

Etude du polymorphisme des gènes de l'amylase chez *Crassostrea gigas* : relation avec les paramètres physiologiques de l'assimilation et croissance.

L. Dégremon^{1,3}, J. Moal¹, JY Daniel¹, P. Boudry³, A. Van Wormhoud², D. Sellos²,
S. Bougrier⁴, JF Samain JF⁴

¹ Laboratoire IFREMER de Physiologie des Invertébrés, centre de Brest.

² Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Biologie Marine, Concarneau.

³ Laboratoire IFREMER de Génétique et Pathologie, Station de La Tremblade.

⁴ CREMA IFREMER-CNRS, L'Houmeau.

Dans le cadre du programme européen GENEPHYS, visant à établir des relations entre les bases génétiques et les caractères physiologiques en relation avec la croissance chez *Crassostrea gigas*, il a été montré que les facteurs les plus explicatifs de la variabilité pour la croissance sont le rendement d'assimilation et l'aneuploïdie. Un modèle reliant les performances d'assimilation et l'équipement digestif a été élaboré et plus de 70% de la variance est expliqué par deux enzymes digestives : la laminarinase et l'amylase. C'est sur cette dernière que plusieurs laboratoires ont axé leur recherche.

Chez *C. gigas*, deux gènes codant pour l'amylase ont été caractérisés (A et B). Ils sont fonctionnels car les deux ARN correspondants sont présents au niveau de la glande digestive. Les séquences de ces deux gènes sont aujourd'hui connues : 6000 paires de bases et 8 exons. L'analyse du polymorphisme de ces deux gènes a été établie à partir de la technique de PCR-RFLP sa transmission vérifiée d'une génération à l'autre. Il a été trouvé 5 allèles pour le gène A et 3 pour le gène B.

Une seconde génération (G2) a été réalisée. Quatre familles bi-parentales ont été tout d'abord placées pendant cinq mois dans un milieu riche en nourriture, puis, chaque famille a été séparée en deux lots, l'un restant dans le milieu riche, l'autre placé dans un milieu pauvre durant six semaines. Un suivi de paramètres physiologiques (respiration, ingestion...) a été effectué sur ces animaux, puis la détermination des génotypes pour l'amylase a été réalisée. L'analyse de la ségrégation des allèles a permis de mettre en évidence un allèle « nul » (c.a.d. non amplifié lors de la PCR). De plus, il a été démontré que les deux gènes de l'amylase sont liés, et a priori très proches l'un de l'autre sur le chromosome.

Du point de vue des performances physiologiques et croissance, il a été démontré que deux des génotypes observés présentent des résultats opposés selon les conditions trophiques.

Ainsi le génotype 22 66 présentant les meilleures performances pour le taux d'ingestion, le rendement d'assimilation et le taux de croissance relatif dans le milieu trophique riche, devient le moins performant dans le milieu trophique pauvre. Inversement, le génotype 11 66 qui présente les plus faibles performances en milieu trophique riche devient le plus performant dans le milieu trophique pauvre. Les résultats de l'analyse des constantes apparentes d'affinités (Km) de l'amylase dans les extraits de glande digestive indiquent que le niveau trophique influence de façon significative ces constantes pour un même génotype.

Les études en cours visent à tester l'hypothèse suivante : si les deux protéines ont des Km différents, il pourrait y avoir une expression différentielle des gènes et des allèles en fonction du niveau trophique, affectant ainsi la capacité d'adaptation des différents génotypes. D'autre part, des expérimentations visant à déterminer si ce polymorphisme influence la survie au stade larvaire en fonction du niveau trophique sont également en cours.

Mots clés : *Crassostrea gigas* - amylase - polymorphisme - croissance – assimilation

Etude du polymorphisme des gènes de l'amylase chez *Crassostrea gigas* : relation avec les paramètres physiologiques de l'assimilation et croissance.

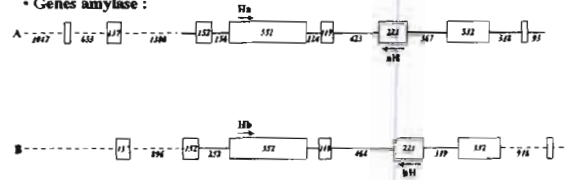
Degrémont L^{1,3}, Moal J¹, Daniel JY¹, Quere C¹, Boudry P.², Van Wormhoudt A², Selloe D², Bougrier S⁴, Samain JF¹

- ¹ Laboratoire IFREMER de Physiologie des Invertébrés, centre de Brest.
- ² Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Biologie Marine, Concarneau.
- ³ Laboratoire IFREMER de Génétique et Pathologie, Station de La Tremblade.
- ⁴ CREMA IFREMER-CNRS, L'houmeau.

• GENEPHYS : relation entre bases génétiques et caractères physiologiques agissant sur la croissance chez *C. gigas*.

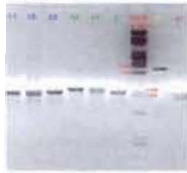
- Facteurs les plus explicatifs de la variabilité de la croissance : l'aneuploidie et le rendement d'assimilation.
- modèle reliant performances d'assimilation et l'équipement digestif : 70% de la variance est expliquée par deux enzymes digestives (laminarinase et amylase)

• Gènes amylase :



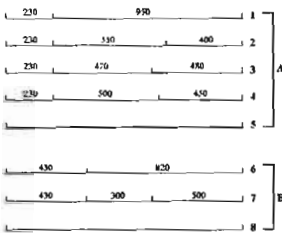
• Réalisation du polymorphisme par PCR-RFLP

• PCR :

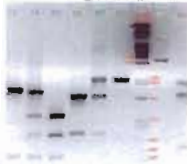


Gène A : 5 allèles

Gène B : 3 allèles

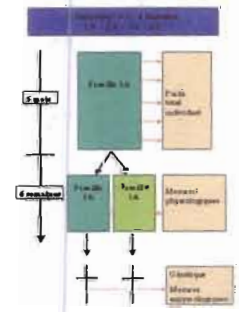


• RFLP : digestion par *EcoRI*



• Transmission des allèles vérifiées entre les générations G0 et G1 produite dans le cadre de GENEPHYS.

- Production d'une seconde génération (G2) constituée de 4 familles bi-parentales à partir d'une femelle commune et 4 mâles différents
- Action du facteur trophique



Résultats :

- Analyse génétique
- Relation génotype-physiologie

Analyse génétique des individus constituant les 4 familles :

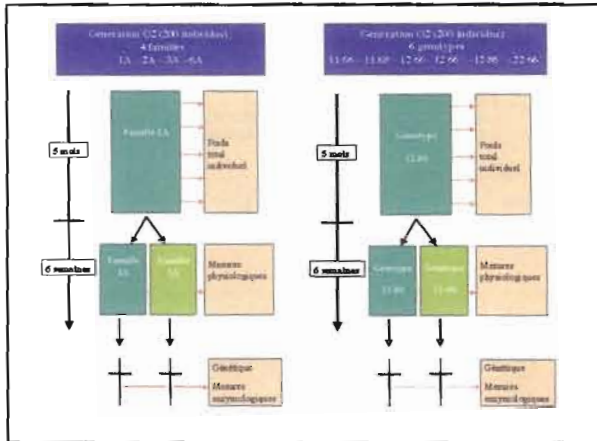
Famille	Parent Génovote Femelle	Parent Génovote Mâle	Enfant Génovote Allélic et Observé	Enfant Fréquence théorique	Enfant Fréquence Observée
1A	12 00	12 00	11 00	50%	50%
2A	10 00	11 00	11 00	25%	17%
3A	12 00	12 00	11 00	25%	14%
4A	12 00	11 00	11 00	25%	19%

- Problème de transmission des allèles pour le gène B concernant deux familles (2A et 6A)
- Hypothèse d'un allèle nul
- Mauvaise interprétation des génotypes
- Un des parents porte cet allèle : femelle
- Nouvelles PCR en utilisant deux couples d'amorces chacun comprenant une des amorces spécifiques (Hb ou bh) : identifier l'amorce qui ne se fixe pas sur l'allèle nul

Analyse génétique des individus constituant les 4 familles :

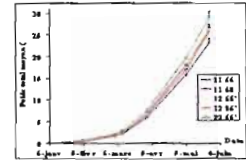
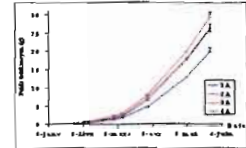
- amorce Hb ne se fixe pas sur l'allèle nul
- allèle nul est identique à l'allèle 6 (même longueur et un seul site de coupure *EcoRI*)
- nouvelle analyse de ségrégation des allèles en considérant l'allèle nul :
 - familles 2A, 3A et 6A avec 4 génotypes observés
 - selon l'indépendance des gènes : 8 génotypes théoriques
 - selon la liaison des gènes : 4 génotypes théoriques
 - famille 1A avec 2 génotypes observés
 - selon l'indépendance des gènes : 4 génotypes théoriques
 - selon la liaison des gènes : 2 génotypes théoriques

conclusion : 1) liaison des 2 gènes amylase sur un même chromosome
2) 96 descendants analysés et aucun recombinant : les gènes sont très proche sur le chromosome qui les porte



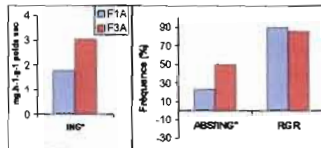
Relation génotype-paramètres physiologiques de l'assimilation et croissance

Fertile	Parent Génotype Fertile	Parent Génotype Mère	Enfant Génotype Observé
1A	12 66'	11 66'	11 66' 12 66'
2A	12 66'	11 68'	11 68' 11 68' 12 66' 12 68'
3A	12 66'	12 66'	11 66' 12 66(66)' 22 66'
6A	12 66'	11 68'	11 66' 11 68' 12 66' 12 68'

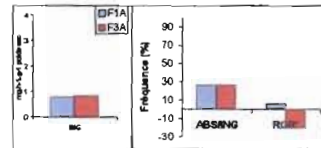


Relation génotype-paramètres physiologiques de l'assimilation et croissance

F 3A : poids total 33% supérieur à F 1A après 5 mois en condition trophique riche



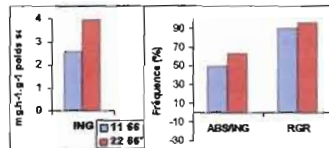
Condition trophique riche :
F 3A assimile 4 fois plus de nourriture que F 1A



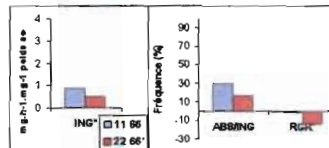
Condition trophique faible :
F3A perd 20% en poids sec en 6 semaines

Relation génotype-paramètres physiologiques de l'assimilation et croissance

22 66' : poids total 26% supérieur à 11 66' après 5 mois en condition trophique riche

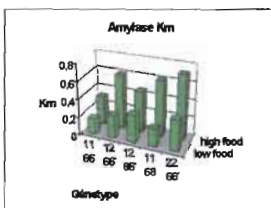


Condition trophique riche



Condition trophique faible :
11 66' assimile 4 fois plus de nourriture que 22 66'

Relation génotype-paramètres physiologiques de l'assimilation et croissance



- Km mesuré correspond à une « moyenne » des Km des amylase A et B
- génotype : variation du Km entre les deux niveaux trophique
- niveau trophique : variation des Km entre les génotypes

Expression différentielle des gènes et des allèles influencée par le niveau trophique

Etude du polymorphisme des gènes de l'amylase chez *Crassostrea gigas* : relation avec les paramètres physiologiques de l'assimilation et croissance.

- Conclusion génétique :
 - mise en évidence d'un allèle nul pour le gène B
 - liaison des deux gènes de l'amylase sur un même chromosome
- Conclusion physiologie-génétique :
 - le génotype (22 66') le plus performant en milieu trophique riche devient le moins performant en milieu trophique pauvre
 - le génotype (11 66) le moins performant en milieu trophique riche devient le plus performant en milieu trophique pauvre.
 - influence du niveau trophique sur les Km
 - expression différentielle des gènes et des allèles

Perspectives :

- Vérifier l'existence des protéines actives correspondant à chacun des gènes et de leurs allèles puis connaître leurs propriétés catalytiques.
- Etudier les niveaux d'expression des gènes en fonction des conditions trophiques.
- Expérimentation en cours : constitution d'une population polymorphe et effet du facteur trophique afin de déterminer si ce polymorphisme influence la survie au stade larvaire et si il existe des mortalités différentielles entre génotype au stade précoce.