CERTIFICAT DE SPECIALISATION EN AQUACULTURE

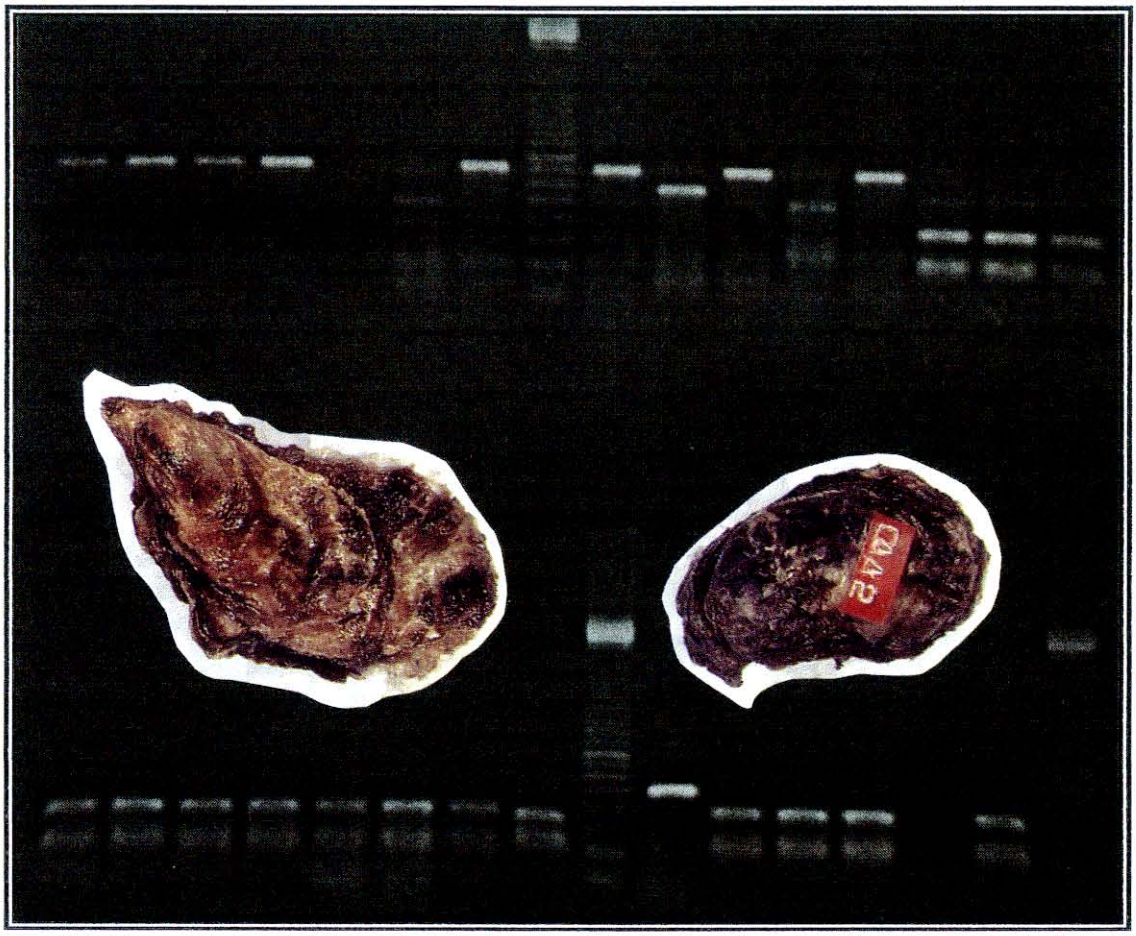
CEMPAMA - Beg Meil Fouesnant -

A LA RECHERCHE DE L'HUITRE PORTUGUAISE : IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES DISCRIMINANT *CRASSOSTREA ANGULATA* ET *CRASSOSTREA GIGAS*

70890
E400 COR.
R
SB

Rapport de stage réalisé du 19/2/96 au 7/5/96 par

Florence CORNETTE



Laboratoire IFREMER Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Génétique
B.P. 133 -17390 - La Tremblade (FRANCE)

IFREMER

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade
OLR 00583

CERTIFICAT DE SPECIALISATION EN AQUACULTURE

CEMPAMA - Beg Meil Fouesnant -

Centre d'Etude du Milieu et de Pédagogie Appliquée du Ministère de l'Agriculture

A LA RECHERCHE DE L'HUITRE PORTUGUAISE : IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES DISCRIMINANT *CRASSOSTREA ANGULATA* ET *CRASSOSTREA GIGAS*

Rapport de stage réalisé du 19/2/96 au 7/5/96 par

Florence CORNETTE

Sous la direction de P. Boudry

au sein du

Laboratoire IFREMER Génétique, Aquaculture et Pathologie
Unité de Recherche en Génétique
B.P. 133 -17390 - La Tremblade (FRANCE)

Chef de Laboratoire A. Gérard

REMERCIEMENTS

Je tiens, tout d'abord, à remercier Monsieur André GERARD, responsable du Laboratoire IFREMER "Génétique, Aquaculture et Pathologie" pour m'y avoir accueilli.

Je suis profondément reconnaissante de la disponibilité et la patience dont a fait preuve Pierre pour l'encadrement de ce stage.

Je soulignerai l'aide précieuse de Sophie, Ludovic et Bertrand pour l'apprentissage des techniques de laboratoire. Je tiens à signaler aussi la bonne humeur et l'accueil de toute l'équipe : Christophe, Yamama, Serge, Pascal, Catherine, Nicolas et Kathia.

Un grand merci à tout le personnel de la station pour leur sympathie.

Merci à toutes les personnes ayant coopérées à mes travaux par leur dévouement, notemment le Museum d'Histoire Naturelle de La Rochelle et Mr. Vaginay du service régional d'Archéologie de Rennes.

Merci aux exploitants qui m'ont accueilli avec gentillesse ainsi qu'à ceux qui m'ont fourni les différentes populations d'huîtres en France comme à l'étranger.

Enfin un grand merci à Nicolas qui m'a donné envie de m'intéresser à l'huître portugaise.

Sommaire

1. INTRODUCTION 3

1.1. Présentation de l'IFREMER 3
1.1.1. Mission de L'IFREMER 3
1.1.2. Structure interne de L'IFREMER 4
1.2. La station de La Tremblade 4
1.2.1. Le laboratoire Génétique Aquaculture et Pathologie 4
1.2.2 L'URGE 6
1.3 Le «conservatoire de souches»: 7

2. PRESENTATION DU SUJET 8

2.1 Rappel historique 8
2.1.1 L'huître plate : *Ostrea edulis* (Linné). 8
2.1.2 L'huître portugaise: *Crassostrea angulata* (Lamark). 8
2.1.3 L'huître japonaise: *Crassostrea gigas* (Thumberg). 8
2.1.4 Les hypothèses concernant les origines de *C. angulata* et *C. gigas* 9
2.2 BILAN BIBLIOGRAPHIQUE : 9
2.2.1. Morphologie 9
2.2.2 Physiologie 10
2.2.3 Pathologie 10
2.2.4 Reproduction, hybridation et génétique 10

3. MATERIEL ET METHODES 12

3.1 Matériel biologique 12
3.2. Extraction d'ADN par la technique dite "au phenol-chloroforme" 13
3.2.1 Rappel sur l'ADN 13
3.2.2. La technique dite «au phénol chloroforme» 13
3.3.Présentation de l'ADN mitochondrial 14
3.3.1. L'ADN mitochondrial 14
3.3.2 La séquence d'ADN cytochrome oxydase c 15
3.4. Amplification de l'ADN par PCR 16
3.4.1 Le principe 16
3.4.2.Conditions générales de réalisation d'une PCR 17
3.4.3.Visualisation des produits de PCR 18
3.5. Digestion des ADN par des enzymes 18
3.5.1. Présentation des enzymes de restriction 18
3.5.2. Enzymes de restriction et marqueurs moléculaires 18
3.5.3 Visualisation des fragments de restriction 19
3.5.4 Application : recherche de Polymorphisme de Longueur de Fragment de Restriction (RFLP) chez les deux espèces du genre *Crassostrea gigas* et *angulata* 20

4 RESULTATS ET DISCUSSION 21

4.1 Résultats des extractions 21

4.2 Résultats des amplifications PCR 21
4.3 Résultats des profils de restriction 21
4.4 Discussion 25
4.5. CONCLUSION 27

5. Quel intérêt pour la profession? 28

5.1 Qui sont ces exploitants? 28
5.2 Synthèse des réponses 28
5.3. CONCLUSION 30

6. Technicien supérieur en productions aquacoles et recherches appliquées 30

6.1 Insertion d'un stagiaire dans une unité de recherche appliquée 30
6.2. Ces techniques ont-elles d'autres applications? 30

7. Conclusion 31

Références Bibliographiques 32

Annexes 34

GLOSSAIRE 43

1. INTRODUCTION

1.1. Présentation de l'IFREMER

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) gère un budget de 993 millions de francs dont l'origine provient en majeure partie de la subvention que lui verse l'Etat et à laquelle s'ajoutent des ressources propres dues à son statut d'EPIC (Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial).

Un peu plus de 1200 ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs participent aux multiples missions de l'IFREMER. Ces personnels travaillent au siège social à Issy les Moulineaux, dans 5 centres (Boulogne-sur-Mer, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti), 5 délégations Outre-Mer, 15 stations et plusieurs points isolés répartis le long du littoral français (Annexe 1).

Mais l'IFREMER, c'est aussi un groupe : en effet à ces 1 200 personnes, il faut ajouter environ 600 personnes qui travaillent dans des filiales et dont la vocation est de valoriser la politique de recherche de l'institut, auprès notamment des professionnels de la mer et gérer les moyens de la flotte océanographique.

1.1.1. Mission de L'IFREMER

L'IFREMER a reçu des missions multiples 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. C'est une spécificité importante.

Dans ce cadre, il exerce cinq missions :

1) Organisme de recherche, il mène ses actions propres dans le domaine des connaissances de base et des technologies liées à de grands enjeux scientifiques et technologiques ou de société (exploitation des ressources de la mer, protection de l'environnement littoral) souvent en collaboration avec d'autres organismes : CNRS, INRA, Universités.

2) Il doit aussi jouer un rôle d'**agence d'objectifs** stimulant sur les projets et programmes l'action de tous les acteurs de la recherche nationale en s'appuyant sur l'expertise de ses propres laboratoires.

Ces deux missions d'organisme de recherche pluridisciplinaire et d'agence d'objectifs sont complémentaires ; elles font de lui une force de propositions pour une politique de recherche nationale en liaison avec les ministères chargés de la recherche et de l'espace, de l'environnement et de la défense. Cela constitue un atout aussi pour une politique de coopération internationale, prolongement naturel de sa mission de recherche.

3) Agence de moyens, il a la charge de la construction, de la programmation et de la mise en oeuvre de la flotte océanographique française et des moyens lourds associés. Ceux-ci doivent être au service de la communauté scientifique nationale. Par ses actions de recherche technologique, l'institut contribue à perfectionner et à renouveler les engins et l'instrumentation nécessaires à la recherche océanographique.

4) L'IFREMER exerce une **mission de service public** : suivi des ressources de la mer (principalement de la pêche et de la conchyliculture) et protection de l'environnement littoral, notamment par le contrôle de la qualité des eaux.

5) En tant qu'EPIC, il a la **mission de valoriser** le résultat de ses travaux dans les entreprises. Il doit donc développer et mobiliser ses compétences pour renforcer la compétitivité des entreprises françaises du secteur maritime (industrie, pêche, aquaculture) pour affronter la concurrence internationale. L'IFREMER contribue aussi à la formation par la recherche d'ingénieurs et de techniciens dans le domaine de la technologie maritime.

1.1.2. Structure interne de L'IFREMER

Comme le montre l'organigramme (Annexe 2), l'IFREMER se compose de 5 directions opérationnelles :

- La Direction des Moyens Navals (DMN),
- La Direction de l'Ingénierie de la Technologie et de l'Informatique (DITI),
- La Direction de l'Environnement Littoral (DEL),
- La Direction des Recherches Océaniques (DRO),
- La Direction des Ressources Vivantes (DRV) dont les activités couvrent l'étude de toutes les espèces vivantes de la mer, faune et flore, ainsi que l'exploitation qui en est faite. Le secteur économique de la pêche et de l'aquaculture est important, et la DRV travaille beaucoup en concertation avec les professionnels, les administrations en charge de ce secteur, qu'elles soient nationales ou européennes.

1.2. La station de La Tremblade

La station de La Tremblade est composée de deux laboratoires, l'un dépendant de la DEL et l'autre de la DRV. Ce dernier est un laboratoire travaillant en Génétique, Aquaculture et Pathologie (GAP) chez les mollusques bivalves.

1.2.1. Le laboratoire Génétique Aquaculture et Pathologie

1.2.1.1. Structure du GAP

Ce laboratoire, dont la direction a été confiée à André Gérard, se compose de quatre Unités de Recherche :

Aquaculture	•	L'Unité de Recherche Aquacole en Poitou-Charentes (URAPC), sous la responsabilité de Philippe Goulletquer,
	•	L'Unité de Recherche Aquacole en Pays de Loire (URAPL), sous la responsabilité de Jean-Pierre Baud,
Pathologie	•	L'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (URPIG), sous la responsabilité de Tristan Renault,
Génétique	•	L'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE),

Génétique • L'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE), sous la responsabilité d'André Gérard.

C'est cette unité de Recherche en Génétique qui m'a accueillie pour ce stage.

1.2.1.2. Budget du GAP

voir Tableau 1

Version du : 06-Mar-96

CREDITS GIE + IFREMER 1995
Laboratoire Génétique Aquaculture et Pathologie (GAP)
La Tremblade

	URPIG		URGE		URAPC		GAP		TOTAL		TOTAL GENERAL
	GIE	IFREMER	GIE	IFREMER	GIE	IFREMER	GIE	IFREMER	GIE	IFREMER	GIE + IFREMER
Investissement											
Infrastructure								85 000F		85 000F	85 000F
Equipement		80 000F		140 000F		18 000F		45 000F		283 000F	283 000F
Incitation				100 000F		100 000F				200 000F	200 000F
Total		80 000F		240 000F		118 000F		130 000F		568 000F	568 000F
Fonctionnement											
fonct. labo.	64 000F	58 865F	106 000F	74 240F	88 000F	74 480F	15 500F	30 000F	273 500F	237 585F	511 085F
Travaux ext.							37 000F	34 307F	37 000F	34 307F	71 307F
missions	8 600F	41 240F	18 400F	35 419F	6 000F	39 800F		10 000F	33 000F	126 459F	159 459F
transport								8 200F	0F	8 200F	8 200F
entr. reparation		10 000F						177 747F	0F	187 747F	187 747F
biblioth. colloque						260.66F	5 500F	3 888F	5 500F	4 149F	9 649F
stagiaires							3 000F		3 000F	0F	3 000F
Sous-Total	72 600F	110 105F	124 400F	109 659F	94 000F	114 541F	61 000F	264 142F	352 000F	598 447F	
Total	182'705F		234'059F		208'541F		325'142F		950'447F		950 447F

1.2.2 L'URGE

Les principaux objectifs de l'URGE, tels qu'ils ont été définis dans les "cahiers des objectifs" de la DRV/RA, visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves, dans le domaine de la génétique quantitative, de la cytogénétique, des ressources génétiques. Les objectifs sont d'une part l'obtention de lignées ou de souches présentant des caractères de résistance aux maladies parasitaires et/ou de meilleures performances de croissance et de qualité de chair, et d'autre part d'arriver à une diversification de la production.

Pour tenter de répondre à ces objectifs tout en tenant compte des moyens matériels et humains mis en oeuvre, cinq programmes sont actuellement en cours de réalisation :

- Sélection de souches d'huître plate *Ostrea edulis* résistantes aux parasitoses,
- Sélection de souches d'huître creuse *Crassostrea gigas* sur des critères de qualité programme européen (GENEPHYS),
- Polyploïdisation des principales espèces d'intérêt commercial,
- Obtention de lignées pures et recherche de marqueurs génétiques,
- Acclimatation et hybridations inter-spécifiques de différentes espèces du genre *Crassostrea*.

1.2.2.1 Infrastructures

L'URGE assure la gestion de l'outil écloserie de La Tremblade. Ce bâtiment de 1200 m^2, est principalement constitué de :

- 5 salles humides (Quarantaine, Micronurserie, Maturation, Elevage larvaire, Physiologie),
- 2 salles de production de phytoplancton et une laverie,
- 1 laboratoire et une salle informatique,

L'unité a également en charge la gestion et l'entretien de tout le circuit hydraulique qui se compose de :

- 4 bassins de 300 m^3 de réserve d'eau de mer,
- 23 pompes de 10 à 300 m^3/h,
- plusieurs kilomètres de tuyauterie,
- 1 station de stérilisation au chlore des eaux de rejet (prochainement un système à l'ozone),
- 4 bassins de 20m^3 pour la production en masse de phytoplancton.

1.2.2.2 Personnel

Personnel scientifique

Responsable	André GERARD (Docteur en océanographie)
Cadres	Yamama NACIRI (Docteur en génétique quantitative)
	Pierre BOUDRY (Docteur en génétique des populations)
Techniciens	Serge HEURTEBISE (gestion des géniteurs, analyses biochimiques)
	Christophe LEDU (production de phytoplancton et contrôle de ploïdie par analyse d'image)
	Pascal PHELIPOT (élevage larvaire et micronurserie)
Thésards	Sophie LAUNEY (recherche de marqueurs génétiques et évaluation de la variabilité génétique dans le cadre d'un programme de

sélection de l'huître plate *Ostrea edulis* pour une résistance au parasite *Bonamia ostreae*)
Bertrand COLLET (impliqué dans le programme GENEPHYS : étude des bases génétiques et de la variabilité des caractères physiologiques impliqués dans la croissance chez *C. gigas*).

Personnel administratif (Recherche Aquacole)

Secrétariat : Yvette SIMIAN
Comptabilité : Martine GRASSET

Personnel administratif et logistique rattaché à la station

Entretien : Ginette CAILLETEAU
Logistique : Emile PLANCHE

1.3 Le «conservatoire de souches»:

Le conservatoire de souches implanté dans les locaux de l'URGE (salle de quarantaine) a trois objectifs principaux :

1 - L'étude des potentialités d'acclimatation dans les eaux françaises d'huîtres de différentes espèces, afin de pouvoir identifier celles qui pourraient se substituer à *Crassostrea gigas* en cas d'épizootie majeure ou pour une diversification des productions.

2 - L'étude des possibilités d'hybridations inter-spécifiques au sein du genre *Crassostrea*, et l'étude des performances (croissance, fertilité) des hybrides obtenus.

3 - L'étude de la différenciation génétique (intra- et inter-spécifique) au sein du genre *Crassostrea.*

La recherche de marqueurs moléculaires est l'un des moyens mis en oeuvre pour répondre à ces objectifs. En effet, ils sont utiles pour différencier les différentes espèces et leurs hybrides. C'est une étape préliminaire nécessaire à l'étude des potentialités d'acclimatation de ces espèces; c'est aussi un bon moyen pour la détection d'importation frauduleuse.

2. PRESENTATION DU SUJET

2.1 Rappel historique

2.1.1 L'huître plate : *Ostrea edulis* (Linné).

L'ostréiculture en France est une activité considérée comme telle depuis 1750, période à partir de laquelle on a rencontré les premières préoccupations en matière de stocks et donc les premières restrictions (COCHARD et DARDIGNAC 1977). La ressource était pourtant qualifiée d'inépuisable, les huîtres plates, espèce indigène, étaient présentes du Danemark au Portugal et au Maroc sur toute la côte occidentale. Cette activité était récente pour notre civilisation alors que d'autres peuples comme les Chinois ou les Romains la pratiquaient déjà. La consommation grandissante de ces coquillages, ainsi qu'une mauvaise gestion des stocks par les pillages et les prédateurs (étoiles de mer, bigorneaux,...) et des phénomènes naturels (envasement, températures excessives...), expliquent la raréfaction de ces mollusques. Les principaux bancs naturels permettaient d'exploiter en France environ 20-30 000 tonnes en 1960 (VAN TILBEURGH 1994). De plus, l'huître plate fut décimée au lendemain de la guerre de 1914-1918 (précisément en 1920) par une maladie de nature inconnue, alors que la demande ne cessait d'augmenter. Il fallait donc envisager une solution de remplacement : l'huître portugaise.

2.1.2 L'huître portugaise: *Crassostrea angulata* (Lamark).

Depuis 1867, du fait de la pénurie, les ostréiculteurs du bassin d'Arcachon faisaient venir du Tage des huîtres à raison de 25 à 30 millions de mollusques par an à partir de 1875 (COCHARD et DARDIGNAC, 1977). Ces mollusques étaient alors appelés «gryphées». Or, au début de 1868, un navire chargé de *C. angulata* assurant le transport entre Lisbonne et Arcachon fut contraint de se réfugier en Gironde. Son séjour prolongé entraîna la perte de sa cargaison et les huîtres furent jetées par dessus bord sur la rive gauche de la Gironde. Les survivantes se reproduirent. On put constater l'apparition de gisements naturels qui s'étendirent d'abord en Gironde, puis sur la côte charentaise et sur toute la façade atlantique en remontant jusqu'à la Vilaine (COCHARD et DARDIGNAC, 1977).

L'ostréiculture étant une activité marquée par des périodes de prospérité suivies de périodes de pénurie, le sort de cette espèce fut le même que celui d'*O. edulis*. L'épuisement des gisements dû aux pêches intensives, aux pillages et aux mortalités de 1970 acheva de faire disparaître *Crassostrea angulata* du territoire français. En fait, la disparition totale des *C. angulata* fut provoquée par deux maladies:

- la «maladie des branchies» de 1967 à 1969 (COMPS, 1969, 1970),
- la grande mortalité de 1970, ayant pour cause un iridovirus (COMPS 1970; DELTREIL, 1973).

Les stocks furent en partie reconstitués par l'importation d'une nouvelle espèce : *Crassostrea gigas*.

2.1.3 L'huître japonaise: *Crassostrea gigas* (Thumberg).

Les premiers spécimens de *C. gigas* furent implantés officieusement dans le bassin de Marennes Oléron par un professionnel en 1966 à la suite d'un voyage personnel au Japon (BARRE, 1981). Par la suite, les huîtres japonaises avaient pour origine le Japon, la Corée, le Canada (Colombie britannique) et les U.S.A. (Etat de Washington) (BARRE 1981, GRIZEL et HERAL 1991). Cette nouvelle venue fut remarquée par ses performances de croissance nettement supérieures à la portugaise.

2.1.4 Les hypothèses concernant les origines de *C. angulata* et *C. gigas*

Il existe deux hypothèses expliquant la répartition géographique des deux huîtres *C. angulata* et *C. gigas* respectivement en Europe et au Japon :

La première hypothèse semble dire que l'huître *C. angulata* est présente «depuis des temps immémoriaux» près de Lisbonne DEAN (1893) d'après COCHARD et DARDIGNAC (1977). En Bretagne, on a pu en retrouver dans des amas coquillés datant du VI^{ème} millénaire avant J-C (VAGINAY, comp.pers. (Cf Annexe3). *C. angulata* aurait donc très bien pu être ensuite introduite au Japon vers le XVI^{ème} ou le XVII^{ème} siècle, pendant les grandes explorations des voyageurs portugais. C'est en 1532 que le premier récit d'un voyage au Japon a été rapporté par des Portugais. Ce voyage (ou d'autres par la suite) a pu transporter (volontairement ou non) des *C. angulata* par du naissain fixé aux carènes des navires. De plus, on sait que l'ostréiculture a débuté au Japon au début du XVII^{ème} siècle.

La seconde hypothèse que donne STENZEL (1971) serait que *C. angulata* et *C. gigas* ainsi que *C. cattukensis* rencontrées sur les côtes indiennes seraient issues du fossile *Crassostrea gryphoïdes* qui y existait au Miocène, de la péninsule Ibérique au Japon en passant par l'Asie Mineure. Les bouleversements géologiques auraient provoqué l'isolement de ces trois populations, pour donner ces trois espèces. *C. gigas* et *C. angulata* restent inchangées sur le plan morphologique et sont compatibles sur le plan génétique avec, dans le meilleur des cas, 10 millions d'années de séparation.

2.2 BILAN BIBLIOGRAPHIQUE :

Il existe de nombreuses controverses quant à la classification des genres et des espèces d'huîtres. Pendant longtemps seules des observations et des descriptions morphologiques et anatomiques ont permis d'identifier ces espèces. Les études physiologiques ou pathologiques peuvent informer sur les différences d'une espèce à l'autre. Des travaux ont été fait sur les allozymes (BUROCKER et al., 1979), mais ces méthodes semblent insuffisantes. Maintenant, nous disposons, grâce à l'évolution des techniques de biologie moléculaire, de possibilités de travailler directement sur l'ADN. La technique qu'utilise le "conservatoire de souches" pour distinguer des espèces repose sur l'étude de l'ADN mitochondrial par amplification P.C.R., puis restriction par endonucléases. Une synthèse des données existantes comparant *C. gigas* et *C. angulata* s'impose.

2.2.1. Morphologie

Les auteurs sont tous d'accord : il n'y a pas de caractère permettant de distinguer *C. gigas* de *C. angulata*. Le seul élément de distinction serait la coloration de la coquille au niveau de l'attache du muscle adducteur, qui serait pourpre pour *C. gigas (*KHOMANY et ARAKAWA, 1990). Notons la difficulté de comparer deux espèces sur le plan morphologique, car il existe énormément de morphotypes, en fonction du substrat où l'huître croît ou des techniques d'élevage. Les éléments de comparaison que l'on rencontre sont aussi la taille et la forme de la coquille. Pour deux huîtres du même âge, *C. gigas* aura une coquille plus importante, la forme en sera plus régulière. C'est pourquoi, dans sa collection personnelle, Lamarck appelait l'huître portugaise *Gryphaea angulata,* elle était de petite taille et sa coquille irrégulière. Cette étude morphologique amène aussi KOHMANY et ARAKAWA (1990) à penser à un ancêtre commun pour ces deux espèces. La classification des huîtres est souvent très ambigüe, notamment à cause de la variabilité morphologique propre aux différentes aires écologiques.

L'étude morphologique des stades larvaires de différentes espèces d'huîtres vivant dans le monde réalisée par RANSON en 1967 d'après BARRE 1981, montre qu'il est impossible selon lui de distinguer les *C. gigas* et les *C. angulata*, c'est pourquoi il les regroupe dans la classification sous le nom de *C. laperousii* (Schrenck).

2.2.2 Physiologie

Le métabolisme de ces deux espèces est différent. L'activité métabolique de *C. gigas* est supérieure à celle de *C. angulata* en été. En hiver, *C. angulata* présente un ralentissement du métabolisme de 1,5 fois inférieur à celui de *C. gigas* à partir de données disponibles sur la respiration chez *C. angulata* (VONKEN, 1970), et chez *C. gigas* (GERDES, 1983 ; LEE et CHIN, 1981). Pour la croissance en poids total, on constate un rapport de 2 entre les deux espèces en faveur de *C. gigas* (TROCHON, com. pers; HIS 1972; BOUGRIER *et al.*, 1986); de même que pour la croissance tissulaire, comme l'a observé HIS en 1972. Pour la filtration, on remarque que la capacité de filtration de ces deux espèces est différente : *C. gigas* est supérieure à *C. angulata* (HIS, 1972). Malheureusement, on ne connaît pas précisément le coefficient d'assimilation comparé pour les deux espèces. Mais pour une même biomasse disponible, la quantité de nourriture assimilée par *C. gigas* induit une meilleure utilisation que *C. angulata.* De même, la quantité de nourriture absorbée par *C. gigas* est 1,7 fois supérieure à celle de *C. angulata* (HIS, 1972).

2.2.3 Pathologie

Plusieurs auteurs ont observé la fragilité de *C. angulata* aux maladies. C'est pourquoi elle fut remplacée par l'huître japonaise. La maladie des branchies est observée chez une très large majorité de *C. angulata* (COMPS, 1969,1970a) alors que la *C. gigas* est résistante, ce qui permit son importation massive (COMPS, 1972). Cependant l'huître japonaise est porteuse du parasite *Mytilicola orientalis* mais selon HIS (1977), les espèces indigènes ne peuvent pas être infestées.

2.2.4 Reproduction, hybridation et génétique

La reproduction chez ces deux espèces montre que l'effort de reproduction est du même ordre (HERAL et DESLOUS-PAOLI 1983). Cependant, on note une diminution de l'index de condition plus importante chez *C. angulata* DARDIGNAC et CORBEIL, 1968).
Remarquons que ces deux espèces ne présentent pas les mêmes préférundums de température pour la reproduction:

- *C. gigas*: 19-22°C et plus,
- *C. angulata* mature à partir de 16°C jusqu'à 22°C.

Des possibilités de croisements sont observées en laboratoire entre *C. gigas* et *C. angulata* et en produisant des hybrides viables (IMAI et SAKAI, 1961; MENZEL, 1968 d'après AHMED 1975). La génération F1 étant fertile, on peut donc émettre l'idée d'une super espèce.

Des essais d'hybridation avec d'autres espèces: *C. angulata* et *C. virginica* montrent une incompatibilité (STYLES, 1973) d'après AHMED 1975. Par contre, le croisement *C. gigas* et *C. virginica* permet d'obtenir des larves qui atteignent seulement le stade umbo (DAVIS, 1950) d'après AHMED 1975. Certains auteurs, comme MENZEL en 1974, considèrent *C. angulata* comme étant une sous-espèce de *C. gigas* par la «loi des priorités». De plus, il n'a observé aucune différence entre les chromosomes des hybrides. L'hybridation semble réussir sans difficulté. Il les nomme donc *C. gigas* ssp *gigas* et *C. gigas* ssp *angulata.* Lui aussi, attribuerait une origine commune avec d'autres espèces qui auraient toutes dérivées de *C. gryphoïdes* pendant le Miocène. Les études caryologiques montrent que le nombre de chromosomes est constant d'une espèce à l'autre : 2n = 20 (MENZEL 1968a, d'après AHMED 1975; AHMED 1973, 1975). MENZEL indique que les espèces auraient des variances en fonction de l'aire écologique et que cela expliquerait certaines possibilités d'hybridation d'une aire à une autre. Ces résultats permettraient donc de dire que ces espèces sont assez proches les unes des autres.

On trouve à ce jour peu de travaux sur les différences génétiques entre *C. gigas* et *C. angulata*. BUROKER *et al.* (1993) rapportent des différences pour les fréquences allèliques des loci allozymiques Adk-1, Idh-2 et Pgi. Mais ces auteurs obtiennent des similitudes génétiques de 99% entre les populations de *C. gigas* de Hiroshima, et celles de *C. angulata*. Au niveau protéique, tous les auteurs s'accordent à dire que ces espèces sont indistingables en termes de polymorphisme protéique (MARKERS *et al.*, 1974 ; BUROKER *et al.*, 1979a; MATTIUCI et VILLANI, 1983 d'après GAFFNEY 1993). Les études sur les allozymes ont donc montré que ces deux espèces ne devraient plus être considérées comme telles, mais plutôt comme une même entité systématique (voir pour revue GAFFNEY et ALLEN, 1993).

3. MATERIEL ET METHODES

3.1 Matériel biologique

Le conservatoire de souches de La Tremblade dispose d'un certain nombre d'espèces ou de taxons, dont *C. angulata* et *C. gigas* sur lesquelles j'ai travaillé pour déterminer des marqueurs moléculaires permettant de les distinguer. Le matériel biologique se compose d'huîtres vivantes pour certaines populations et sous forme fixée dans l'alcool pour d'autres. Les espèces étudiées sont présentées dans les tableaux suivants:

Crassostrea angulata (Lamarck, 1819)	
Nom vernaculaire:	Huître portugaise
Synonyme:	*C. gigas* ?
Distribution géographique:	Portugal, sud de l'Espagne, introduite en France accidentellement en 1868
Exploitation commerciale:	Importante. 30000 tonnes par an jusqu'à l'infestation de l'espèce par iridovirus (début des années 1970)
Maladies:	Iridovirus
Croisements Inter-spécifiques:	Inter-fertilité apparemment complète avec *C. gigas*
Remarque:	Le statut d'espèce de *C. angulata* reste incertain
Populations étudiées:	Une population espagnole et deux populations portugaises

***Crassostrea gigas* (Thumberg, 1793)**	
Nom vernaculaire:	Pacific oyster, huître creuse japonaise
Synonyme:	*C. angulata ; O. gigas ; O. laperousi; O. talienwhanensis ; C. laperousii*
Distribution géographique:	Distribution naturelle : Japon (de Hokkaido à Kyushu: 30-45° de latitude nord); «présente» (naturelle ou naturalisée?) le long des côtes de Primorsky jusqu'à la péninsule de Corée, la Chine et le sud-est asiatique; importée puis naturalisée dans de très nombreuses régions du monde.
Exploitation commerciale:	très importante, 800000 tonnes en 1992
Maladies:	virus: Oyster Velar Virus Disease (OVVD), herpesvirus-like, nocardia (bactérie), riketsioses...
Populations étudiées:	deux populations locales, une population coréenne une population irlandaise et une population portugaise

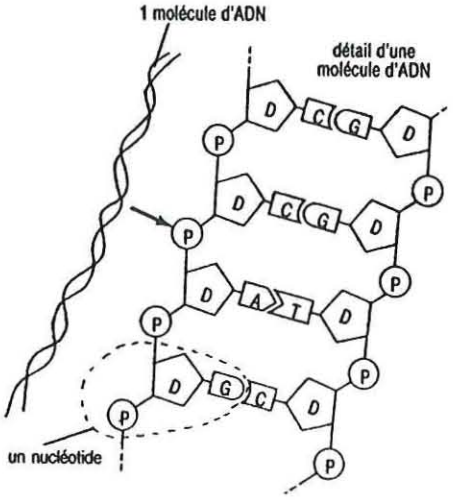
3.2. Extraction d'ADN par la technique dite "au phenol-chloroforme"

Voir Annexe 4.

3.2.1 Rappel sur l'ADN

L'ADN (acide désoxyribonucléique ou séquences en desoxynucléotides ou séquences en bases) est le support de la totalité de l'information génétique de l'individu, de l'espèce, du genre. L'essentiel de l'ADN est localisé dans le noyau cellulaire, mais chaque mitochondrie contient également plusieurs copies de petites molécules d'ADN circulaire, porteuse d'une très faible part de l'information génétique. Chaque cellule peut comporter plusieurs milliers de mitochondries, la proportion de cet ADN mitochondrial est finalement loin d'être négligeable.

C= cytosine
A= adénine
G= guanine
Y= thymine



Source: Presse bac Hachette 1990

Figure n°1 : une molécule d'ADN.

3.2.2. La technique dite «au phénol chloroforme»

L'extraction de l'ADN des individus étudiés se fait à partir de tissus prélevés par biopsie, en général ce sont des fragments de branchies ou de manteau, riches en mitochondries.
Cette technique d'extraction des acides nucléiques se déroule en trois principales étapes (cf. annexe 4) :

1ère étape : Dissociation des tissus et destruction des membranes cellulaires par l'action :

- d'une protéase, la protéinase K, qui va détruire les protéines membranaires et intra-membranaires;
- du SDS, détergent ionique qui se fixe uniformément sur toutes les protéines en les chargeant négativement. Ces protéines sont ainsi dénaturées;
- de l'EDTA qui va complexer les ions calcium indispensables à la cohésion cellulaire.

Ces trois éléments forment le tampon d'extraction.

2ème étape : Extraction au phénol chloroforme :

Après une nuit à 55°C, on ajoute au tampon d'extraction une solution de phénol (déprotéinisant puissant); on mélange vigoureusement les deux phases non-miscibles. Il se produit un phénomène de partage : la phase aqueuse (tampon d'extraction) qui contient les acides nucléiques est prélevée après centrifugation. Un lavage au chlorophorme+alcool isoamylique permet d'éliminer les traces de phénol qui auraient pu être emportées avec la phase aqueuse.

3ème étape : Lavage par précipitation des acides nucléiques :

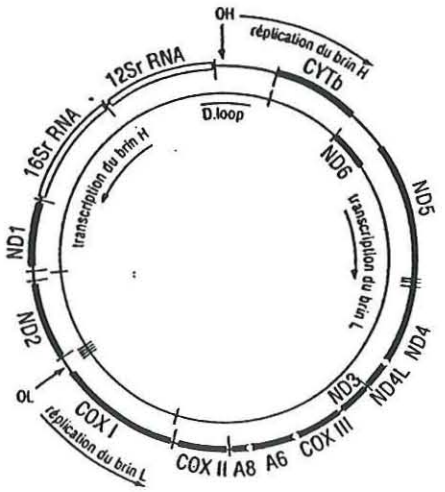
Il s'agit de faire agir sur la phase aqueuse prélevée à l'étape 2 une solution d'alcool (éthanol, ou méthanol) à 100°, à une température de -20°C
Il y a précipitation des ARN et ADN, on peut alors se débarrasser des produits ayant servis à l'extraction et redissoudre les acides nucléiques dans du tampon TE (Annexe 5).

Nous obtenons donc un mélange ADN-ARN. La présence d'ARN n'est pas gênante pour le reste des manipulations. La *Taq* polymérase est une ADN polymérase, et elle ne peut pas agir avec une matrice ARN.

3.3.Présentation de l'ADN mitochondrial

3.3.1. L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial est présent dans les mitochondries et il contribue à l'hérédité cytoplasmique lié uniquement aux liens maternels.



ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 = sous-unités 1, 2, 3, 4L, 4, 5 et 6 de la NADH déshydrogénase (complexe I).
COX I, COX II, COX III = sous-unités I, II et III de la cytochrome oxydase (complexe IV).
CYTb = cytochrome b.
A6, A8 = sous-unités 6 et 8 de l'ATPase (complexe V).
H = brin lourd (heavy) ; L = brin léger (light).
OH, OL = origines de réplication du brin lourd et du brin léger. Les ARN de transfert sont représentés par des traits ponctuant les différents gènes mitochondriaux.
D-loop = boucle de déplacement.

Source: Génétique moléculaire médicale G.M. 91. LEGALL.et al. CNED.

Figure n°2: L'ADN mitochondrial

Les deux brins d'une molécule d'ADN ont une orientation inverse, ils sont dits antiparallèle.
Un gène de structure est organisé en trois zones:

- une région flanquante 5';
- le gène de structure proprement dit;
- une région flanquante 3'.

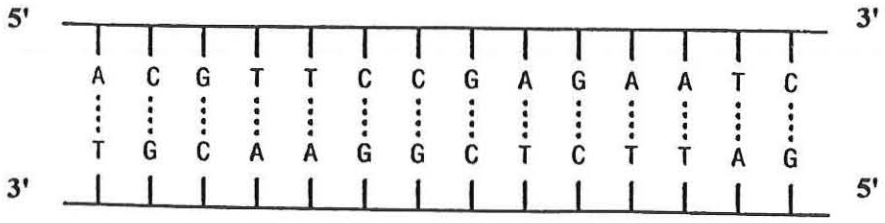


Figure n°3 : représentation schématique des deux brins d'ADN:

L'ADN mitochondrial présente un certain nombre de particularités dans son fonctionnement par rapport au génome nucléaire.

La PCR (Polymérase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) est une technique relativement récente, inventée en 1983 par K.MULLIS, permettant d'amplifier sélectivement une séquence d'ADN. Cette réaction nécessite la connaissance de la séquence des fragments flanquants la séquence d'ADN à amplifier. Ces régions flanquantes serviront d'**amorces** (primers). Cette amplification se fait suivant une série de cycles comportant chacun trois étapes : la **dénaturation, l'annealing** ou appariement des amorces et l'**élongation.**

3.3.2 La séquence d'ADN cytochrome oxydase c

Ce fragment appelé aussi séquence, est de l'ADN mitochondrial. Il code pour la cytochrome oxydase c de la sous unité I codant ce gène (FOLMER *et al.*, 1994). La variabilité de ce fragment est faible car l'ADN mitochondrial ne se recombine pas. De plus, cet ADN n'est transmis que par les liens maternels (LEGALL et al.). Ainsi les différences que l'on pourra observer seront plus représentatives pour chaque population, et l'on déterminera des haplotypes. Ce fragment est caractérisé par un poids moléculaire de 710 paires de bases (FOLMER *et al.*, 1994). Ces amorces sont communes à 80 espèces d'invertébrés. Elles permettent l'amplification du fragment cytochrome oxydase c chez les huîtres du genre *Crassostrea*, *Ostrea* et chez *Mytilus edulis*.

Les amorces utilisées sont des polynucléotides de 25 bases pour le premier et de 26 bases pour le second:

LCO 1490 : 5'-GGT-CAA-CAA-ATC-ATA-AAG-ATA-TTG-G-3'

HCO 2198 : 5'-TAA-ACT-TCA-GGG-TGA-CCA-AAA-AAT-CA-3'

Ces amorces permettent de révéler des informations à propos des séquences pour des analyses phylogénétiques chez les espèces et des différents degrés taxonomiques. Les travaux de recherche sur l'ADN mitochondrial ont débuté sur le fragment de 16S qui a montré l'absence de polymorphisme entre *C. gigas* et *C. angulata.* Au contraire les travaux préliminaires effectués sur le cytochrome oxydase c montraient la présence de polymorphisme, comme en témoigne le tableau des premiers résultats ci-dessous. J'ai donc continué les travaux de recherche de marqueurs génétiques sur le fragment de cytochrome oxydase.

Individu	16S								
	TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	AciI	RsaI	HindIII	HaeIII	SacI
CA3	a	a	a	a	a	a		a	a
CA4		a	a	a	a	a		a	a
CA2	a	a	a	a	a	a		a	a
CA1test	a	a	a	a	a	a		a	a
CA1	a	a	a	a	a	a		a	a
CG10			a	a	a		a	a	a
CG3test	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CG2	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CG3	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Individu	COI								
	Taq1	Sau3A	HhaI	MseI	AciI	Rsa1	HindIII	HaeIII	SacI
CA3	c	c	a	b	b	c	a	c	a
CA4	c	c	a	b	b	c	a	c	a
CA2	c	c	a	b	b	c	a	c	a
CA1test	c	c	a	b	b	c	a	c	a
CA1	c	d	a	b	b	c	a	c	a
CG10	d	c	a	d	b	c	a	c	a
CG3test	d	c	a	d	b	c	a	c	a
CG2	d	c	a	d	b	c	a	c	a
CG3	d	c	a	d	b	c	a	c	a

Tableau 2 : Résultats préliminaires obtenus au laboratoire avant mon stage.

3.4. Amplification de l'ADN par PCR

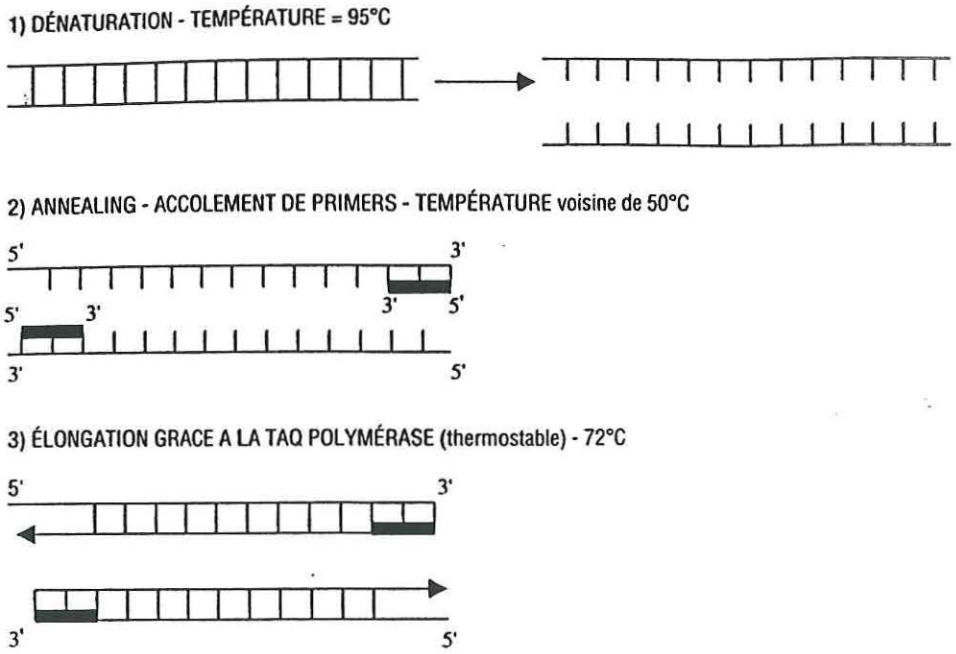
3.4.1 Le principe

Un cycle d'amplification est schématisé par trois étapes (figure n°4) :

* **La dénaturation**: la PCR nécessite la présence d'une matrice d'ADN simple-brin. L'ADN initialement bicaténaire (double brin) doit donc subir une fusion. Cette fusion, ou dénaturation, se fait par chauffage à une température proche de 94°C durant environ 2 minutes. Cette dénaturation permettra, dans l'étape suivante, l'appariement des amorces avec les séquences spécifiques de l'ADN simple-brin.

* **L'annealing:** (ou appariement des amorces): c'est durant cette étape que, suivant la complémentarité des bases, les amorces vont se fixer spécifiquement à la matrice. Cet appariement a lieu à des températures situées entre 40°C et 60°C pendant quelques dizaines de secondes. Lorsque l'ADN à amplifier est initialement double-brin, il est impératif qu'une amorce se place sur un brin, d'un coté de la séquence à amplifier, tandis que l'autre se place sur l'autre brin, et de l'autre coté de cette séquence.

* **L'élongation** : une ADN polymérase (une enzyme) catalyse l'extension du brin d'ADN à partir du primers, dans le sens habituel de réplication (5'→3'), et suivant la matrice. Etant donné les conditions de température dans lesquelles se déroule une PCR, cette ADN polymérase doit être thermorésistante : on utilise la *Taq* polymérase extraite et purifiée à partir d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus)*. L'élongation se fait dans la zone de température optimale de cette enzyme, c'est à dire entre 72 et 74°C. A la fin de ce cycle, on obtient donc deux doubles brins d'ADN contenant la séquence amplifiée. Un nouveau cycle peut alors commencer.



Source: Génétique moléculaire médicale. GM 91. LEGALL et al. CNED.

Figure 4 : les trois étapes d'un cycle de PCR

Chaque cycle permettant de doubler le nombre de copies de la séquence à amplifier, au bout de n cycles il y a présence dans le mélange réactionnel de 2^n exemplaires de cette séquence.

En général, on effectue une trentaine de cycles d'amplification. Ces trente cycles sont précédés d'une première dénaturation (94°C) de 5 minutes, et suivis d'une dernière élongation (72°C) de 10 minutes.

3.4.2.Conditions générales de réalisation d'une PCR

L'étude d'un fragment d'ADN en biologie moléculaire nécessite l'obtention préalable d'un grand nombre de copies de cette séquence.

Afin que la PCR puisse se dérouler dans des conditions normales, le mélange réactionnel doit contenir un certain nombre d'éléments : voir Annexe 5

- un aliquote de l'ADN à amplifier, qui servira de matrice;
- une solution de désoxynucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) jouant rôle de squelettes permettant l'édification des nouvelles chaînes;
- une solution contenant les deux amorces éléments indispensables à la *Taq* polymérase et permettant la copie du simple brin;
- de la *Taq* polymérase permettant la copie du fragment;
- du tampon réactionnel (maintien de l'enzyme dans de bonnes conditions de pH);
- une solution de $MgCl_2$, le magnésium étant cofacteur de la polymérase;

3.4.3.Visualisation des produits de PCR

La technique utilisée est celle sur gel d'agarose, c'est un gel qui présente des puits permettant de déposer des produits qui traversent un réseau de mailles. (Cf figure 5 au 3.5.3 et page visualisation des différents gels).
Le principe est de permettre la séparation et l'identificaton des constituants d'un mélange par l'action d'un champ électrique.
Les molécules de nucléotides ont à un pH donné, la même densité et une charge négative (dûe à la présence d'acide phosphorique participant à la structure de l'ADN). Les molécules vont migrer en fonction de leur taille, de par la nature du gel d'agarose qui par son réseau de mailles tridimensionnelles va les calibrer. Si l'on veut changer la taille des mailles du gel, il suffit de modifier la concentration d'agarose, celui que l'on utilise est à 1% dans une solution tampon (TAE 1X). (Cf Annexe 6)
Ce gel d'agarose est déposé dans une solution tampon (TAE 1X) avec du BET (bromure d'éthydium, très toxique) permettant la coloration de l'ADN. Celui-ci devient fluorescent aux ultraviolets. Afin de pouvoir lire correctement ces gels on dépose un marqueur de taille.

3.5. Digestion des ADN par des enzymes

3.5.1. Présentation des enzymes de restriction

Un grand nombre de bactéries synthétisent des enzymes appelées endonucléases de restriction ou encore enzymes de restriction, qui ont pour fonction de les protéger des virus par dégradation du génome viral. Chaque enzyme reconnaît spécifiquement une séquence de 4 à 8 nucléotides. Beaucoup d'endonucléases de restriction ont été purifiées à partir de différentes espèces de bactéries ; plus de 100 enzymes, qui en général reconnaissent des séquences de nucléotides différentes, sont actuellement commercialisées.

3.5.2. Enzymes de restriction et marqueurs moléculaires

Ces enzymes sont utilisées dans le cadre de ce travail pour l'identification de marqueurs moléculaires chez les différentes espèces d'huîtres étudiées.

Une enzyme de restriction coupe la double hélice d'ADN en une série de fragments spécifiques appelés **fragments de restriction**. En étudiant la taille des fragments de restriction obtenus après digestion par une même enzyme des ADN de différents individus, il est possible d'étudier le polymorphisme inter-spécifique au niveau des sites de reconnaissance de cette endonucléase. En effet on peut constater des différences de taille des fragments de restriction après digestion par une même enzyme chez deux individus.

Ce type de polymorphisme est appelé "polymorphisme de longueur de fragments de restriction" (RFLP). Si l'on constate un RFLP inter-espèce, cette séquence de nucléotides, connue, devient un marqueur moléculaire d'espèce facilement détectable.

3.5.3 Visualisation des fragments de restriction

La visualisation des produits de digestion se fait par méthode éléctrophorétique. Il s'agit de faire migrer les fragments de restriction dans un champ électrique au travers d'un gel d'agarose. L'ADN des fragments de restriction est révélé par le BET (Cf 3.4.3).

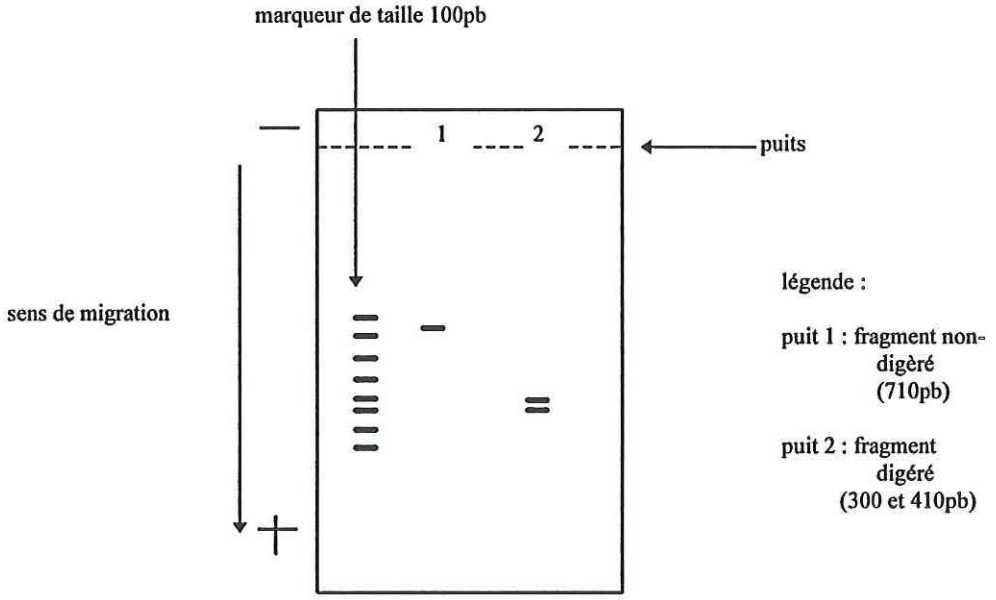


Figure 5 : sens de présentation des gels d'éléctrophorèse

3.5.4 Application : recherche de Polymorphisme de Longueur de Fragment de Restriction (RFLP) chez les deux espèces du genre *Crassostrea gigas* et *angulata*

Voir Annexe 5

Les enzymes de restriction utilisées sont présentées dans le tableau suivant.

Les conditions opératoires, qu'il est nécessaire de respecter pour chacune de ces enzymes, sont indiquées dans des fiches techniques fournies par le fabricant).

Enzyme	**séquence reconnue**	**résultat de la coupure**
Taq $^{\alpha}$ I	5'TCGA3'	5'T CGA3' 3'AGC T5'
Sau3A I	5'GATC3'	5' GATC3' 3'CATC 5'
Hha I	5'GCGC3'	5'GCG C3' 3'C GCG5'
Mse I	5'TTAA3'	5'T TAA3' 3'AAT T5'
Aci I	5'CCGC3' 3'GGCG5' Site non symétrique	5'C CGC3' 3'GGC G5' ou 5'G CGG3' 3'CGC C5'
Rsa I	5'GTAC3'	5'GT AC3' 3'CA TG5'
Hae III	5'GGCC3'	5'GG CC3' 3'CC GG5'
HindIII	5'AAGCTT3'	5'A AGCTT3' 3'T TCGAA5'
SacI	5'GAGCTC3'	5'GACT C3' 3'G TCGAG5'

Tableau 3 : les enzymes de restriction utilisées

4 RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Résultats des extractions

Les résultats des extractions d'ADN des individus étudiés ont donné des ADN de qualité suffisante pour pouvoir les amplifier par PCR. Seule la dernière population de *C. angulata* du Portugal n'a pu être exploitée en totalité. La qualité d'une extraction d'ADN se juge par la conservation de fragments à haut poids moléculaire.

Voir page "Exemples de gels de contrôle" Figure 6 a.

4.2 Résultats des amplifications PCR

Certains fragments d'ADN ont été difficiles à amplifier dans un premier temps suite à des problèmes de qualité de la *Taq* polymérase. Ces difficultés surmontées, j'ai travaillé sur la totalité des animaux dont je disposais.

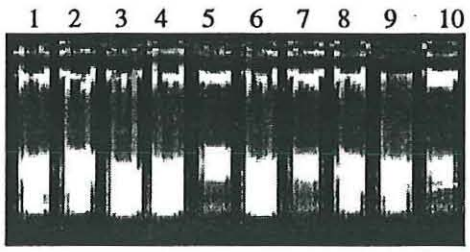
Voir page "Exemples de gels de contrôle" Figure 6 b.

4.3 Résultats des profils de restriction

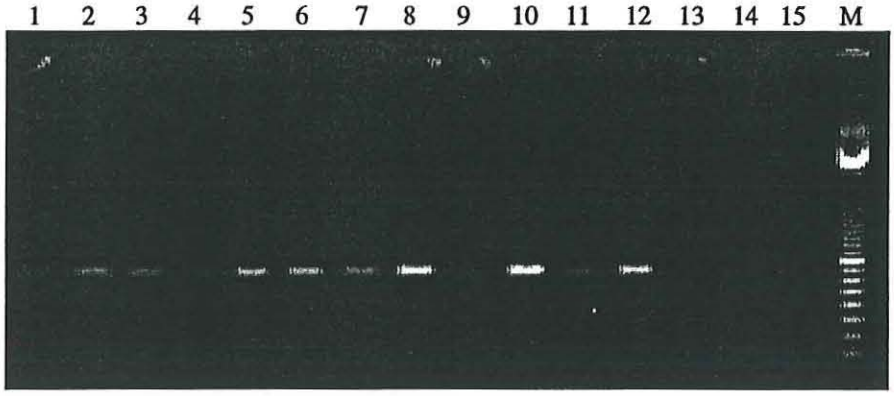
Voir page "Exemples de gels de contrôle" Figure 6 c.

Plusieurs enzymes ont été utilisées pour, dans un premier temps, les tester sur quelques individus afin d'évaluer la variabilité qu'elles révélaient pour chacune de ces deux espèces. Ensuite, j'ai orienté mon travail de manière à analyser le plus grand nombre d'individus disponibles par population. Certaines enzymes montrent des varations, on parle de «polymorphisme inter-spécifique» lorsque l'on compare des espèces différentes, au sein d'une même population, on parle de «polymorphisme intra-spécifique».

Figure 6 : Exemples de gels de contrôle d'extraction, d'amplification et de digestion



a : Migration des produits d'extraction ADN total d'une dizaine d'individus.



b : Migration de produits d'amplification.
On note la différence de qualité d'un individu à l'autre5 et 9,
certains ne seront pas utilisables 1 ,4, 9,11.

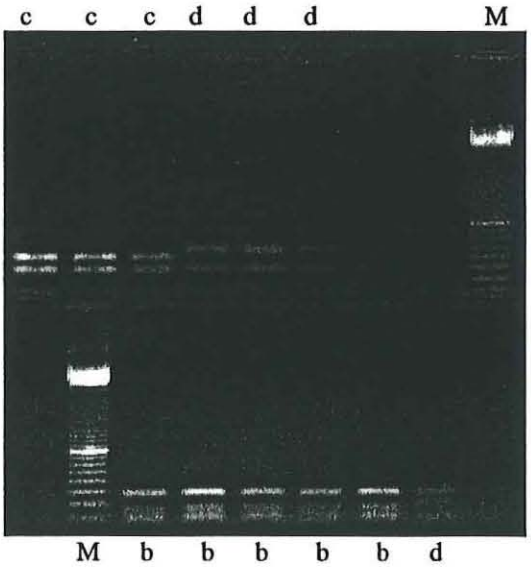


Figure n° : Visualisation de fragments d'ADN de digestion par l'enzyme TaqI pour les profils c et d comme noté dans le tableau et de fragments de digestion par l'enzyme MseI pour les profils noté b et d.

Individu	Pop/ origine	COI									Haplotype
		TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	AciI	RsaI	HaeIII	HindIII	SacI	
CA3	Spain	cc	cc	a	bb	b	c	c	a	a	A
CA4	Spain	cc	cc	a	bb	b	c	c	a	a	A
CA2	Spain	cc	cc	a	bb	b	c	c	a	a	A
CA1test	Spain	cc	cc	a	bb	b	c	c	a	a	A
CA6	Spain	c	c	a	b	b		c			A
CA7	Spain	c	c	a	b	b		c			A
CA8	Spain	c	c	a	b	b		c			A
CA5	Spain		cc	a	bb	b		c	a	a	A
CA1	Spain	c	**ddd**	a	bb	b	c	c	a	a	B
CA1n	Spain	c	c	a	b			c		a	A
CA2n	Spain	c	c	a	b			c		a	A
CA3n	Spain	c	c	a	b			c		a	A
CA5n	Spain	d									
Ca7n	Spain	c	c	a	b			c		a	A
Ca8n	Spain	c	c	a	b			c		a	A
Ca9n	Spain	c	c	a	b			c		a	A
CA5n	Spain	c									
CAP1	Portug	c			b						
CAP2	Portug	c			b						
CAP3	Portug		**d**		b	b					B
CAP4	Portug	c									
CAP5	Portug				b						
CAP6	Portug	c			b						
CAP7	Portug		c		b	b					A
CAP9	Portug				b						
CAP10	Portug	c	**d**		b	b					B
CAP11	Portug				b						
CAP13	Portug	c	c		b	b					A
CAP 14	Portug	c			b						
CAP 15	Portug										A
CAA10	Portug	c			b						A
CAA15	Portug	c			b						A

Individu	Pop/ origine	COI									Haplotype
		TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	AciI	RsaI	HaeIII	HindIII	SacI	
CG3test	Tremblade	d	cc	a	dd	b	c	c	a	a	C
CG1	Tremblade				d						C
CG2	Tremblade				d						C
CG3	Tremblade				d						C
CG4	Tremblade				d						C
CG5	Tremblade				d						C
CG6	Tremblade				d						C
CG7	Tremblade				d						C
CG8	Tremblade				d						C
CG9	Tremblade				d						C
CG1	Charente		cc	a	d			c	a	a	C
CG2	Charente		cc	a	d			c	a	a	C
CG3	Charente	d		a	d				a	a	C
CG4	Charente			a	d				a	a	C
CG5	Charente				b						C
CG6	Charente	c			d						C
CG10	Corée	d	ccc	a	ddd	b	c	c	a	a	C
CG2	Corée	d	cc	a	dd	b	c	c	a	a	C
CG3	Corée	d	cc	a	dd	b	c	c	a	a	C
CG5	Corée	d	c	a	**bb**	b		c	a		D
CG1	Corée		c	a	d	b		c	a		C
CG8	Corée	d	c	a	d	b		c	a		C
CG1	Conwy	d	c	aa	d			c	a		C
CG2	Conwy	dd	c	**bb**	d			c	a		E
CG3	Conwy	dd		aa	d						C
CG4	Conwy	dd		aa	d						C
CG5	Conwy	dd		b	d						E
CG6	Conwy	dd		a	d						C
CG7	Conwy	d			d						C
CG8	Conwy				d						C
CG9	Conwy				d						C
CG10	Conwy				d						C
CGA4	Portugal				d						C
CGA5	Portugal				d						C

Tableau 4 : Présentation des résultats obtenus pour l'ensemble des digestions effectuées.

Le polymorphisme est synonyme de mutations de l'ADN. La nature de ces mutations est une mutation ponctuelle d'une base du fragment amplifié, que l'enzyme de restriction ne peut donc pas reconnaître; ce que l'on peut observer pour les enzymes suivantes: *TaqI*, *Sau3A* chez *C. angulata.* De même, on observe du polymorphisme intra-spécifique avec d'autres enzymes: *MseI* et *HhaI* chez *Crassostrea gigas*. Ces résultats permettent d'établir des haplotypes que l'on a nommé arbitrairement A et B pour *Crassostrea angulata* et C, D et E pour *Crassostrea gigas.* Cf Tableau 4.

4.4 Discussion

Les différents profils ou RFLP que l'on a rencontré sont répertoriés ainsi que les haplotypes dans le tableau suivant :

Individu		Cytochrome oxydase									Haplotype
	Origine	TaqI	Sau3A	HhaI	MseI	AciI	RsaI	HaeIII	HindIII	SacI	
CA3	Espagne	c	c	a	b	b	c	c	a	a	**A**
CA1	Espagne	c	d	a	b	b	c	c	a	a	**B**
CG3 test	Tremblade	d	cc	a	d	b	c	c	a	a	**C**
CG5	Corée	d	c	a	b	b		c	a		**D**
CG2	Conwy (GB)	d	c	b	d			c	a		**E**

Tableau 5: Profils de restriction et haplotypes observés.

Les premières observations de marqueurs moléculaires sur *C. angulata* et *C. gigas* confirment les premiers résultats du Tableau 2 p16 sur un nombre d'individus faible, à savoir que l'on observe deux haplotypes pour *C. angulata* et de trois haplotypes pour *C. gigas*. Ceci ne permet pas de conclure sur le statut d'espèce de *Crassostrea angulata* par rapport à *Crassostrea gigas*.
Les observations se maintiennent quelque soit les populations étudiées (Cf Tableau 5), ce qui renforcent l'intérêt des marqueurs moléculaires en terme de diagnostics.
Cependant un individu *C. gigas* est intermédiaire puisqu'il présente un profil de *C. angulata.*
Cf figure n°6.

On dispose donc d'un outil permettant de distinguer les deux taxons.
En effet, en amplifiant le fragment de cytochrome oxydase et en le digérant avec les enzymes de restrictions *MseI* et *TaqI* on peut observer des profils différents permettant de discriminer *C. angulata* et *C.gigas*.
Du précédent tableau, on peut extraire une matrice permettant d'évaluer la variation d'un haplotype à l'autre:

		CA	CA	CG	CG	CG
		A	B	C	D	E
CA	A	-	**1**	**3**	**1**	**3**
CA	B		-	**2**	**2**	**4**
CG	C			-	**1**	**1**
CG	D				-	**2**
CG	E					-

CA = *Crassostrea angulata*
CG = *Crassostrea gigas*

Tableau 6: Matrice comptabilisant le nombre d'enzymes présentant des types différents pour l'ensemble des haplotypes observés.

Cette matrice a permis l'élaboration d'un arbre permettant de visualiser de quelle manière ces différents haplotypes ont pu évoluer.

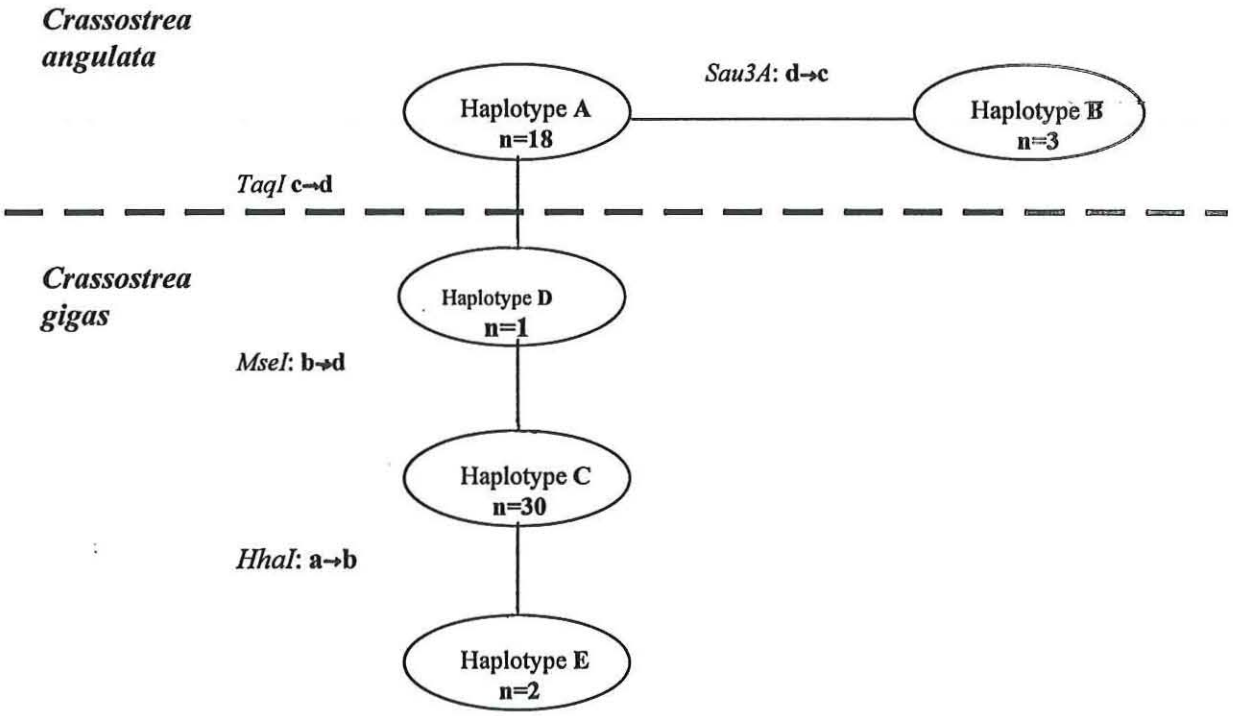


Figure n°7 : Réseau des mutations reliant les différents haplotypes
(n = nombre d'individus observés pour chaque haplotype)

Commentaire:

Le passage d'un haplotype à un autre se justifie par un changement de profil (RFLP) pour les haplotypes **A** et **B** sur le couple *C. angulata* et l'enzyme *Sau3A* puisque l'on observe un RFLP appelé **d** pour l'haplotype **A** et un RFLP **c** pour l'haplotype **B**.

Les RFLP des haplotypes **A** et **B** sont identiques pour l'enzyme de restriction *TaqI*. Ils caractérisent des spécimens identifiés *Crassostrea angulata*. Le passage des haplotypes **A** et **B** aux autres haplotypes **D**, **C**, et **E** s'explique par une différence de RFLP sur le couple *Crassostrea gigas* et l'enzyme *TaqI* de par l'identification faite avant les analyses. Le profil de ces spécimens est **d** contrairement à celui caractérisant les *C. angulata.*

Le passage d'un haplotype à un autre se justifie par un changement de RFLP pour les haplotypes **D** et **C** et sur le couple *C. gigas* et l'enzyme *MseI* puisque l'on observe un RFLP appelé **b** pour l'haplotype **D** et un RFLP **d** pour l'haplotype **C**. Le passage de haplotype C à l'haplotype E se justifie par un changement de RFLP sur l'enzyme *HhaI*, les RFLP étant **a** pour l'haplotype **C** et **b** pour l'haplotype **E**.

Cette figure montre que les mutations d'un haplotype à l'autre sont des événements apparemment uniques («non-récurrents»).

4.5. CONCLUSION

Cette étude a donc permit de déterminer des marqueurs moléculaires permettant d'identifier cinq haplotypes discriminant les espèces *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*. L'étape suivante pourrait être le séquençage de la cytochrome oxydase dans le but de comparer la séquence d'ADN de *Crassostrea angulata* à celle déjà connue de *Crassostrea gigas*. Ce qui permettrait d'envisager d'expliquer les mutations observées ainsi que les distances génétiques entre les espèces si ce statut est possible pour *C. angulata.*

5. Quel intérêt pour la profession?

Ce sujet d'étude est très intéressant pour les scientifiques et pour toutes les personnes proches de ce milieu. Mais le monde scientifique n'est pas le seul concerné par ce programme. Ma curiosité est donc portée vers les professionnels pour connaître leur opinion. J'ai ainsi envisagé d'en rencontrer quelques-uns, en leur proposant une présentation du programme concernant le "conservatoire de souches" et quelques questions dont je présenterai une synthèse dont la forme du questionnaire est en Annexe 7.

5.1 Qui sont ces exploitants?

Le choix des exploitants a été fait en fonction de la taille de leurs exploitations mais aussi de l'âge de leurs responsables afin de tenter d'avoir un éventail de personnes pouvant être représentatives de la profession. Certains d'entre eux ont souhaité l'anonymat.

	Localité	Tonnage Production
Mme X	La Tremblade	25-30t
Melle Taforêt Isabelle	Bourcefranc	16-20t
M. Y	La Tremblade	12t
M. Z	La Tremblade	200-300t
M. Philippe Hédouin	Marennes	6t

5.2 Synthèse des réponses

Questionnaire en annexe 7.
Question n° 1 :

Pour vous, le problème de la connaissance des espèces est-il réel? Pensez- vous qu'il y ait des personnes prêtes en ce moment à introduire de façon illégale des huîtres d'ailleurs? Si oui, pensez vous qu'il y ait des risques ?

Dans l'ensemble, les professionnels sont peu soucieux de la connaissance des espèces. Pour le moment la (*Crassostrea) «gigas* est là», elle répond relativement bien à leur demande. Pour la majorité des personnes rencontrées, les professionnels ne seraient pas prêts à introduire une nouvelle espèce. L'avis majoritaire est que si la production est menacée, les professionnels pourraient être amenés à introduire une autre espèce sans contrôle pathologique . L'ensemble des ostréiculteurs (rencontrés) sont conscients des risques occasionnés par une introduction officieuse. Les exemples du passé sont encore très présents à leur esprit.

Question n°2 :

Quelles sont les critères d'une huître intéressante alors que l'on ne parle que de mortalités et que la pousse n'est plus la même (la croissance, la résistance aux maladies)?

Les critères d'une huître intéressante sont:

- la capacité de croissance, de reproduction en qualité et en quantité;
- le potentiel de croissance permettant une production pouvant répondre à la demande;
- "une qualité de chair permettant d'avoir une huître bien remplie";
- "une huître qui ne mature pas au moment de la vente";
- une résistance aux maladies (tout agent pathogène confondu);
- adaptabilité à la pousse en claire plus importante que chez *gigas*.

Remarque:

Deux personnes soulèvent le critère de la forme de la coquille et de sa qualité, qui doit être en forme de poire pour M. Z cependant M. Hédouin pense qu'elle devrait ressembler à la *C. gigas* ou à une plate.
Une minorité pense qu'il vaudrait mieux une espèce ayant une croissance inférieure mais avec tous les autres critères.

Question n°3 :

Dans le cas où une espèce semblerait plus intéressante à élever que la japonaise seriez-vous prêt à la mettre en élevage ?

La mise en élevage d'une nouvelle espèce serait acceptée à l'unanimité dans des conditions expérimentales dans le but de comparer les performances de celle-ci avec *C. gigas*. Ils pensent qu'il ne faudrait pas opérer un changement brutal.

Question n°4 :

Votre expérience vous permet-elle de juger si la qualité des Crassostrea gigas d'aujourd'hui est moins bonne qu'à leur arrivée ? Si oui, pourquoi ?

La profession pense que l'espèce ne s'est pas dégénérée depuis son introduction.
Les résultats qu'ils obtiennent sont un peu inférieurs par rapport au passé à cause des conditions de milieu qui se sont modifiées, de la densité mise en élevage qui a augmenté. "A son arrivée, *C. gigas* n'avait pas d'huîtres en compétition. Alors que maintenant, il y a beaucoup de naissains et donc d'huîtres sauvages". "Le captage anarchique" est aussi mis en cause.

Question n°5 :

Sachant qu'une telle étude va demander du temps avant de fournir des résultats directement utilisables, pensez-vous qu'elle arrive trop tard ?

Dans l'ensemble les professionnels pensent que ce programme est un peu tardif mais ils pensent qu'il n'est pas trop tard car la souche *C. gigas* est saine, et que ses performances satisfont leurs attentes.
Nombreux pensent qu'"à l'époque l'ISTPM n'avait pas les moyens de traiter ces problèmes mais par contre qu'il est bien que l'on s'en occupe".

Question n°6 :

De quelles façons souhaiteriez-vous être informer des travaux génétiques à l'IFREMER ?

Les professionnels rencontrés souhaitent vivement suivre les travaux entrepris par "le conservatoire de souches". Ils pensent que l'information pourraient se faire par l'intermédiaire du journal professionnel local: "l'Echo des cabanes" sous la forme d'une ou deux pages environ deux fois par an. Nombreux pensent que la profession commence à changer et que "ces relations vont s'améliorer du fait qu'il y est de plus en plus de jeunes qui ont suivi des études et qui reprennent la profession de leurs parents".

5.3. CONCLUSION

A l'heure actuelle, l'introduction de nouvelles espèces motives peu l'intérêt des ostréiculteurs qui ne semblent pas avoir de problèmes importants avec *C. gigas*. Chacun pense qu'il faut essayer de communiquer plus entre ces deux mondes et pas uniquement lorsque la situation est grave.
Malgré que *C. gigas* convienne aux professionnels actuellement, tous parlent avec nostalgie de *C. angulata* et acceptent chaleureusement que l'on travaille sur cette espèce.

6. Technicien supérieur en productions aquacoles et recherches appliquées

6.1 Insertion d'un stagiaire dans une unité de recherche appliquée

La recherche appliquée concerne les applications éventuelles de la science. Dans mon cas, c'est la recherche de marqueurs moléculaires afin d'identifier des espèces en vue de permettre la pérennité d'une profession: l'ostréiculture.

Cette période de stage de 10 semaines dans une unité de recherche appliquée en génétique m'a permis de découvrir plusieurs aspects de cette activité. Par exemple, le travail sur des animaux vivants surtout dans certains domaines comme la sélection génétique, les tentatives d'hybridations, l'acclimatation de nouvelles espèces.... Pour les unités de recherche de ce type, le suivi zootechnique représente une charge importante. Les chercheurs sont contraints de consacrer beaucoup d'énergie à ces tâches, parfois au détriment de l'avancement de leur travaux de recherche.

Les techniciens sont intégrés à la recherche appliquée. C'est pourquoi cette expérience a été réalisable dans mon cas. J'ai aussi abordé le travail en équipe. Mon manque de connaissances en techniques de laboratoire (biologie moléculaire) a été compensée par celles de zootechnie. J'ai pu m'enrichir par la pratique et l'utilisation de matériel sophistiqué.

La possibilité qui m'a été offerte d'intégrer ce type de programme de recherche n'est que le résultat de la volonté de tous. Les efforts ont été dans les deux sens, volonté de transmettre et de recevoir les connaissances et les savoir faire. La difficulté de cette étude résidait dans son niveau de spécificité.

Cette expérience montre qu'un technicien est intégrable dans une unité de recherche. Son rôle en matière de travaux de recherche ne peut se situer que dans l'application de techniques qui

lui ont été transmises, à partir d'un protocole qu'il aura compris et maîtrisé. Les résultats ne peuvent pas toujouors être interprétés par lui seul et il lui faut l'aide des chercheurs car le technicien n' a pas toutes les connaissances nécessaires.

.2. Ces techniques ont-elles d'autres applications?

La technique de PCR que j'ai pu utiliser au sein de cette unité a d'autres applications. Elle est notamment utilisée en pathologie pour la détection de virus, pour le diagnostic de l'herpès virus chez les huîtres. Ce sont alors des techniques de diagnostic. Cette expérience ouvre des perspectives au technicien en vue de la recherche d'un emploi.
Dans le cadre de cette formation du Certificat de Spécialisation en Aquaculture, j'ai donc pu aborder des techniques de pointe.

7. Conclusion

L'étude de la bibliographie montre que les techniques utilisées pour distinguer ces deux espèces sont insuffisantes. L'évolution des technologies en matière d'analyses génétiques ouvrent de nouvelles perspectives.

La recherche de marqueurs moléculaires réalisée sur les *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*, par amplification (PCR) d'ADN mitochondrial et l'utilisation d'enzymes de restrictions a permis d'observer cinq haplotypes pour ces taxons permettant de les distinguer. Cette technique s'avère plus performante que celles utilisées précédemment par les études morphologiques, physiologiques, et génétiques (allozymiques).

Le conservatoire de souches de La Tremblade tend à disposer d'outils dans le but d'identifier des espèces. Les applications de ces outils sont dans un premier temps d'ordre scientifique et dans un second temps on peut envisager leur mise en pratique pour la production. Cette étude méritait donc d'englober l'avis de quelques professionnels à titre d'exemple.

Références Bibliographiques

Ahmed M., (1973) Cytogenetics of oysters. Cytologia, 38, 337-346.

Ahmed M. (1975). Speciation in living oysters. *Adv. Mar. Biol.* **13**: 357-397.

Arakawa K.Y. (1990). Commercially important species of oysters in the world. *Mar. Behav. Physiol.*, **17**: 1-13.

Banks M. A., Hedgecock D. (1993). Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **2**(3): 129-136.

Barre D. (1981). Implantation de *Crassostrea gigas* (Thumberg)Dans le bassin de Marennes Oléron, Thèse école vétérinaire de Toulouse n°31.

Biocca E., Matta G. (1981). *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), synonyme de *Crassostrea gigas* (Thumberg, 1793): études morphologiques et génétiques.

Bougrier S., Raguenes G., Tigé G. et Grizel H. (1986). Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France. Résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. angulata - C. gigas*. C.M. 1986/F: 38 Mariculture Comittee Séance S.

Burocker N.E., Hersberger W.K., Chew K.K.: (1979). Population Genetics of the Family Ostreidae. I. Intraspecific Studies of Crassostrea gigas and Saccostrea commercialis.- *Mar. Biol.* **54**: 157-169.

Burocker N.E., Hersberger W.K. et Chew K.K. (1979) Population Genetics of the Family Ostredae.II. Interspecific Studies of the genera Crassostrea and Saccostrea. *Mar Biol.* **54**: 171-184

Cochard J., Dardignac M.J. (1977). L'Ile d'AIX, IV Faune :La conchyliculture, Annales de la société des Sciences Naturelles de la Charente-Maritime Supplément.

Comps M., (1969) Observations relatives à l'affaction branchiales des huîtres portugaises (Crassoistrea Lmk). Rev. Trav. Inst. Pêch. marit. 33:151-160.

Comps M., (1970) La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea,* caractéristiques et évolution des altérartions, processus de cicatrisation. Rev. Trav. Inst. Pêch. marit., 34: 23-44.

Comps M., (1972). Observations sur la résistance d'huîtres du genre *Crassostrea* au cours de la mortalité massive de 1970-1971 dans le bassin de Marennes Oléron. ICES CM 1972/K, 22pp.

Dardignac et Corbeil M-J., (1968). Etude de la reproduction des huîtres portugaises dans la Baie de Bourgneuf de 1964 à 1967. Rev. Trav. Inst. Pêch. marit. 32(4) : 387-396.

Deltreil J-P., (1973). Evolution et conséquences de la mortalité de *C. angulata* dans le bassin d'Arcachon et de l'estuaire de la Gironde de 1971 à 1973. ICES CM/K:14, 6 pp.

Folmer O., Black M., Hoech W., Lutz R. et Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxydase c subunit from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech* **3** (5): 294-299.

Gaffney P.M., Allen S.K. Jr, (1993). Hybridisation among *Crassostrea species*: a review. *Aquaculture* **116**: 1-13

Gerdes D. , 1983. The pacific oyster *Crassostrea gigas* part II. Oxygen consumption of larvae and adults. Aquaculture 31, 221-231.

Grizel H., Héral M. (1991). Introduction of japanese oyster (*Crassostrea gigas*) *J. Cons. int. Explor. Mer*, 7: 399-403.

Heral M., Deslou-Paoli J.M.,et ProuJ., (1986) Analyse historique de la production conchylicole du bassin de Marennes-Oléron (France). 4ème colloque scientifique interdisciplinaire Franco-Japonais océanographie, Marseille, 16-21 septembre 1985.

His, E (1972). Premiers élèments de comparaison entre l'huître portugaise et l'huître japonaise.-Science et pêche, Bull. Inst. Pêches marit., n°219.
Lee K. et Chin P. (1981) Effects of body size temperature-salinity and starvation on the rates of filtration in *Crassostrea gigas* and *Mythilus edulis*. Publ. Inst. Mar. Sci. Nat.fish., Univ. Busan 13 : 37-41.

Imai T.and Sakai S. (1961). Study of breeding of japanese oyster Iredale, T. and Roughley, T.C. (1933). The scientific name of commercial oyster of new South Wales. Proceeding of Linnaean Society, New South Walezs, 58, 278.

Legall J.Y.(coord.) Génétique moléculaire médicale. Formation produite par le centre nationale d'Enseignement à Distance (CNED) et l'Université de Rennes 1, diffusée par le pôle Européen d'Enseignement à Distance (Pôle EAD). .

Menzel R. W. (1974). Portuguese and Japonese oysters are the same species. J. Fisheries Res. Board Canada , **31**: 453-456.

O Foighil D., Gaffney P.M., Hilbish T.J (1995). Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American (*Crassostrea virginica* (Gmelin) and Asian (*C. gigas* (Thumberg) C. ariakensis Wakiya) oyster species. Jornal of Experimental **Mar. Biol. Ecol. 192**: 211-220.

Stenzel, H. B. (1971). Oysters. in " Treatise on invertebrate Paleontology". N 953-N 1224 pp. Part N, Vol. 3 (of 3), Molluscaz 6, (K. C. Moore, ed.) Geological Society of America Inc. and the University of Kansas. Boulder, Colorado.

Van Thilbeurgh V. (1994) L'huître, le biologiste et l'ostréiculteur. Lectures entrecroisées d'un milieu naturel. L'Harmattan Logiques sociales.

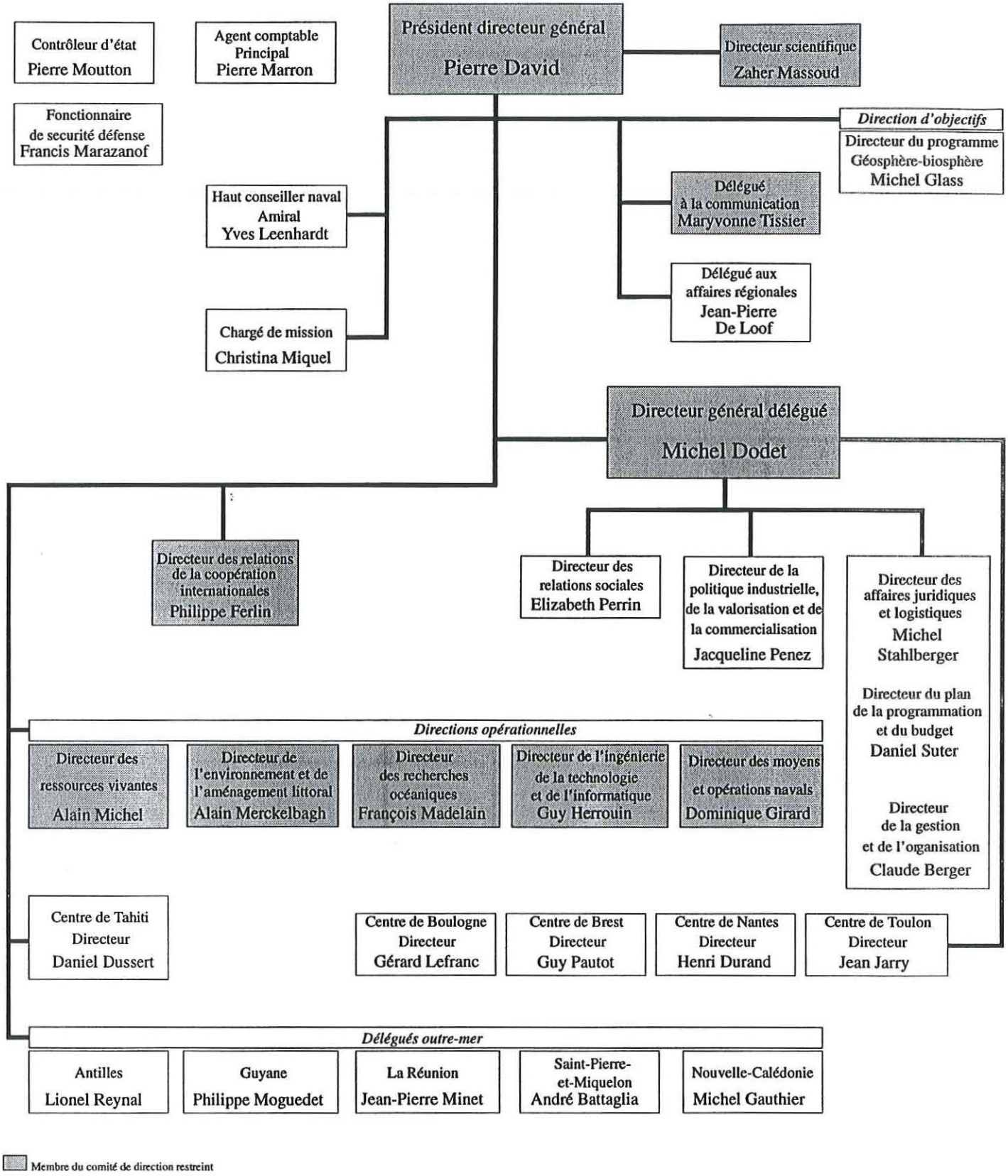
Annexes

Annexe 1 : Implantation d'IFREMER
Annexe 2 : Organnigramme : structure interne d'IFREMER
Annexe 3 : Correspondance
Annexe 4 : Protocole d'extraction au phénol chlorophorme
Annexe 5 : Protocoles d'amplification et digestion par enzymes de restriction
Annexe 6 : Solutions utilisées
Annexe 7 : Enquête avec les profesionnels

Annexe 1

Implantation Ifremer

Annexe 2


Contrôleur d'état
Pierre Moutton
Agent comptable Principal
Pierre Marron
Président directeur général
Pierre David
Directeur scientifique
Zaher Massoud
Fonctionnaire de securité défense
Francis Marazanof
Direction d'objectifs
Directeur du programme Géosphère-biosphère
Michel Glass
Haut conseiller naval
Amiral
Yves Leenhardt
Délégué à la communication
Maryvonne Tissier
Délégué aux affaires régionales
Jean-Pierre De Loof
Chargé de mission
Christina Miquel
Directeur général délégué
Michel Dodet
Directeur des relations de la coopération internationales
Philippe Ferlin
Directeur des relations sociales
Elizabeth Perrin
Directeur de la politique industrielle, de la valorisation et de la commercialisation
Jacqueline Penez
Directeur des affaires juridiques et logistiques
Michel Stahlberger
Directeur du plan de la programmation et du budget
Daniel Suter
Directeur de la gestion et de l'organisation
Claude Berger
Directions opérationnelles
Directeur des ressources vivantes
Alain Michel
Directeur de l'environnement et de l'aménagement littoral
Alain Merckelbagh
Directeur des recherches océaniques
François Madelain
Directeur de l'ingénierie de la technologie et de l'informatique
Guy Herrouin
Directeur des moyens et opérations navals
Dominique Girard
Centre de Tahiti
Directeur
Daniel Dussert
Centre de Boulogne
Directeur
Gérard Lefranc
Centre de Brest
Directeur
Guy Pautot
Centre de Nantes
Directeur
Henri Durand
Centre de Toulon
Directeur
Jean Jarry
Délégués outre-mer
Antilles
Lionel Reynal
Guyane
Philippe Moguedet
La Réunion
Jean-Pierre Minet
Saint-Pierre-et-Miquelon
André Battaglia
Nouvelle-Calédonie
Michel Gauthier
Membre du comité de direction restreint

Annexe 3

REPUBLIQUE FRANCAISE
MINISTERE DE LA CULTURE
PREFECTURE DE LA REGION BRETAGNE

DIRECTION REGIONALE
DES AFFAIRES CULTURELLES
SERVICE REGIONAL DE L'ARCHEOLOGIE
6, rue du Chapitre
35044 RENNES CEDEX
Tél. : standard 99.84.59.00
télécopie 99.84.59.19

RENNES, le 25 mars 1996

Archéo. N° 0688
Affaire suivie par : O. KAYSER
Tél. : 99.84.59.01

OK/MB/AP

Madame,

Comme suite à votre en courrier du 1er mars 1996, j'ai l'honneur de vous faire savoir que, concernant la Bretagne, des huîtres creuses (*gryphea angulata* dans la littérature archéologique) sont présentes dans les amas coquilliers mésolithiques de Téviec et Hoëdic, dans le Morbihan, et de La Torche dans le Finistère. Ces amas sont attribuables au VIème Millénaire avant J.-C., ce qui est un élément pouvant vous permettre d'écarter l'hypothèse d'une introduction à la fin du Moyen-Age.

Par ailleurs, des huîtres creuses sont également connues sur plusieurs sites gallo-romains de la région, ce qui confirme le point précédent.

Je vous prie d'agréer, Madame, l'expression de mes sentiments les meilleurs.

Le Conservateur Régional
de l'Archéologie

Michel VAGINAY

Madame Florence CORNETTE
IFREMER / URGE
B.P. 133
17390 LA TREMBLADE

Annexe 4
PROTOCOLES

EXTRACTION

1ère étape :

400 µL de tampon d'extraction
5 µL de protéinase K
+ le morceau de tissus duquel on veut extraire l'ADN

Laisser à 55°C pendant une nuit

2ème étape :

Ajouter 500 µL de phénol
Agiter
Centrifuger à 10000 tr/mn pendant 10 mn
Récupérer la phase supérieure
Ajouter 1 mL d'un mélange chloroforme-alcool isoamylique (24:1)
Agiter
Centrifuger 10000 tr/mn
Prélever le surnageant

3ème étape :

Y ajouter 400 mL d'éthanol 100% à -20°C
Laisser précipiter 1 heure à -20°C
Centrifuger 10000 tr/mn pendant 10 mn
Lavage éthanol à 70% à -20°C
Séchage et redissolution dans 150 µL de TE

Annexe 5

Protocole

d'après O Folmer 1994.

Volumes des différents réactifs pour une amplification

(pour un produit d'extraction à 5%):

Tampon (10X)	5µL
$MgCl_2$ (25 mM)	3µL
solution de dNTP (2 mM chaque)	5µL
Amorce 1 (LCO1490)	1µL
Amorce 2 (HCO2198)	1µL
ADN polymérase Taq (5U/µL)	0.3µL
solution diluée d'ADN à amplifier (5%)	2µL
H_2O milliQ	qsp 50µL

Déroulement des cycles d'amplification :

2 minutes à 94°C	Dénaturation initiale
1 minute à 94°C 30 secondes à 50°C 2 minutes à 72°C	} Cycle répété 30 fois
7 minutes à 72°C	Elongation finale

DIGESTION

Solution tampon 10X	2 µL
Enzyme de restriction	0.5 µL
BSA (10mg/ml)	0.2 µL ou 0 selon l'enzyme
H_2O milliQ	qsp 13 µL
Produit de PCR	7 µL

La réaction à 37°C (excepté pour Taq I à 55°C) pendant 1 à 2 heure.

Annexe 6

Solutions utilisées:

Solution tampon:

TE: 10mM Tris-base (pH8)
1mM EDTA (pH8)

TAE : 0.04 M Tris-acétate (pH8)
0.001 M EDTA (pH8)

Tampon d'extraction :

10mM tris-Cl (pH8)
0.1mM EDTA (pH8)
0.5% SDS
+5µL de protéinase K

Bleu de charge:

0.25% bleu de bromothymol
0.25% cyanol xylène
40% (W/V) sucrose
H_2O

Annexe 7 Questionnaire proposée par

Mlle Florence Cornette, Etudiante au CEMPAMA (Centre d'Etude du Milieu et de Pédagogie Appliquée du Ministère de l'Agriculture.)
Stage effectué dans l'Unité de Recherche en Génétique, IFREMER, La Tremblade du 18/2/96 au 11/5/96.

Sujet de ce questionnaire :

LES RELATIONS ENTRE LES PROFESSIONNELS ET LES SCIENTIFIQUES: INTERET DES RECHERCHES EN GENETIQUE POUR LA PROFESSION OSTREICOLE.

Dans le cadre de mon stage, je travaille sur la distinction entre l'huître portuguaise *Crassostrea angulata* et l'huître japonaise Crassostrea *gigas.* Ces huîtres "portugaises" proviennent du sud de l'Europe (Espagne et Portugal) où elles subsistent encore. La question de savoir si *angulata* et *gigas* sont vraiment deux espèces différentes est encore âprement discutée, personne ne pouvant les distinguées à coup sur les unes des autres. De plus, il est bien connu que les deux s'hybrident et que ces hybrides sont fertiles.

Ce stage s'intègre dans un programme intitulé : "Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea* : hybridations et conservatoire de souches", réalisé au sein de la Station IFREMER de La Tremblade. Il a pour but :

- L'étude des potentialités d'acclimatation dans les eaux françaises d'huîtres de différentes espèces dans le but d'identifier celles qui pourraient se substituer à *Crassostrea gigas* dans le cas d'une nouvelle épizootie, ou dans le but de diversifier la production.
- L'étude des possibilités d'hybridations inter-spécifiques entre huîtres creuses, ainsi que l'étude des performances (croissance, fertilité) des hybrides obtenus.
- La différenciation génétique (intra- et inter- spécifique) au sein du genre *Crassostrea.*

Pour répondre à ces objectifs, l'équipe de génétique travaille sur la recherche de marqueurs moléculaires permettant de distinguer les différentes espèces et leurs hybrides. Il s'agit de techniques permettant d'étudier les caractéristiques de l'ADN pour chaque espèce, particulièrement utiles dans le cas d'espèces d'apparence similiaire. Cette étape est nécessaire avant l'acclimatation de nouvelles espèces. Ces travaux visent aussi à détecter les importations frauduleuses. Ce conservatoire de souches est soutenue par la région Poitou-Charentes qui lui apporte une aide financière.

Dans le cadre de ce travail je souhaiterais que vous repondiez aux questions suivantes :

1) Pour vous, le problème de la connaissance des espèces est-il réel ? Pensez-vous qu'il y ait des personnes prêtes en ce moment à introduire de façon illégale des huîtres d'ailleurs. Si oui, pensez vous qu'il y ait des risques ?

2) Quelles sont les critères d'une huître intéressante alors que l'on ne parle que de mortalités et que la pousse n'est plus la même (la croissance, la résistance aux maladies) ?

3) Dans le cas où une espèce semblerait plus intéressante à élever que la japonaise seriez-vous prêt à la mettre en élevage ?

4) Votre expérience vous permet-elle de juger si la qualité des *Crassostrea gigas* d'aujourd'hui est moins bonne qu'à leur arrivée ? si oui pourquoi ?

5) Sachant qu'une telle étude va demander du temps avant de fournir des résultats directement utilisables, pensez-vous qu'elle arrive trop tard ?

6) De quelles façons souhaiteriez-vous être informer des travaux génétiques à l'IFREMER ?

Merci pour votre gentillesse.

GLOSSAIRE

ADN:
Macromolécule formée de désoxyribonucléotides, qui constitue le matériel génétique de toutes les cellules eucaryotes (noyau, mitochondrie, chloroplastes); elle est donc le support essentiel de l'information génétique.

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

Enzyme:Substance organique soluble qui catalyse une réaction biochimique. Petit Larousse.

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.
Gène lié: Gène dont le locus est situé suffisamment près de celui d'un autre gène pour qu'ils soient cotransférés lors de la reproduction sexuée.
Locus:
Sur un chromosome, emplacement occupé par un gène.

Haplotype:En génétique animale, ensemble de gènes liés caractérisant la garniture chromosomique haploïde d'un reproducteur.

Mitochondrie:Organite cytoplasmique responsable du métabolisme énergétique de la cellule; il est le lieu de la phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP. Il contient de l'ADN et est donc autoreproductible.

Polymorphisme: exprime la variabilité de la morphologie ou de type.

Définitions extraites du dictionnaire de génétique. Conseil international de la langue française.