et reconnaissance d'hybrides supposés. D'autres applications sont également envisagées :

- L'outil électrophorèse sera régulièrement utilisé pour caractériser les géniteurs des différentes populations et pour suivre le taux de polymorphisme dans les descendances. L'électrophorèse devrait ainsi permettre de juger de l'évolution de la variabilité au sein des populations sélectionnées, et de la consanguinité éventuelle après plusieurs cycles d'intercroisements.

- L'obtention de marqueurs enzymatiques pour certains caractères complexes permettrait de faciliter la sélection pour ces caractères. C'est le cas du programme de recherche de résistance à la bonamiose chez l'huître plate. Chez cette espèce la résistance ne peut être vérifiée qu'au bout de deux ans et la découverte d'un marqueur ouvrirait la voie à une sélection plus précoce.

- Des aménagements de protocole sont également envisagés. En effet, pour certaines expérimentations, tous les prélèvements se feront par biopsie sur manteau pour ne pas sacrifier les individus analysés. Ceci impliquera certainement qu'un petit nombre de système ne pourront être étudiés : ceux pour lesquels des extractions doivent être pratiquées sur la glande digestive par exemple. L'augmentation du nombre de systèmes enzymatiques utilisables est donc d'autant plus indispensable.

La mise au point de protocoles et le travail au sein d'une Unité de recherche appliquée permet d'acquérir une toute autre vision des techniques de laboratoires. En effet, il ne s'agit pas simplement d'appliquer mais de comprendre pourquoi et comment fonctionne une technique ce qui suppose une attitude plus active.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE.

- Aebersold P.B., Winans G.A., Teel D.J., Milner G.B. & Utter F.M., 1987.** Manual of starch gel electrophoresis : a method for the detection of genetic variation. US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, Technical Report NMFS 61. 19 pages.
- Allen S.K. Jr. & Gaffney P.M., 1993.** Inviabile hybrids of *Crassostrea virginica* (Gmelin) with *C. rivularis* (Gould) and *C. gigas* (Thunberg). Sous presse pour *Aquaculture*.
- Borsa P., 1990.** Génétique des populations de bivalves en milieu lagunaire : la palourde dans l'Etang de Thau (Méditerranée). Thèse de l'Université Paris-VI. 147 pages.
- Foltz D.W. & Chatry M., 1986.** Genetic heterozygosity and growth rate in Louisiana Oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, **57**, 261-269.
- Gaffney P.M., Davis C.V. & Hawes R.O., 1992.** Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, **105**, 1-20.
- Huelvan, S. 1985.** Variabilité génétique de populations de *Pecten maximus* (L.) en Bretagne. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale. 196 pages et annexes.
- Johnson A.G., Utter F.M. & Niggol K., 1972.** Electrophoretic variants of aspartate aminotransferase (AAT) and adductor muscle proteins in the native oyster (*Ostrea lurida*). *Anim. Blood Grps Biochem. Genet.*, **3**, 109-113.
- Liskauskas A.P. & Ferguson M.M., 1990.** Enzyme heterozygosity and fecundity in a naturalized population of brook trout (*Salvinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47(10)**, 2010-2015.
- Moraga D., Osada M., Lucas A. & Nomura T., 1989.** Génétique biochimique de populations de *Crassostrea gigas* en France (côte atlantique) et au Japon (Miyagi). *Aquat. Living Resour.*, **2**, 135-143.
- Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J. & Britton-Davidian J., 1987.** Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Collection Tec-Doc, Editions Lavoisier. 217 pages.
- Sarver S.K., Katoh M. & Foltz D.W., 1992.** Apparent overdominance of enzyme specific activity in two marine bivalves. Sous presse pour *Genetica*.
- Sournia J.-C., Amouroux C., Belliard J., Cauderon Y., Duplan J.-M., Naciri Y. & Novel G., 1991.** Dictionnaire de génétique. Editions du Conseil International de la Langue Française (CILF). 351 pages.

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE.

Allèle : A un locus donné, forme particulière que prend le gène, déterminant l'un des états possibles du caractère codé par ce gène.

Allozyme : Isozyme correspondant au polymorphisme allélique d'un gène.

Chromosome : Dans le noyau eucaryote, complexe nucléoprotéique formé d'ADN d'histones, etc..., observable sous forme de bâtonnet au cours des divisions cellulaires.

Codominance : Chez un hétérozygote, expression à un locus donné de deux allèles différents qui codent pour des caractères exprimés sans qu'aucun d'eux ne masque l'autre.

Gène : Séquence nucléotidique constituant une unité d'information génétique, et pouvant déterminer, directement pour un gène de structure, ou indirectement pour un gène de régulation, l'expression d'un caractère.

Génotype : Au sein du génome, ensemble des gènes d'un individu révélés par une analyse génétique ou moléculaire, qu'ils s'expriment ou non.

Hétérozygote : Se dit d'une cellule ou d'un individu dont les allèles à un même locus sont différents.

Homozygote : Se dit d'une cellule ou d'un individu dont les allèles à un même locus sont identiques.

Isozyme : Terme désignant des enzymes ayant une même fonction catalytique mais des formes moléculaires et des propriétés différentes (vitesse de migration en électrophorèse, affinité différentielle pour le substrat, efficacité catalytique variable, etc...).

Locus : Sur un chromosome, emplacement occupé par un gène.

Mutation neutre : Mutation ponctuelle modifiant la séquence polypeptidique du produit du gène sans modifier sa fonction et n'entraînant aucun changement de la valeur adaptative du génotype.

Mutation silencieuse : Mutation ponctuelle qui ne modifie pas la séquence du polypeptide produit par le gène muté.

Phénotype : Ensemble des caractères visibles résultant de l'expression du génotype dans un environnement donné. *La notion même de phénotype dépend des méthodes et procédés d'observation utilisés.*

Polymorphisme génétique : Dans une population d'une espèce donnée, présence régulière et simultanée, à des fréquences supérieures à celle des mutations spontanées, de plusieurs formes différentes d'un caractère génétique dépendant de plusieurs allèles à un même locus.

Redondance du code génétique : Etat du code génétique selon lequel différents codons peuvent correspondre à un seul même acide aminé.

Ségrégation : Lors de la méiose, séparation aléatoire des chromosomes homologues, donc des allèles et des caractères qu'ils expriment, suivi de leur distribution dans les noyaux fils.

Zymogramme : diagramme de bandes, obtenu par électrophorèse d'un extrait de protéines enzymatiques solubles.

D'après Sournia *et al.*, 1991.

ANNEXES

ANNEXE I.

ANALYSE GENETIQUE D'UN ZYMOGRAMME

A l'intérieur d'une population et pour une enzyme donnée, peuvent exister un grand nombre d'allèles* pour le gène* dont dépend cette enzyme. L'expression de cette variabilité sur un zymogramme*, sous forme de profils de bandes caractérisant chacun des individus, dépend de différents facteurs :

- le nombre d'allèles différents dans la population,
- l'hétérozygotie de l'individu au locus considéré,
- le niveau de ploïdie de l'espèce,
- le nombre de chaînes polypeptidiques formant l'enzyme active fonctionnelle.

Un individu diploïde possède au maximum deux allèles différents : son profil pour une enzyme monomérique présentera donc deux bandes distinctes. Pour une enzyme dimérique, le même individu diploïde hétérozygote* présentera trois bandes distinctes qui correspondent aux différentes associations entre les 2 chaînes polypeptidiques codées par les 2 allèles différents. Lorsque les enzymes sont tétramériques, le nombre d'allèles trouvés dans la population important, et l'espèce tétraploïde, les profils de bandes se complexifient de façon très importante et le nombre de profils différents dans une même population augmente également.

Toute analyse génétique tend à vérifier trois hypothèses : le niveau de ploïdie des espèces testées étant en général connu (les huîtres sont par exemple diploïdes), il reste à vérifier :

- que toutes les bandes observées correspondent soit à des isozymes* soit à des allozymes* différents,
- que les individus sont soit homozygotes* soit hétérozygotes,
- la structure de l'enzyme.

Ces tests passent par l'obtention de descendance entre individus de profils enzymatiques différents. La première génération est ainsi hétérozygote si les 2 profils choisis correspondent bien à deux allozymes. L'analyse de cette descendance permet de faire des hypothèses sur la structure de l'enzyme (2

bandes=enzyme monomérique, 3 bandes=enzyme dimérique). L'analyse de la deuxième descendance se révèle également nécessaire pour vérifier que la ségrégation des différents allozymes vérifie les lois de Mendel (25% d'homozygotes de chacun des deux types et 50% d'hétérozygotes dans le cas de codominance entre allèles par exemple).

ANNEXE II.

TAMPON D'EXTRACTION

- Tampon TRIS-HCL pH 7.0	
TRIS	4.84 g
H ₂ O	1000 ml
Ajuster à pH 7.0 avec de l'HCL concentré	

TAMPONS DE REVELATION

- Tampon TRIS A (Pgm-Sod-Aat-Pgi)	
EGTA	0.8 g
TRIS	48.4 g
H ₂ O	2000 ml
Ajuster à pH 8.0 avec environ 55 ml d'HCl concentré	
- Tampon Phosphate B	
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	9.98g
Na ₂ HPO ₄ , anhydre	5.11g
H ₂ O	1000ml
- αNaphtylacétate à 0.3% dans acétone	
α-Naphtylacétate	62.5mg
acétone	20ml
- Solution de TRIS Maléate (0.2mol/dm ³)	
TRIS	24.23 g
acide maléique	23.3 g
H ₂ O	1000 ml
- Tampon TRIS C	
Solution de tris Maléate (0.2mol/dm ³)	250 ml
NAOH (1mol/dm ³)	26 ml
H ₂ O qsp	1000 ml

FIXATEUR STANDART

- Fixateur	
Acide acétique	70 ml
H ₂ O	930 ml

ANNEXE III.

TAMPONS DE GEL ET DE MIGRATION

- Tampon TRIS CITRATE pH 7.0 : pour AAT et PGI.

♣ Tampon d'électrode 2 litres :

• TRIS (0,1 mol/dm ³)	24.4 g
• Acide citrique monohydraté	9.7 g
• H ₂ O	2000 ml
Ajuster à pH 8.0 avec du TRIS (1 mol/dm ³) ou de l'acide citrique (1 mol/dm ³)	

♣ Tampon de gel 2 litres :

• Tampon d'électrode	135 ml
• H ₂ O	qsp 2000 ml
Ajuster à pH 7 avec du TRIS à 1 mol/dm ³ ou de l'acide citrique à 1 mol/dm ³	

♣ Conditions de migration :

- Gel à 12 % d'amidon
- Système de refroidissement à 2 °C
- Programation du générateur :
 - I = 80 mA facteur limitant
 - V = 500 V facteur non-limitant
 - Temps : 5 à 6 heures

- Tampon LITHIUM CITRATE BORATE pH 7.0 : pour LAP et EST.

♣ Tampon d'électrode 2 litres

• Lithium hydroxyde (0,05 mol/dm ³)	2.4 g
• Acide borique (0,19 mol/dm ³)	23.8 g
• H ₂ O	2000 ml
Ajuster à pH 7.0 avec du LiOH à 1 mol/dm ³ ou de l'acide borique à 1 mol/dm ³	

♣ Tampon de gel 2 litres

• TRIS (0,046 mol/dm ³)	11.16 g
• Tampon d'électrode	200 ml
• H ₂ O	qsp 2000 ml
Ajuster à pH 7.0 avec du TRIS à 1 mol/dm ³ ou de l'acide citrique à 1 mol/dm ³	

♣ Conditions de migration

- Gel à 12 % d'amidon
- Système de refroidissement à 2 °C
- Programmation du générateur :
 - I = 80 mA facteur limitant
 - V = 500 V facteur non-limitant
 - Temps : 5 à 6 heures

- Tampon TRIS PHOSPHATE pH 7.0 : pour EST et SDH.

♣ Tampon d'électrode 2 litres

- TRIS (0.1 mol/dm³) 24.22 g
 - NaH₂ PO₄,2H₂O 31.2 g
 - H₂O 2000 ml
- Ajuster à pH 7.0 avec du TRIS à 1 mol/dm³
ou du NaH₂ PO₄,2H₂O à 1 mol/dm³

♣ Tampon de gel 2 litres

- Tampon d'électrodes 200 ml
- H₂O qsp 2000 ml

♣ Conditions de migration :

- Gel à 14 % d'amidon
- Système de refroidissement à 2 °C
- Programmation du générateur :
 - I = 150 mA facteur limitant
 - V = 500 V facteur non-limitant
 - Temps : 5 à 6 heures

ANNEXE IV.

SYSTEMES DE REVELATION

- Aspartate-amino-transférase (AAT)

♣ Réaction :



♣ Coloration :



♣ Composition :

- Tampon TRIS A 50 ml
 - Acide L aspartique 250 mg
 - Acide keloglutatique 125 mg
 - Pyridoxal 5 Phosphate 12,5 mg
- Vérifier que le pH est au moins égal à 7,4.
Ajuster avec du TRIS à 1 mol/dm³
Incuber le gel pendant 15 mn à température ambiante,
puis rajouter :
- Fast Blue BB salt 125 mg

- Estérases (EST)

♣ Composition :

- Tampon phosphate B (0.1 mol/dm³) 75 ml
 - α -Naphthylacétate (0.3 %) 4 ml
- Ajouter avant la coloration :
- Fast Blue BB salt 34 mg
- Incuber à température ambiante jusqu'à l'apparition de taches colorées, fixer dès que possible.

- Leucine-amino-peptidase (LAP)

♣ Réaction :



♣ Coloration :



♣ Composition :

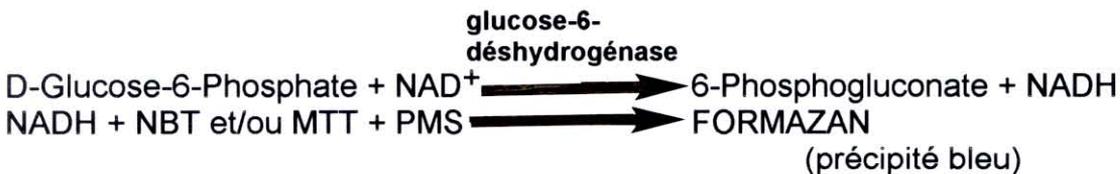
• Tampon TRIS C	90ml
• MgCl ₂ (0.5 mol/dm ³)	1 ml
• MnCl ₂ (0.5 mol/dm ³)	1 ml
• L-Leucyl-β-Naphthylamide, Hcl	30 mg
Ajouter avant la coloration :	
• Fast Garnet GBC	60 mg
Incubation à l'obscurité et à 37°C	
Fixer dès que les taches sont apparaissent.	

- Phospho gluco isomérase (PGI)

♣ Réaction :



♣ Coloration :



♣ Composition :

• Tampon TRIS A	25 ml
• MgCl ₂ (0,5 mol/dm ³)	2,5 ml
• Fructose 6 Phosphate	25 mg
• NAD (1 %)	2,5 ml
• NADP (1 %)	1,25 ml
Ajouter avant l'emploi :	
• Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase	UI
• PMS (1 %)	1,25 ml
• NBT (1 %)	1,25 ml
• MTT (1 %)	1,25 ml
Incubation à l'obscurité (réaction tres rapide).	

- Sorbitol-déshydrogénase (SDH)

♣ Réaction :



♣ Coloration :

NADH + NBT et/ou MTT + PMS \longrightarrow FORMANZAN

♣ Composition :

• Tampon TRIS A	60 ml
• MgCl ₂ (0.5 mol/dm ³)	375 g
• NAD (1%)	3ml
Avant l'emploi, ajouter :	
• NBT (1%)	1.5 ml
• MTT (1%)	0.45 ml
• PMS (1%)	0.75 ml

Incuber à l'obscurité jusqu'à l'apparition de taches.