

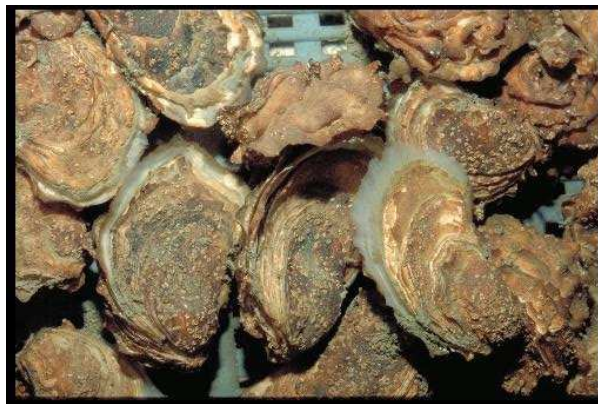


Université de La Rochelle
Pôle Sciences et Technologie
Avenue Michel Crépeau
17042 La Rochelle



IFREMER
Laboratoire de génétique et pathologies
Station de la Tremblade
Avenue du Mus de Loup
Ronces les Bains
17390 La Tremblade

UTILISATION DES MARQUEURS MICROSATELLITES AFIN
DE VERIFIER LA NATURE GYNOGENETIQUE DE NAISSAINS
PRODUITS DANS LE BUT D'ETABLIR DES LIGNEES
CLONALES CHEZ L'HUITRE CREUSE *Crassostrea gigas*



Photographie IFREMER

Maître de stage : Abdellah BENABDELMOUNA
Responsable pédagogique : Thierry MAUGARD

Hélène PRUGNOT
Licence 3 Sciences de la Vie
Mention Biochimie

Année universitaire 2007/2008

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Jean PROU pour m'avoir accueillie au sein de la station IFREMER de La Tremblade, Mr Tristan RENAULT pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein du laboratoire de génétique et pathologie ainsi que toute l'équipe de l'IFREMER.

Je souhaite notamment remercier Serge HEURTEBISE qui m'a formé pour toutes les techniques que j'ai pu utiliser pendant mon stage, me permettant ainsi d'être autonome. Je le remercie également ainsi que Christopher SAUVAGE pour leur aide au sujet des marqueurs microsatellites.

Je remercie particulièrement mon maître de stage Abdellah BENABDELMOUNA pour ses conseils, ses explications et sa disponibilité.

Enfin je souhaite remercier l'université de La Rochelle pour ma formation et sans qui je n'aurais pu réaliser ce stage.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE	1
PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL	2
INTRODUCTION	3
I. MATERIEL ET METHODE	5
I.1. Production des familles d'huîtres et prélèvement des échantillons.....	5
I.2. Extraction de l'ADN	5
I.3. Electrophorèse.....	6
I.4. Détermination de la concentration en ADN	6
I.5. Amplification par PCR.....	7
I.6. Analyse de la nature gynogénétique par séquenceur	8
<u>I.6.a. Recherche d'individus gynogénétiques.....</u>	<u>11</u>
<u>I.6.b.Diversité allélique</u>	<u>11</u>
II. RESULTATS.....	12
II.1. Recherche des individus gynogénétiques	12
II.2. Détermination du type de gynogenèse utilisée pour produire les individus gynogénétiques.....	15
II.3. Diversité allélique	15
<u>II.3.a. Etude de la diversité allélique en fonction des marqueurs microsatellites</u>	<u>15</u>
<u>II.3.b. Etude de la diversité allélique en fonction des familles gynogénétiques</u>	<u>17</u>
III. DISCUSSION ET CONCLUSION	20
BIBLIOGRAPHIE	22

GLOSSAIRE

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
BET :	Bromure d'Ethidium
LCR :	Laboratoire Communautaire de Référence
LNR :	Laboratoire National de Référence
FAO :	Food and Agriculture Organization
STR :	Short Tandem Repeat
SSR :	Single Sequence Repeat
pb :	paires de bases
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Tm :	Température d'hybridation
UV :	Ultraviolets

PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER) est un organisme public créé en 1984 et qui résulte de la fusion du Centre National d'Exploitation pour les Océans (CNEXO) et de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM). L'IFREMER participe à la connaissance des océans et de leurs ressources, à la surveillance du milieu marin et littoral et au développement durable des activités maritimes. Il est placé sous la tutelle conjointe des ministères chargés de la Recherche, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Équipement et des Transports, de l'Écologie et du Développement durable. L'IFREMER est présent sur le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM, il est structuré en 5 centres (Boulogne, Brest, Nantes, Toulon et Tahiti) et comprend une vingtaine de stations rattachées à ces centres dont la station de La Tremblade où s'effectue le stage. Ce site est composé de deux laboratoires, un laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais rattaché au département Environnement littoral et Ressources aquacoles et un laboratoire Génétique et Pathologies du département Amélioration génétique, Santé animale et Environnement où a lieu le stage. Le laboratoire de Génétique et Pathologie développe depuis 20 ans des travaux de recherche dans le domaine de la génétique et de la pathologie chez les mollusques d'intérêt commercial. Il est impliqué dans l'acquisition de connaissances concernant l'amélioration génétique, notamment par la sélection ou la modification du niveau de ploïdie, le contrôle des performances et la santé des espèces d'intérêt en aquaculture marine. Les travaux menés au sein du laboratoire sont aujourd'hui reconnus mondialement et ont permis des avancées certaines dans le domaine de la conchyliculture (huîtres triploïdes, développement d'outils de diagnostic, détection de nouveaux agents infectieux ...). Le laboratoire assure la surveillance des coquillages en terme de santé animale. Il opère également la surveillance des sites nationaux de captage d'huîtres en terme de ploïdie (réseau biovigilance). Ainsi, en plus de son positionnement régional fort, il a clairement une dimension nationale et internationale (LNR et LCR).

INTRODUCTION

En France, l'huître la plus répandue et la plus consommée est l'huître japonaise *Crassostrea gigas*, communément appelée « huître creuse ». Avec une production de 115 000 tonnes en 2003 (FAO, 2003) la France se classe au premier rang européen et au quatrième rang mondial derrière la Chine, le Japon et la Corée du sud. L'importance économique de cette huître a motivé le développement de recherches concernant sa biologie. Dans le cadre de ces projets de recherche, l'obtention de lignées uniformes et stables est une valeur importante. En effet, il est nécessaire de disposer de souches génétiques uniformes pour faciliter les recherches tant en génétique qu'en pathologie, immunologie ou physiologie. Pour développer de telles lignées, l'une des voies possibles est l'utilisation de la reproduction uni parentale : la gynogenèse.

La gynogenèse est un mode de reproduction dans lequel seul le génome maternel intervient. Processus naturel chez certains animaux, la gynogenèse peut également être induite. La méthode consiste à mettre en présence des ovocytes normaux et des spermatozoïdes inactivés (rayons X, irradiation aux ultraviolets, traitements chimiques). L'embryon se développe donc uniquement à partir du matériel génétique de la mère. L'embryon qui résulte de ce type d'induction est haploïde et non viable, il faut donc rétablir sa diploïdie en réalisant le doublement de son génome par un traitement destiné à inhiber l'expulsion de l'un des deux globules polaires (méiogynogenèse) ou la première division mitotique (mitogynogenèse). Des gynogenèses artificielles, réalisées sur différentes espèces aquacoles, ont permis de produire des lignées d'animaux consanguins, d'étudier le déterminisme sexuel et de réaliser des cartes génétiques (Purdom 1983 ; Fujino et al. 1990 ; Arai *et al.*, 1991 ; Beaumont and Fairbrother 1991 ; Fairbrother 1994). De plus, des études menées sur des larves de plusieurs espèces de mollusques ont montré que la gynogenèse permet de réduire le pool d'allèle au sein d'une population donnée et donc d'augmenter le taux d'homozygotie (Li et al., 2005). La confirmation de la réussite de la gynogenèse se fait en vérifiant la transmission uniquement maternelle du matériel génétique. Une telle confirmation nécessite l'emploi de marqueurs moléculaires fiables (polymorphes et codominants) tels que les microsatellites. Les marqueurs microsatellites sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont les motifs sont généralement composés de deux à six nucléotides. Ces marqueurs, également appelés STR (Short Tandem Repeat) ou SSR (Single Sequence Repeat), peuvent être utilisés afin d'estimer

le niveau de diversité génétique d'animaux produits par gynogenèse par rapport à une population sauvage de référence. Différents paramètres pourront être mesurés, comme le nombre d'allèles par locus, et l'hétérozygotie. Les microsatellites ont été identifiés dans la plupart des espèces eucaryotes et procaryotes étudiées. Leur répartition le long du génome reste aléatoire et leurs loci présentent un haut degré de polymorphisme à cause de la variation du nombre de répétitions du motif de base. Les motifs de base des microsatellites ne sont pas spécifiques d'un locus mais les régions qui les encadrent (régions flanquantes) le sont, ainsi une paire d'amorces spécifiques des régions flanquantes amplifie par PCR seulement un microsatellite.

Chez *Crassostrea gigas* différentes études ont été publiées à propos de la caractérisation et l'utilisation des marqueurs microsatellites (Huvet *et al.* 2000 ; Li *et al.* 2003 ; Hubert and Hedgecock 2004 ; Yamtich et al. 2005). La présente étude a pour but d'utiliser certains de ces marqueurs microsatellites afin de comparer des individus adultes produits par gynogenèse à des individus adultes issus de captages naturels pour vérifier la présence ou non d'individus gynogénétiques. Il sera également important de déterminer si les croisements utilisés ont permis de réduire le pool d'allèles dans les familles gynogénétiques. Dans un premier temps une partie *matériel et méthode* présentera les différentes analyses qui ont été réalisées, puis les résultats seront présentés. Dans un deuxième temps l'interprétation des résultats obtenus sera développée suivie d'une partie discussion et conclusion.

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Production des familles d'huîtres et prélèvement des échantillons.

Les huîtres creuses *C.gigas* utilisées ont été produites un an avant leur analyse. Les individus étudiés ont été produits par gynogénèse. La diploïdie est rétablie en utilisant la cytochalasine B qui est un agent antiméiotique agissant sur le degré de polymérisation des molécules d'actine en empêchant leur addition aux filaments sans inhiber la mitose. Afin d'étudier le matériel génétique des huîtres, des biopsies branchiales sont réalisées. Pour cela, les huîtres sont anesthésiées par balnéation dans une solution de 25% de $MgCl_2$. Une fois insensibilisées, une biopsie (5 mm^2) est réalisée au niveau d'un feuillet branchial en utilisant une paire de pinces stériles. La biopsie est ensuite placée dans un tube Eppendorf 1,5mL pour subir l'extraction d'ADN. Simultanément, un autre fragment branchial est également collecté pour faire une conservation dans l'éthanol 70° servant d'archive. Après l'anesthésie, les huîtres biopsiées sont replacées dans de l'eau de mer où elles continueront leur stabulation.

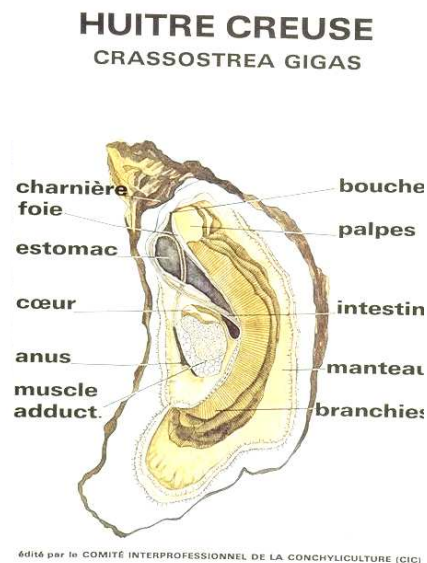


Figure 1 : anatomie de l'huître *Crassostrea gigas* (photographie IFREMER)

Les huîtres étudiées sont séparées en deux groupes, les animaux produits de façon gynogénétique et les animaux issus de captage naturel servant d'individus contrôles. Les animaux gynogénétiques sont divisés en trois familles A, B et C comprenant respectivement 30, 69 et 26 individus.

I.2. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait au moyen du *Kit promega-Wizard DNA clean up*. La première étape correspond à la lyse des cellules de l'échantillon afin de libérer l'ADN contenu dans les noyaux. Pour cela on utilise la protéinase K à 10 mg/ml et du tampon d'extraction CTAB (20 ml Tris-HCl 1M pH 8,0 ; 16,3g de NaCl ; 8 ml EDTA 0,5M ; 4g CTAB ; qsp 200 ml d'eau bi distillée). La protéinase K va digérer les tissus (hydrolyse des liaisons peptidiques) pendant une nuit au bain marie à 65°C. Ensuite, deux lavages au chloroforme isoamylalcool sont effectués pour séparer les protéines de l'ADN. Il se forme un disque de protéines à l'interface chloroforme/phase aqueuse. La dernière étape consiste à purifier l'ADN contenu dans le surnageant (phase aqueuse). Pour se faire, une micro-colonne est utilisée dans laquelle est injecté un mélange surnageant/résine. Ainsi, l'ADN est retenu sur la colonne et il est de ce fait séparé des autres protéines. Enfin la colonne est rincée avec de l'isopropanol et l'ADN purifié est élué en utilisant 50 microlitres de tampon Tris-EDTA.

I.3. Electrophorèse

Afin de contrôler la qualité de l'ADN extrait, une électrophorèse est réalisée au travers d'un gel d'agarose à 1% dans du TAE 1x et contenant 2,5 microlitres de bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant qui colore l'ADN et permet sa visualisation après une excitation sur table UV. Le gel est donc coulé dans un moule contenant un peigne afin de former les puits de dépôt. Avant le dépôt, un mélange comprenant 5 microlitres d'échantillon et 1,5 microlitres de bleu de charge est réalisé. Le bleu de charge contient du glycérol pour rendre les échantillons plus lourds que le tampon de migration, de plus la position du bleu de charge permet de visualiser la migration. Une fois le gel polymérisé, les échantillons sont déposés dans les puits. Les échantillons sont encadrés de part et d'autre par un marqueur de taille: la première bande apparaît à 1500 pb (paires de bases), la seconde à 1000 pb puis il y a une bande toutes les 100pb. La migration se déroule pendant 30 minutes environ (360mA ; 120V). A la suite de la migration on visualise la qualité de l'ADN grâce à la table à UltraViolet (UV).

I.4. Détermination de la concentration d'ADN

La concentration en ADN des échantillons est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm. Le témoin négatif (blanc) utilisé est composé uniquement d'eau bi distillée. L'échantillon est

dilué à 5% pour effectuer la mesure dans la gamme de lecture. En utilisant un programme approprié, la concentration réelle de l'échantillon est automatiquement déduite. Le dosage de l'ADN est une étape indispensable à l'amplification par PCR, en effet, cela permet de préparer une solution stock à 15 ng/μL pour chaque échantillon.

I.5. Amplification par PCR

L'amplification par PCR est une étape nécessaire pour pouvoir ensuite étudier le génome avec les marqueurs microsatellites. Pour amplifier exponentiellement les marqueurs ciblés, il est tout d'abord nécessaire d'annoter une plaque 96 puits et de préparer une solution contenant les marqueurs microsatellites et les différents réactifs qui vont constituer le mélange réactionnel (appelé Mix PCR).

Mix PCR : réactifs	Pour 30 cycles : 1 puit	
Buffer thermopol	1 μL	
dNTP (2mM)	1 μL	
MgCl ₂ (25mM)	0,3 μL	
Amorces des marqueurs microsatellites {	Primer 1 (forward)	0,12 μL
	Primer 2 (reward)	0,12 μL
Taq polymérase (5000 U/mL)	0,2 μL	
Eau distillée	5,76 μL	

Tableau 1 : composition du Mix de PCR

Dans chaque puit de la plaque sont déposés 8,5μL de Mix PCR et 1,5μL d'ADN. Les réactifs doivent être maintenus au frais pendant la préparation de la plaque. De la même façon la plaque doit être maintenue sur glace lorsque les dépôts sont réalisés. Ceci permet de conserver une activité maximale de la Taq polymérase avant l'amplification. L'amplification a lieu dans un thermocycleur disposant d'un programme spécifique pour chaque couple d'amorce microsatellite. En effet, il faut adapter le programme à chaque marqueur notamment la température lors de la phase d'hybridation qui peut changer d'un marqueur à l'autre.

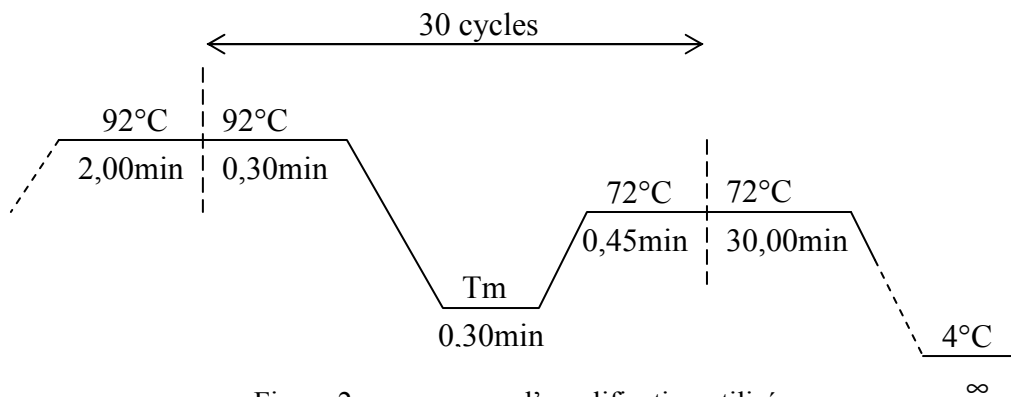


Figure 2 : programme d'amplification utilisé.

I.6. Analyse gynogénétique par séquenceur

L'analyse des marqueurs microsatellites est réalisée par un séquenceur Applied Biosystem® 3130xl Genetic Analyzer. Cet appareil possède 16 capillaires et peut au maximum étudier deux plaques de 96 puits en un peu moins de dix heures. L'analyse se déroule de la façon suivante : l'échantillon, ainsi que le tampon, sont prélevés successivement par les capillaires à partir des plaques à 96 puits. Les capillaires contiennent le gel de migration. L'électrophorèse permet de séparer les différents fragments selon leur taille, les plus petits passant en premier devant la fenêtre de lecture. Celle-ci est composée d'un laser d'excitation et d'un détecteur de la fluorescence émise. La lecture et l'interprétation des résultats sont réalisées avec le logiciel Genemapper®. La première étape de l'analyse consiste lorsque cela est nécessaire à replacer le marqueur de taille aux bonnes distances de migration.

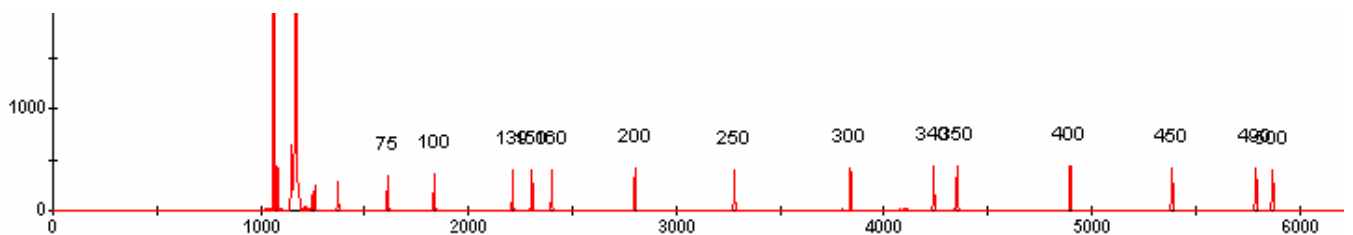


Figure 3 : marqueur de taille de bonne qualité

Sur cette figure sont représentés tous les pics nécessaires à l'analyse de la nature gynogénétique des individus. Les distances de migration sont associées aux pics par le logiciel, sur cet exemple l'association est de bonne qualité elle n'a pas à être retouchée.

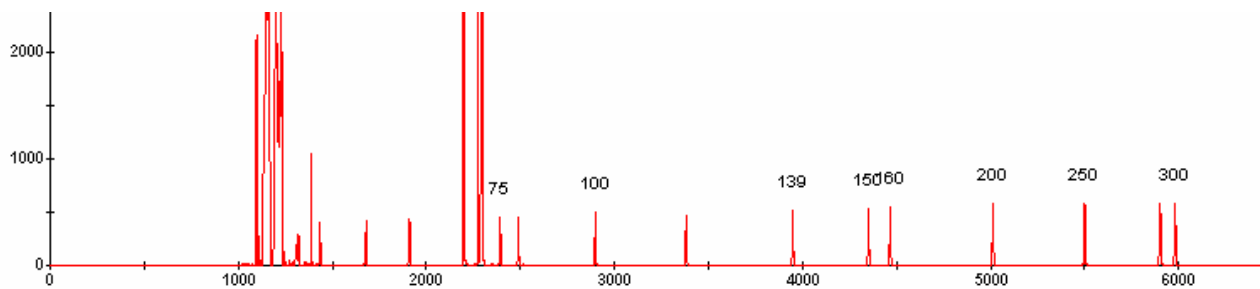


Figure 4 : marqueur de taille à remanier

Dans cet exemple, le logiciel n'a pas associé les distances de migration avec les bons pics, de ce fait l'association va devoir être effectuée manuellement afin d'obtenir le même profil que celui observé dans la figure 3.

La seconde étape de l'analyse consiste à étudier les profils des allèles.

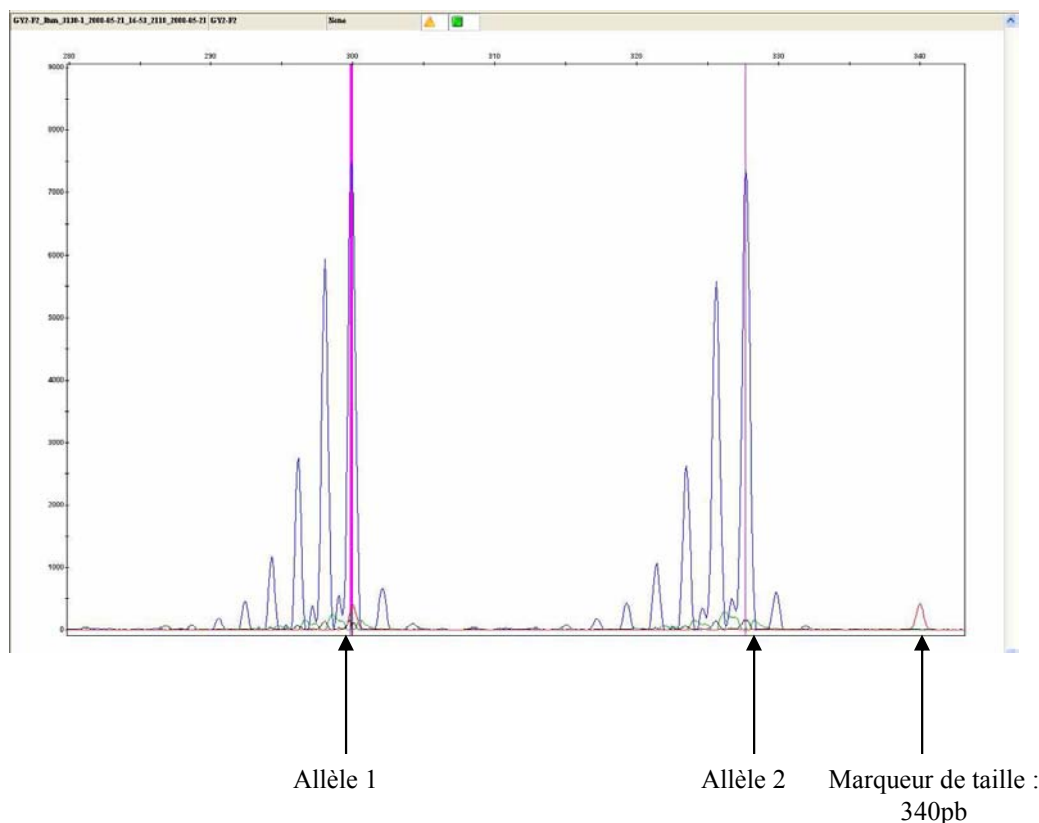


Figure 5 : exemple d'un profil allélique (femelle 1 famille C ; marqueur ucdCg 133)

L'axe des abscisses représente la distance de migration en pb, l'axe des ordonnées correspond à la hauteur du pic. Le pic possédant la hauteur maximale correspond à l'allèle. Il est à noter que la forme des allèles varie selon le marqueur utilisé.

Les marqueurs microsatellites sont choisis en fonction de leur localisation sur les groupes de liaisons (un marqueur par groupe) et de leur capacité à ne pas donner des allèles nuls qui ne peuvent pas être détectés par le séquenceur.

Marqueur	Motif répété	Séquence de l'amorce (5'-3')	Localisation (groupe de liaison)	Taille moyenne du produit de PCR (pb)	Tm (°C)
ucdCg 126	(TCTA)	TGGATTTGATCACCCCTTACA CCTGGATTCTGTGCGAGATT	I	174	55
ucdCg 160	(GA) (GACA)	GGAGCCATTAACAACACCACA TCTCTCCCTTCCCCCTCTTA	II	251	57
imbCg 049	(CA)	CATCAGGGGTAAATTAAGTAAGC CCACAGACGATTTCATATATCCTG	III	162	53
ucdCg 109	(CAT)	GCTATGGTTGTCATCCTCGAA TGCCTTTATCGGTTTTGCTT	III	202	53
ucdCg 120	(CA) (GA)	GGGTGAGATTTAGGGGGGAGA CTCCATCAAACCTGCCAAAC	IV	152	57
ucdCg 151	(GT)	AGGTAATCCGCAAACCAGTG GCATTGCGTCAGGATTAGGT	V	265	60
imbCg108	(CA)	ATATGTAATGATTACGAAACT GTATGAGATTTGGTTCCACC	VI	147	55
ucdCg 133	(CT)	GTTGGCGCAAATATAGGAA TGAACCTGTGATGTGCAGGA	VI	293	55
ucdCg 196	(GAT) (GAC)	CCTTTCATTTGGAGGTTACATTG ATCTTGCCATTTGCTTTTGG	VII	253	58
ucdCg 166	(TC)	CATCGGAATAAATCGGGTAA TTCCTTTGTGCTGTCTTACAGG	VIII	214	58
um2Cg L10	(AG)	GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC CATGTTTTCCCTTGACTGATCC	IX	136	55
ucdCg 171	(CAT)	CCACTCATAAGGGAAAATGAAA TCGTCGACCTTAAAACCTCGT	IX	249	50
ucdCg 181	(GT) (GA)	CACCCCAAAGGACCACATAC TGTCAGCATGGGTAAGTCCA	X	239	60

Tableau 2 : liste des marqueurs microsatellites utilisés

Pour analyser les échantillons, il faut placer dans chaque puit d'une plaque 96 puits (maintenue au frais sur de la glace) 12 µL de formamide, 0,25 µL de ROXTM et 1µL de produits de PCR. La formamide est un agent déstabilisant les liaisons hydrogènes et le ROXTM est un marqueur de taille. Une dénaturation rapide (96°C pendant 5 minutes) suivie

d'une centrifugation rapide (60 rcf pendant 30 secondes) sont ensuite réalisées respectivement pour réduire les risques de réhybridation et pour éliminer les bulles ayant pu se former. Les plaques contenant les échantillons sont ensuite introduites dans l'appareil. Une fois le schéma de plaque entré dans l'appareil celui-ci réalise l'analyse.

I.6.a. Recherche d'individus gynogénétiques

A partir des profils alléliques obtenus par le logiciel Genemapper® il est possible d'identifier les animaux gynogénétiques par comparaison entre les profils des parents femelles et ceux des descendants. Pour cela on repère grâce au marqueur de taille présent lors de l'analyse les distances de migration des allèles des parents femelles par rapport aux distances de migration des allèles chez les descendants. Grâce à ces résultats, la fréquence de recombinaison (y) pourra être estimée en divisant le nombre d'individus gynogénétiques hétérozygotes par le nombre d'individus gynogénétiques total.

Il sera alors également envisageable de déterminer le type de gynogenèse réalisée, en effet lorsque la diploïdisation a été réalisée par rétention du second globule polaire des individus hétérozygotes sont produits et on parle de méiogynogenèse ; lorsqu'on inhibe la première division de mitose des individus homozygotes sont obtenus, on parle alors de mitogynogenèse.

I.6.b. Diversité allélique

Afin de savoir si la production par gynogenèse des animaux a permis de réduire le nombre d'allèles dans les populations et donc d'augmenter la probabilité d'obtenir des individus homozygotes une étude statistique est réalisée. Celle-ci est effectuée par le logiciel Cervus2.0 et permet d'estimer le nombre d'allèle pour chaque locus ainsi que l'hétérozygotie observée. L'analyse se déroule sur une famille d'animaux gynogénétiques en utilisant neuf marqueurs microsatellites. Par comparaison avec la population issue de captage naturel, il sera possible d'estimer les avancées fournies en termes de réduction de la diversité allélique par la reproduction uni parentale effectuée au sein du laboratoire.

II. RESULTATS

II.1. Recherche des individus gynogénétiques

La recherche des huîtres *Crassostrea gigas* gynogénétiques est effectuée en utilisant deux marqueurs microsatellites. Pour chaque famille les individus suivants ont été identifiés comme gynogénétiques car ils possèdent le même profil allélique que la femelle. Il est à noter que lorsqu'une femelle et un mâle possèdent un allèle en commun, il sera considéré dans la descendance que l'allèle provient de la femelle.

Locus	Famille gynogénétique	Génotype des parents		Génotype des individus			total	Fréquence de recombinaison (y)
		Femelle	mâle	aa	ab	bb		
imbCg 049	A	139/163 (ab)	137/147 (cd)	0	2	1	3	0,67
	B	140/175 (ab)	132/142 (cd)	0	6	0	6	1,00
	C	139/146 (ab)	133/152 (cd)	0	2	0	2	1,00
ucdCg 181	A	243/254 (ab)	209/212 (cd)	0	5	0	5	1,00
	B	213/219 (ab)	220/226 (cd)	0	4	2	6	0,67
ucdCg 160	A	240/292 (ab)	244/276 (cd)	0	6	0	6	1,00
	C	363/380 (ab)	228/234 (cd)	0	2	0	2	1,00
ucdCg 166	A	202/215 (ab)	226/250 (cd)	0	4	0	4	1,00
ucdCg 109	A	200/214 (ab)	193/200 (ca)	0	4	0	4	1,00
ucdCg 126	A	124/159 (ab)	141/163 (cd)	0	4	0	4	1,00
	B	132/141 (ab)	132/155 (ac)	0	8	0	8	1,00
ucdCg 151	A	262/289 (ab)	268/285 (cd)	1	1	0	2	0,50
	B	250/258 (ab)	264/289 (cd)	0	2	0	2	1,00
ucdCg 120	A	140/153 (ab)	148/155 (cd)	0	3	0	3	1,00
	C	146/148 (ab)	156/158 (cd)	0	3	0	3	1,00

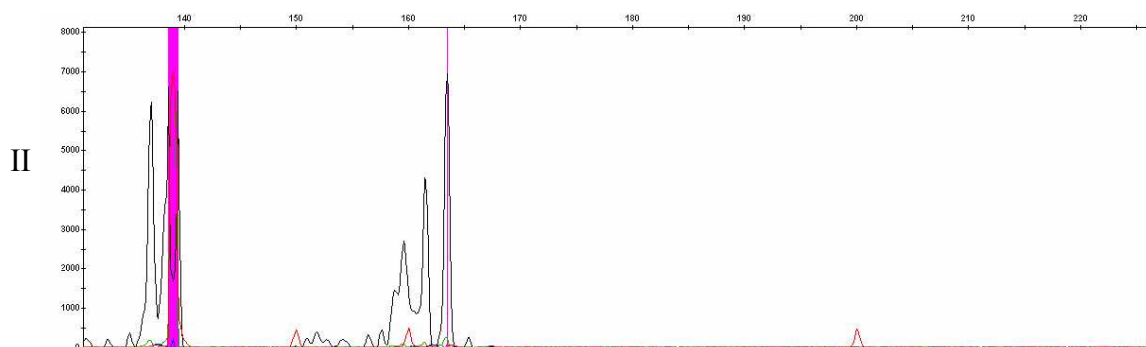
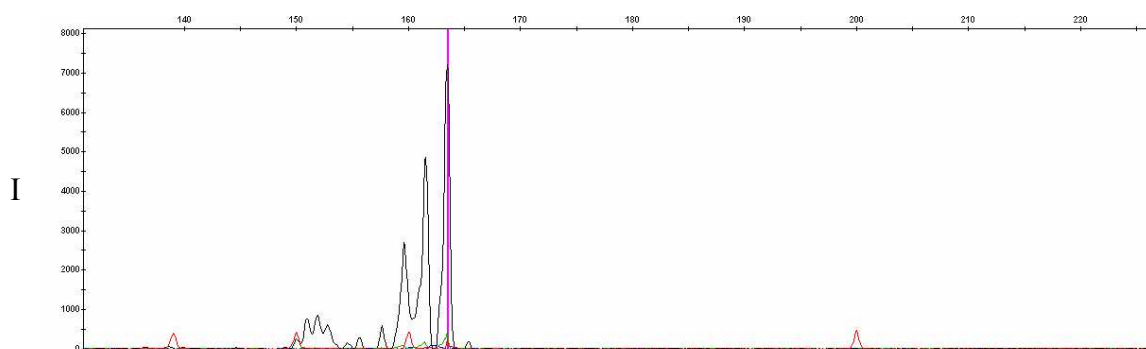
ucdCg 171	A	250/258 (ab)	247/250 (ca)	0	5	0	5	1,00
	B	250/253 (ab)	250/253 (ab)	0	9	0	9	1,00
	C	259/275 (ab)	247/267 (cd)	0	2	0	2	1,00

Tableau 3 : génotypes des parents et des descendants pour 3 loci

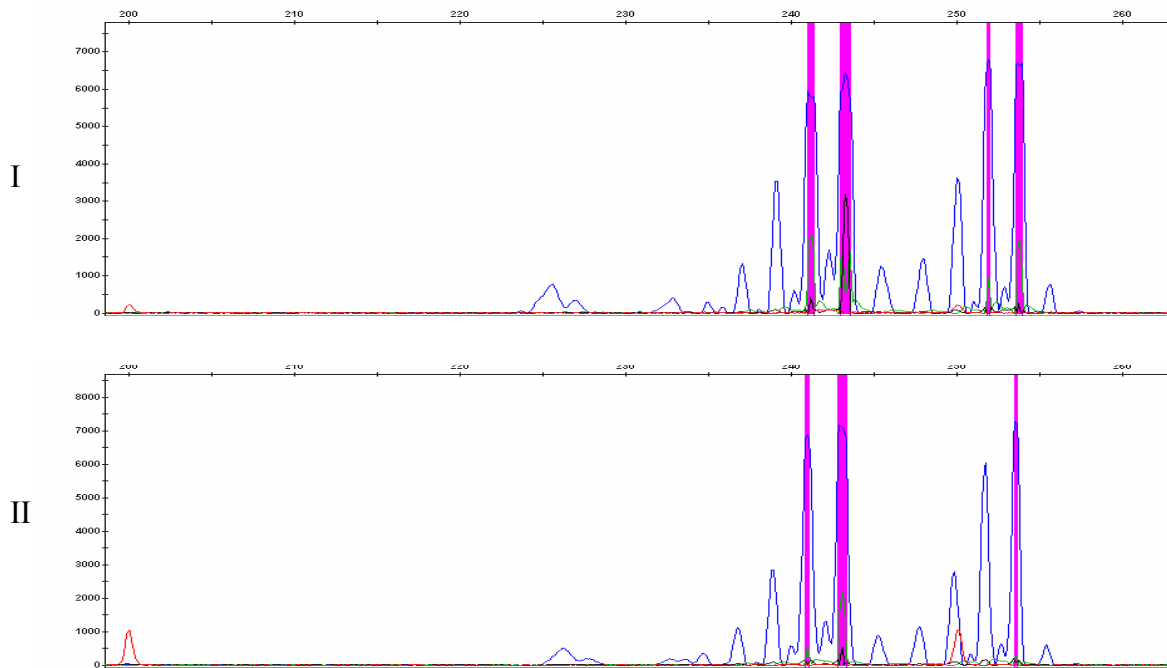
Dans l'étude réalisée, un individu possédant le même profil que la femelle pour au minimum deux marqueurs microsatellites est considéré comme gynogénétique. Sur ce tableau sont présentés les résultats obtenus pour chaque marqueur microsatellite. Au total sur les 125 animaux testés 26 peuvent être considérés comme gynogénétiques soit environ 21%. Ils représentent 26,7% chez A (8 individus), 18,8% chez B (13 individus) et 19,2% chez C (5 individus).

Ci dessous sont présentés en tant qu'exemples les profils des allèles de la femelle (I) et de l'individu gynogénétique A 29 (II) pour trois des marqueurs présentés dans le tableau 3.

○ Marqueur imbCg 049 :



○ Marqueur ucdCg 181 :



○ Marqueur ucdCg 171 :

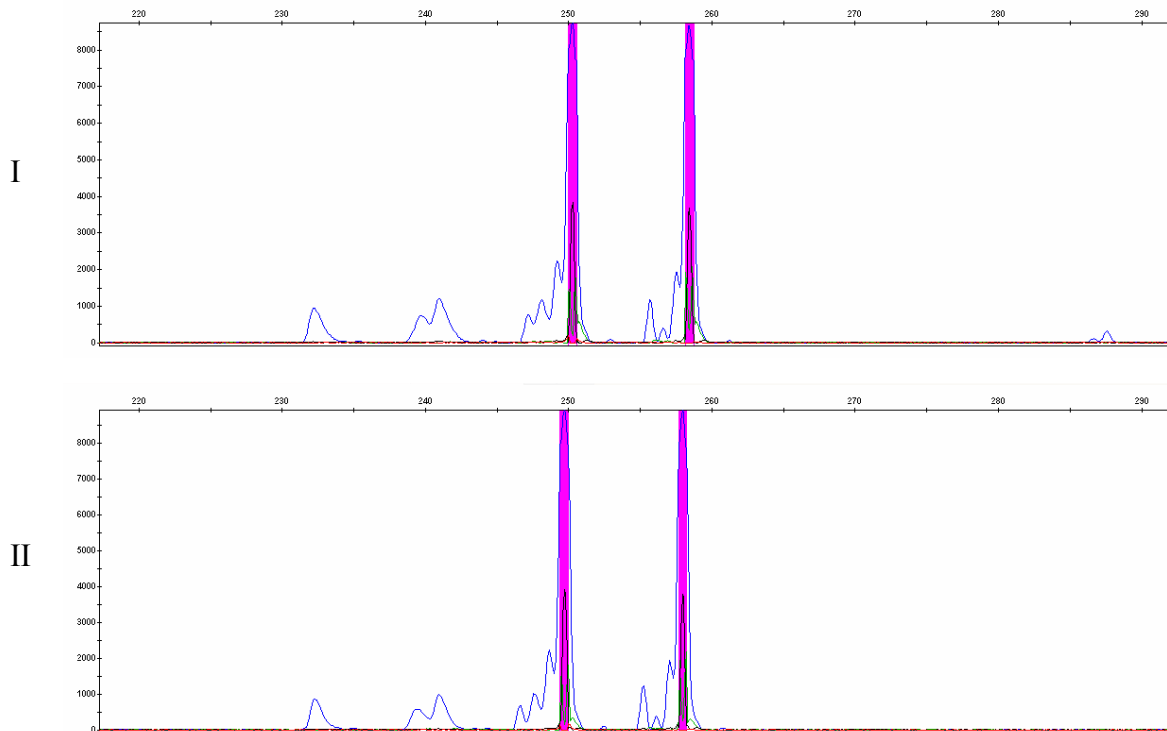


Figure 6, 7 et 8 : exemple de comparaison de six profils alléliques appartenant à la femelle 1 de la famille A et à l'individu gynogénétique A 29.

Pour chaque marqueur, on observe que les profils des allèles de la femelle sont similaires aux profils des allèles de l'individu étudié (A 29). En effet la forme des allèles est respectée et les distances de migration sont analogues. Pour le marqueur imbCg 049 l'individu présente uniquement un allèle à 163 pb, cela signifie qu'il est homozygote pour ce marqueur ou que l'autre allèle n'a pas été révélé par le séquenceur (allèle nul). Comme les marqueurs microsatellites ont été choisis pour ne pas donner d'allèle nul, on en déduit que l'individu est homozygote pour ce locus.

II.2. Détermination du type de gynogenèse utilisée pour produire les individus gynogénétiques.

La gynogenèse peut être induite de deux façons (Cf. I.6.a. Recherche d'individus gynogénétiques). Il est possible de déterminer le type de gynogenèse réalisée en observant le génotype des animaux. Un animal homozygote sera issu d'une mitogynogenèse tandis qu'un animal hétérozygote sera issu d'une méiogynogenèse. Les individus étudiés sont hétérozygotes pour la majorité des marqueurs utilisés, cela signifie donc qu'ils ont été produits par méiogynogenèse.

II.3. Diversité allélique

La diversité allélique est présentée tout d'abord en fonction des marqueurs microsatellites utilisées, elle sera ensuite exposée en fonction de chaque famille gynogénétique.

II.3.a. Etude de la diversité allélique en fonction des marqueurs microsatellites

- individus gynogénétiques :

Locus	Nombre d'allèles	Nombre d'individus analysés	Nombre d'individus hétérozygotes	Nombre d'individus homozygotes	Hétérozygotie observée	Hétérozygotie attendue
imbCg 049	9	16	15	1	0,938	0,881
ucdCg 160	7	12	12	0	1,000	0,844
ucdCg 171	5	12	12	0	1,000	0,808

ucdCg 166	6	11	9	2	0,818	0,853
ucdCg 109	6	8	8	0	1,000	0,867
ucdCg 126	6	6	6	0	1,000	0,818
ucdCg 151	4	4	3	1	0,750	0,821
ucdCg 120	4	4	4	0	1,000	0,786
ucdCg 181	2	4	4	0	1,000	0,571

Tableau 4 : analyse de la diversité allélique et de l'hétérozygotie des individus gynogénétiques

- o individus issus de captage naturel :

Locus	Nombre d'allèles	Nombre d'individus analysés	Nombre d'individus hétérozygotes	Nombre d'individus homozygotes	Hétérozygotie observée	Hétérozygotie attendue
imbCg 049	22	21	21	0	1,000	0,961
ucdgCg 160	21	21	19	2	0,905	0,945
ucdCg 171	13	21	20	1	0,952	0,840
ucdCg 166	18	21	18	3	0,857	0,950
ucdCg 109	20	21	21	0	1,000	0,941
ucdCg 126	19	16	15	1	0,938	0,956
ucdCg 151	22	21	19	2	0,905	0,947
ucdCg 120	11	20	20	0	1,000	0,841
ucdCg 181	25	21	21	0	1,000	0,958

Tableau 5 : analyse de la diversité allélique et de l'hétérozygotie des individus issus de captage naturel

Population	Nombre moyen d'allèles par locus	Hétérozygotie moyenne observée	Hétérozygotie moyenne attendue	Coefficient de consanguinité
Gynogénétique	5,44	0,945	0,805	0,148
Naturelle	19,00	0,951	0,926	0,026

Tableau 6 : moyenne des populations pour différents caractères

La comparaison entre les populations naturelles et gynogénétiques permet de constater que la population produite artificiellement a perdu environ 72 % de sa diversité allélique en passant de 19 allèles en moyenne à plus de 5 allèles par locus. Concernant l'hétérozygotie, la population gynogénétique n'a perdu que 0,7% de son hétérozygotie, passant d'une valeur moyenne de 0,951 à 0,945. Cependant selon les loci la variation d'hétérozygotie est assez variable. En effet pour le locus ucdCg 151 on observe une baisse de l'hétérozygotie de 17% tandis que pour le locus ucdCg 160 par exemple on remarque une augmentation de 10%.

La gynogenèse a permis d'augmenter la consanguinité au sein des populations produites, en effet le coefficient est en moyenne 5,7 fois plus élevée pour les populations créées artificiellement par rapport à la population issue de captage naturel.

II.3.b. Etude de la diversité allélique au sein des différentes familles gynogénétiques

Population	Nombre moyen d'allèles par locus	Hétérozygotie moyenne observée	Hétérozygotie moyenne attendue	Coefficient de consanguinité
Famille A	4,00	0,944	0,788	0,165
Naturelle	19,00	0,951	0,926	0,026

Tableau 7 : analyse de la diversité allélique et de l'hétérozygotie des individus de la famille A

Population	Nombre moyen d'allèles par locus	Hétérozygotie moyenne observée	Hétérozygotie moyenne attendue	Coefficient de consanguinité
Famille B	3,20	0,933	0,701	0,248
Naturelle	19,00	0,951	0,926	0,026

Tableau 8 : analyse de la diversité allélique et de l'hétérozygotie des individus de la famille B

Population	Nombre moyen d'allèles par locus	Hétérozygotie moyenne observée	Hétérozygotie moyenne attendue	Coefficient de consanguinité
Famille C	2,75	1,000	0,758	0,242
Naturelle	19,00	0,951	0,926	0,026

Tableau 9 : analyse de la diversité allélique et de l'hétérozygotie des individus de la famille C

En considérant chaque famille A, B et C de façon isolée on observe des différences au niveau des paramètres répertoriés. En effet la famille C présente la plus faible diversité allélique des trois familles et l'hétérozygotie moyenne observée est de 3,31 contre 5,44 lorsque les familles A, B et C sont regroupées en une seule. La famille B a le coefficient de consanguinité le plus haut 0,242 contre 0,165 pour le plus faible (famille A). L'analyse séparée des familles induit une augmentation du coefficient de consanguinité moyen qui passe de 0,148 à 0,218 soit une augmentation de plus de 40%. De façon moindre l'hétérozygotie moyenne observée augmente d'un peu plus de 1% passant de 0,945 à 0,959. L'hétérozygotie attendue diminue quant à elle en passant de 80,5% à 74,9% des individus.

Les différences observées, selon que l'analyse a lieu en fonction des marqueurs ou des familles, sont liées au fait que prises séparément les familles A, B et C possèdent un nombre d'allèle plus faible. Lorsque les individus sont regroupés au sein d'une même famille gynogénétique une quantité plus importante d'individus est étudiée et les résultats sont plus représentatifs. L'étude de la diversité allélique montre bien que la gynogénèse a conduit à la réduction du pool d'allèle. De plus le calcul du coefficient de consanguinité indique bien que la consanguinité est augmentée au sein des populations gynogénétiques. Ces deux paramètres permettent de conclure que la gynogénèse a permis de se rapprocher de l'état homozygote.

Que l'étude de la diversité allélique se fasse en fonction des marqueurs microsatellites ou en fonction des familles d'individus gynogénétiques, les résultats obtenus vont dans la même direction. En effet la population naturelle possède toujours un nombre d'allèle par locus plus élevé que les individus gynogénétiques, de 5 à 6 fois. De la même façon la population issue de captage est plus hétérozygote que les individus produits artificiellement, excepté la famille C. Enfin le coefficient de consanguinité est significativement plus élevé dans les populations gynogénétiques que dans les populations naturelles avec une augmentation allant de 5 à 8 fois.

III. DISCUSSION ET CONCLUSION

La recherche des individus de type gynogénétique par les marqueurs microsatellites a permis de mettre en évidence leur mode de production. Etant donné que les animaux sont presque tous hétérozygotes pour chaque marqueur il est raisonnable de penser qu'ils ont été produits par méïogynogenèse en réalisant la rétention du second globule polaire. Le calcul du taux de recombinaison pour chaque marqueur montre que la majeure partie des marqueurs choisis correspondent à des loci éloignés du centromère ($y = 100\%$ de recombinaison). Par conséquent les probabilités d'obtenir des individus homozygotes sont faibles. La faible proportion d'individus gynogénétiques dans les familles, 21% en moyenne, peut être expliquée de la façon suivante : lors de l'induction de la gynogenèse le traitement de neutralisation du sperme n'est pas pleinement efficace et une partie du sperme reste actif, environ 20%, de ce fait des huîtres produites ne sont pas gynogénétiques car issues de la fécondation normale d'un ovocyte par un spermatozoïde non inactivé. Cependant cela n'explique pas la proportion d'individus gynogénétiques dans les populations qui devrait être théoriquement de 80%. Chez *C. gigas*, l'induction de la gynogenèse a déjà été relatée (Guo *et al.* 1993 ; Li et Kijima. 2006). Cependant, les analyses confirmant la réussite de ces inductions gynogénétiques ont toujours été effectuées sur des larves au stade D, c'est à dire entre 24h et 4 jours après la fécondation. Il faut savoir que la reproduction par gynogenèse augmente le taux d'homozygotie et de ce fait la probabilité d'exprimer des allèles récessifs, or, chez l'huître *C. gigas* beaucoup de ces allèles récessifs sont létaux et s'expriment durant les phases clés du développement embryonnaire que sont la métamorphose et la fixation. De ce fait, il est impossible de savoir si les larves D analysées dans ces travaux sont viables et ont effectivement atteints les stades juvéniles et puis adultes.

Les marqueurs microsatellites sont un outil puissant pour l'étude de génotypes. Leur utilisation a permis de mettre en évidence l'hétérozygotie des individus étudiés. Etablir une lignée homogène impose l'obtention d'un cheptel d'animaux uniformes et donc homozygotes. Pour parvenir à ce résultat il faudrait envisager de réaliser une reproduction par méïogynogenèse sur plusieurs générations afin de purger le pool allélique des allèles récessifs morbides et pouvoir obtenir des individus homozygotes. L'autre possibilité envisageable serait de réaliser des gynogenèses mitotiques permettant d'obtenir directement des individus homozygotes. De telles manipulations chromosomiques ont déjà été réalisées (Li et Kijima 2006) mais les analyses étant effectuées sur des larves il n'est pas possible de savoir si des

individus mitogynogénétiques peuvent atteindre la taille adulte. Dans les deux cas il sera important d'analyser des loci proches du centromère afin de minimiser les probabilités de recombinaisons et de ce fait de repérer plus facilement les individus gynogénétiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arai, K., Fujino, K., Sei, N., Chiba, T., Kawamura, M., 1991. Estimating rate of gene-centromere recombination at eleven isozyme loci in the *Salvelinus* species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1043–1055.
- Beaumont, A.R., Fairbrother, J.E., 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J. Shellfish Res.* 10, 1–17.
- Fairbrother, J.E., 1994. Viable gynogenetic diploid *Mytilus edulis* (L.) larvae produced by ultraviolet light irradiation and cytochalasin B shock. *Aquaculture* 126, 25–34.
- Fujino, K., Arai, K., Iwadare, K., Yoshida, T., Nakajima, S., 1990. Induction of gynogenetic diploid by inhibiting second meiosis in the Pacific abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 1755–1763.
- Guo, X., Hershberger, W.K., Cooper, K., Chew, K.K., 1993. Artificial gynogenesis with ultraviolet light-irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Induction and survival. *Aquaculture* 113, 201–214.
- Hubert, S. and Hedgecock, D. 2004. Linkage Maps of Microsatellite DNA Markers for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics* 168: 351–362.
- Huvet, A., P. Boudry, M. Ohresser, C. Delsert et F. Bonhomme. 2000. Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics* 31(1): 71-72.
- Lahrech Z. et al., 2007. Genetic verification of induced gynogenesis and microsatellite centromere mapping in the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Aquaculture*: 115-124.
- LI G. et al., 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*: 228-232.

- Li Q., Kijima A., 2004. Segregation of microsatellite alleles in gynogenetic diploid Pacific Abalone (*Haliotis discus hannai*). *Marine biotechnology*: 669-676.
- Li, Q. and Kijima, A. 2006. Microsatellite analysis of gynogenetic families in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 331 (2006) 1– 8
- Purdom, C.E. 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosome. *Aquaculture* 33, 287– 300.
- Yamtich, Y., Voigt, M.-L., Li. G., and Hedgecock, D. 2005. Eight microsatellite loci for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Animal Genetics*, 36, 511–542.

RESUME

L'huître creuse *Crassostrea Gigas* représente actuellement plus de 97% de la production mondiale d'huîtres. L'importance économique de cette huître a motivé le développement de recherches concernant sa biologie. Un axe d'étude très important concerne l'établissement de lignées clonales ou le plus homogènes possible. En effet, il est important de disposer de matériel biologique de référence pour étudier la biologie ou la physiologie de cette espèce. Pour obtenir rapidement des individus génétiquement uniformes la méthode utilisée est la gynogenèse. La gynogenèse est un mode de reproduction dans lequel seul le matériel génétique de la femelle intervient.

Afin de connaître la nature gynogénétique des individus produits par cette technique des marqueurs microsatellites ont été efficacement utilisés. Ils ont permis de démontrer l'existence d'individus gynogénétiques hétérozygotes dans les populations.

L'obtention d'individus homozygotes n'a pu être vérifiée, il sera donc nécessaire de produire à nouveau des individus par gynogenèse en utilisant par exemple les animaux gynogénétiques identifiés lors de cette étude.