

Contrat Région Poitou-Charentes 2000-2006

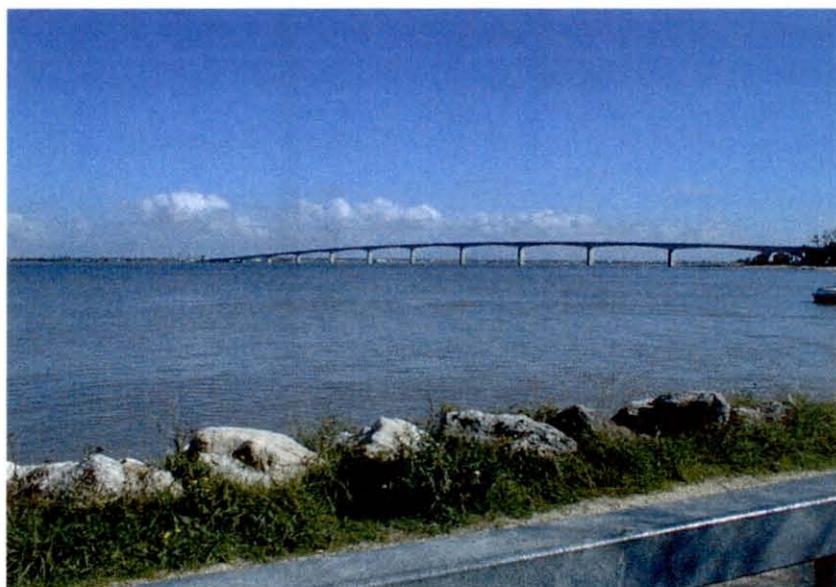
Convention N°2001-RPC-A-212

"Génétique"

**Programme 3 : Gestion durable des productions ostréicoles : les apports
de la génétique**

**Etude des ressources génétiques chez les huîtres
creuses**

**P. Boudry¹, S. Heurtebise¹, S. Lapègue¹, K. Lam², H. McCombie¹, A. Leitão¹,
et A. Gérard¹**



**(1) IFREMER
Laboratoire de Génétique et Pathologie
BP 133, 17390 La Tremblade**

**(2) Swire Institute of Marine Science
University of Hong Kong**

Problématique générale et objectifs scientifiques

L'étude de la variabilité génétique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* est un point essentiel dans la mise en place de programmes de gestion des ressources génétiques et de sélection chez cette espèce. *C. gigas*, originaire du Japon, a été introduite dans de nombreuses régions du monde et représente aujourd'hui plus de 95 % de la production mondiale d'huîtres. Introduite en France au début des années 1970 pour remplacer l'huître portugaise *Crassostrea angulata*, c'est aujourd'hui une ressource de première importance pour notre région. Malgré la maîtrise du cycle de reproduction de l'espèce et son importance commerciale, elle n'a pas été génétiquement améliorée et on peut donc considérer les stocks comme « sauvages » ou « non domestiqués ». De plus, la majorité du naissain mis en élevage en France est issue du milieu naturel. Le développement d'écloseries permet désormais d'envisager des programmes de sélection ou la diffusion de souches d'origines différentes de celle introduite au début des années 1970. Une meilleure connaissance des ressources génétiques disponibles est donc un élément essentiel au choix des stratégies de gestion et de sélection chez cette espèce. Cette connaissance nécessite (1) la mise en place d'expérimentations permettant la comparaison d'huîtres de différentes origines géographiques, et (2) le développement de marqueurs génétiques permettant de distinguer les individus au sein de l'espèce, ou les différentes espèces au sein du genre.

Dans le cadre du plan Etat - Région 1994-1998, un programme de conservatoire de souches a été initié au Laboratoire IFREMER de La Tremblade. Ce conservatoire a pour objectif d'acclimater différentes espèces ou souches d'huîtres creuses (genres *Crassostrea* et *Saccostrea*) afin d'acquérir des connaissances sur ces espèces et d'évaluer l'intérêt qu'elles pourraient présenter pour l'ostréiculture locale. L'importation d'espèces étrangères sur les côtes françaises est désormais strictement réglementée: la dissémination d'une nouvelle espèce peut se révéler néfaste d'un point de vue écologique et nuire aux productions existantes. De plus, ces huîtres peuvent être porteuses de pathogènes qui, s'il venaient à se répandre dans le milieu, pourraient toucher les stocks locaux. En conséquence, les huîtres importées sont strictement confinées au laboratoire dans une « salle de quarantaine » dont l'eau est traitée à l'ozone avant rejet afin d'éviter à la fois la dissémination des huîtres et d'éventuels pathogènes. Au sein même de l'espèce *Crassostrea gigas*, certaines populations sont susceptibles de présenter des caractéristiques différentes de celles actuellement produites en France. Ces différences pourraient être liées à des conditions environnementales particulières à chaque zone géographique. L'identification de telles populations représenterait un intérêt immédiat pour l'ostréiculture locale, puisqu'elles pourraient être rapidement diffusées auprès des producteurs (après les contrôles sanitaires indispensables). L'introduction et la reproduction au sein du conservatoire de différentes souches, nous ont permis ces dernières années, de réaliser ce type d'expérimentations, en collaboration avec le Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (LCPC, IFREMER La Tremblade) et le Laboratoire Conchylicole des Pays de Loire (LCPL, IFREMER Bouin). D'autre part, le développement de marqueurs moléculaires permettant de différencier ces souches reste une étape essentielle dans ces études. Ainsi, en 2001, les travaux ont essentiellement porté sur :

- (1) la caractérisation des huîtres creuses cultivées à Hong Kong. Cette étude a été rendu possible par le séjour du Dr. K. Lam, du Swire Institute of Marine Science, University of Hong Kong au sein du laboratoire en juillet-août 2001.
- (2) la continuation des travaux sur la caractérisation des huîtres creuses de mangrove.

I. CARACTERISTIQUES DE LA MORPHOLOGIE ET DE L'ADN MITOCHONDRIAL DE DEUX ESPECES D'HUITRES CREUSES DU GENRE <i>CRASSOSTREA</i> CULTIVEES A HONG KONG.	4
RESUME :	4
INTRODUCTION	4
MATERIEL ET METHODES	6
<i>Collecte d'échantillons</i>	6
<i>Morphologie et allométrie comparative des coquilles</i>	7
<i>Analyse RFLP de l'ADN mitochondrial</i>	7
<i>Analyse des données</i>	7
RESULTATS	8
<i>Comparaison morphologique et allométrique des coquilles</i>	8
<i>Analyses en RFLP de L'ADN mitochondrial</i>	9
DISCUSSION	15
BIBLIOGRAPHIE	16
II. ETUDE DES POPULATIONS D'HUITRES CREUSES DE MANGROVE, <i>CRASSOSTREA GASAR</i> (ADANSON, 1757), PAR L'APPORT DU MARQUEUR NUCLEAIRE ITS2.	19
INTRODUCTION	19
MATERIEL ET METHODES	21
<i>Les populations étudiées :</i>	21
<i>Extraction de l'ADN :</i>	22
<i>Amplification de la séquence ITS2 :</i>	23
<i>Révélation du polymorphisme :</i>	23
RFLP	23
Séquençage	23
<i>Analyse des données :</i>	24
RESULTATS	25
<i>Mise au point de l'amplification de la séquence ITS2 :</i>	25
<i>Détection du polymorphisme par la technique de RFLP :</i>	26
Séquençage	33
Analyse de la séquence	34
DISCUSSION ET CONCLUSION	36
BIBLIOGRAPHIE :	37

I. CARACTERISTIQUES DE LA MORPHOLOGIE ET DE L'ADN MITOCHONDRIAL DE DEUX ESPECES D'HUITRES CREUSES DU GENRE *CRASSOSTREA* CULTIVEES A HONG KONG.

RESUME :

A Hong Kong, les espèces cultivées du genre *Crassostrea* ont rarement été correctement différenciées, en raison de la similarité des caractères de leurs coquilles. Notre étude avait donc pour but de caractériser morphologiquement et génétiquement, les huîtres de Hong Kong *C. gigas* présumée et *C. rivularis* (= *C. ariakensis*). Les relations allométriques des coquilles (rapports hauteur/longueur et profondeur/longueur) étaient significativement différentes entre les deux espèces. La technique d'étude du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) a été utilisée sur le fragment COI (*cytochrome oxydase I*) d'ADN mitochondrial pour examiner la différenciation génétique entre l'huître de Hong Kong présumée *C. gigas* et des populations de *Crassostrea* européennes, japonaises et taiwanaises. Les deux espèces de Hong Kong ne sont pas seulement différentes morphologiquement, mais aussi génétiquement de chacune des autres pour les quatre sites de restriction testés (*TaqI*, *Sau3A*, *HhaI*, *MseI*) montrant que la RFLP du fragment COI est un outil utile pour les distinguer. Les huîtres de Hong Kong présumées *C. gigas* présentent un nouvel et unique haplotype COI monomorphe en comparaison avec *C. gigas* et *C. angulata* d'Europe ou d'Asie. Leurs séquences COI sont plus proches de celles de *C. rivularis* que de celles de *C. angulata* et de *C. gigas*. Ces huîtres sont supposées être une nouvelle espèce sans dénomination jusqu'à présent.

INTRODUCTION

Les huîtres du genre *Crassostrea* (Sacco, 1897) sont à l'origine d'un important commerce mondial. A Hong Kong, la culture des espèces du genre *Crassostrea* a une histoire de près de 700 ans et l'industrie est aujourd'hui localisée autour de Deep Bay au nord-ouest de Hong Kong. La taxonomie de *Crassostrea* dans les mers de l'est et du sud de la Chine est toutefois problématique. Au moins neuf espèces asiatiques ont été décrites sur des critères morphologiques. Il s'agit de *C. ariakensis* (Wakiya, 1929), *C. belcheri* (Sowerby, 1871), *C. gigas* (Thunberg, 1793), *C. inequivalvis* (Sowerby, 1871), *C. nippona* (Seki, 1934), *C. paulucciae* (Crosse, 1869), *C. rivularis* (Gould, 1861) et *C. vitrefacta* (Sowerby, 1871) (Bernard et al. 1993).

Les noms exacts des espèces cultivées à Hong Kong sont sujet de discussion depuis longtemps. Bromhall (1958) a examiné une série d'échantillons d'huîtres de Deep Bay, mais n'a pu conclure en ce qui concerne leur identification. Cet auteur suggère que sur les plans morphologiques et écologiques, elles appartiennent aux groupes d'espèces suivants : *C. angulata* (Lamarck, 1819), *C. virginica* (Gmelin, 1791), *C. gigas*, *C. commercialis* (= *Saccostrea commercialis*) (Iredale et Roughley, 1933) et *Ostrea rivularis* (= *C. rivularis*). Morris (1985) a identifié l'huître de Deep Bay, sur la base des caractères de coquille, comme étant *C. gigas*. L'huître a aussi reçu ce nom par Mok (1973, 1974a, b.), Morton (1975), Morton et Wong (1975), Wong et al. (1981), Phillips et al. (1982), Morton et Morton (1983),

Cheung et Wong (1992), et Chan et al. (1999). *C. rivularis* (Gould, 1861), pourtant est également connue pour être présente localement (Morton et Morton 1983 ; Young et Melville 1993). En raison de cette similarité morphologique, les deux espèces ont rarement été différenciées correctement (Fig.1).

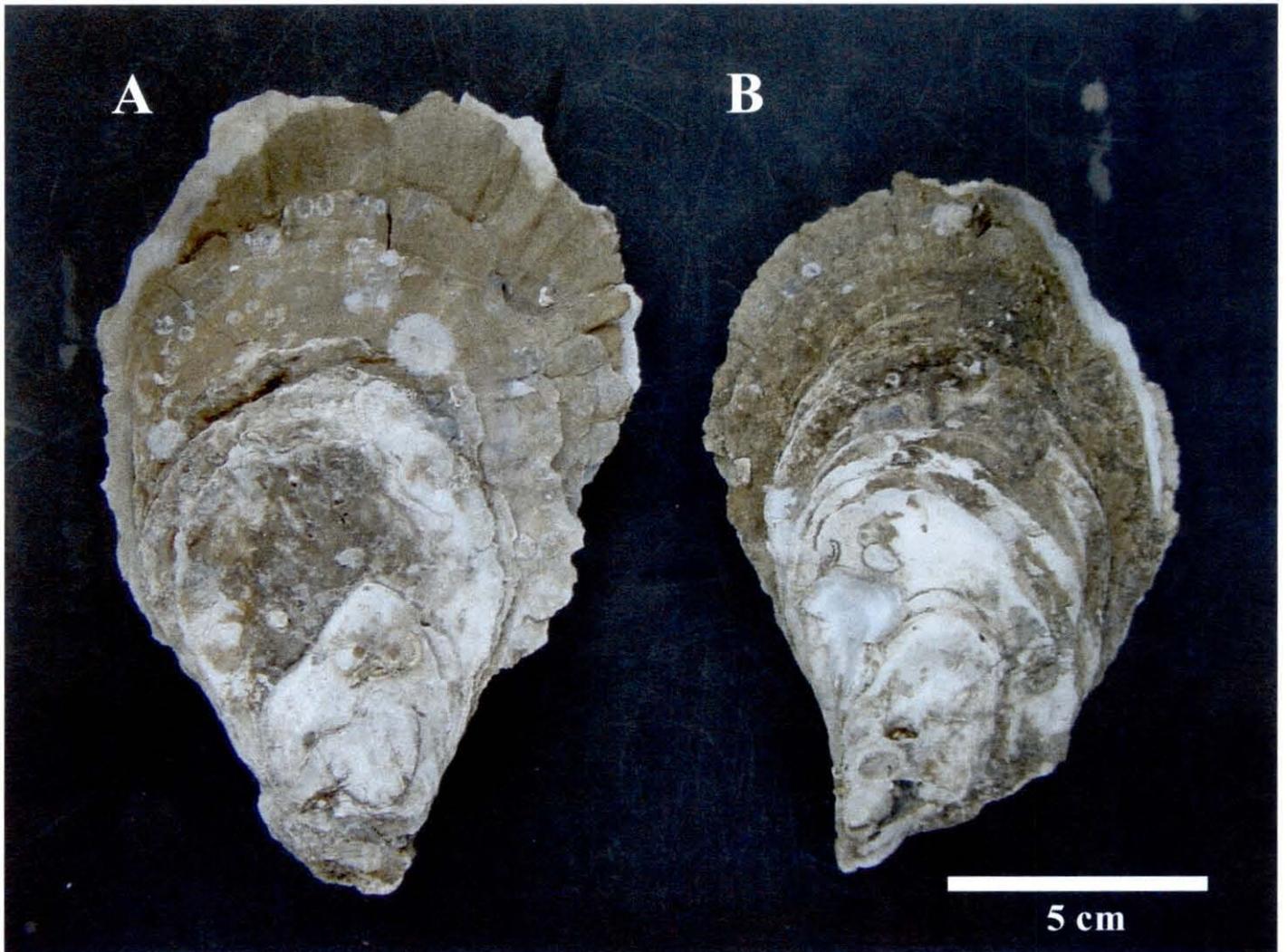


Fig. 1. Vue de la valve supérieure de *C. rivularis* (A), et de *C. sp.* (présumée *C. gigas*) (B) de Deep Bay, Hong Kong.

Le but de la présente étude était de comparer la diversité génétique des espèces du genre *Crassostrea* cultivées à Hong Kong à Deep Bay, aux niveaux inter- et intra -spécifiques avec des échantillons d'huître étudiés précédemment. Les informations et les résultats du présent travail constituent les informations de base nécessaires pour l'étude des huîtres d'élevage.

Les objectifs de cette étude, étaient, par conséquent : (1), distinguer morphologiquement et par marqueurs moléculaires *C. gigas* (présumée) et *C. rivularis*, (2) de déterminer l'identité spécifique des espèces de *Crassostrea* de Hong Kong en comparant les profils de RFLP de l'ADN mitochondrial

avec les taxons Européens et Asiatiques et (3), de contrôler la variabilité génétique dans les populations de *Crassostrea* de Hong Kong en utilisant le gène COI (cytochrome oxydase I).

MATERIEL ET METHODES

Collecte d'échantillons

Des échantillons d'huîtres, à savoir des *C. gigas* présumées (n=50) et des *C. rivularis* ont été échantillonnés dans une ferme ostréicole à Lau Fau Shan, Deep Bay, Hong Kong, en février 2001 (Fig.2). Quarante huit *Crassostrea* sauvages ont été échantillonnées sur des rochers littoraux à Pak Nai, qui se situe à environ 2 kilomètres au sud-est de la ferme ostréicole.

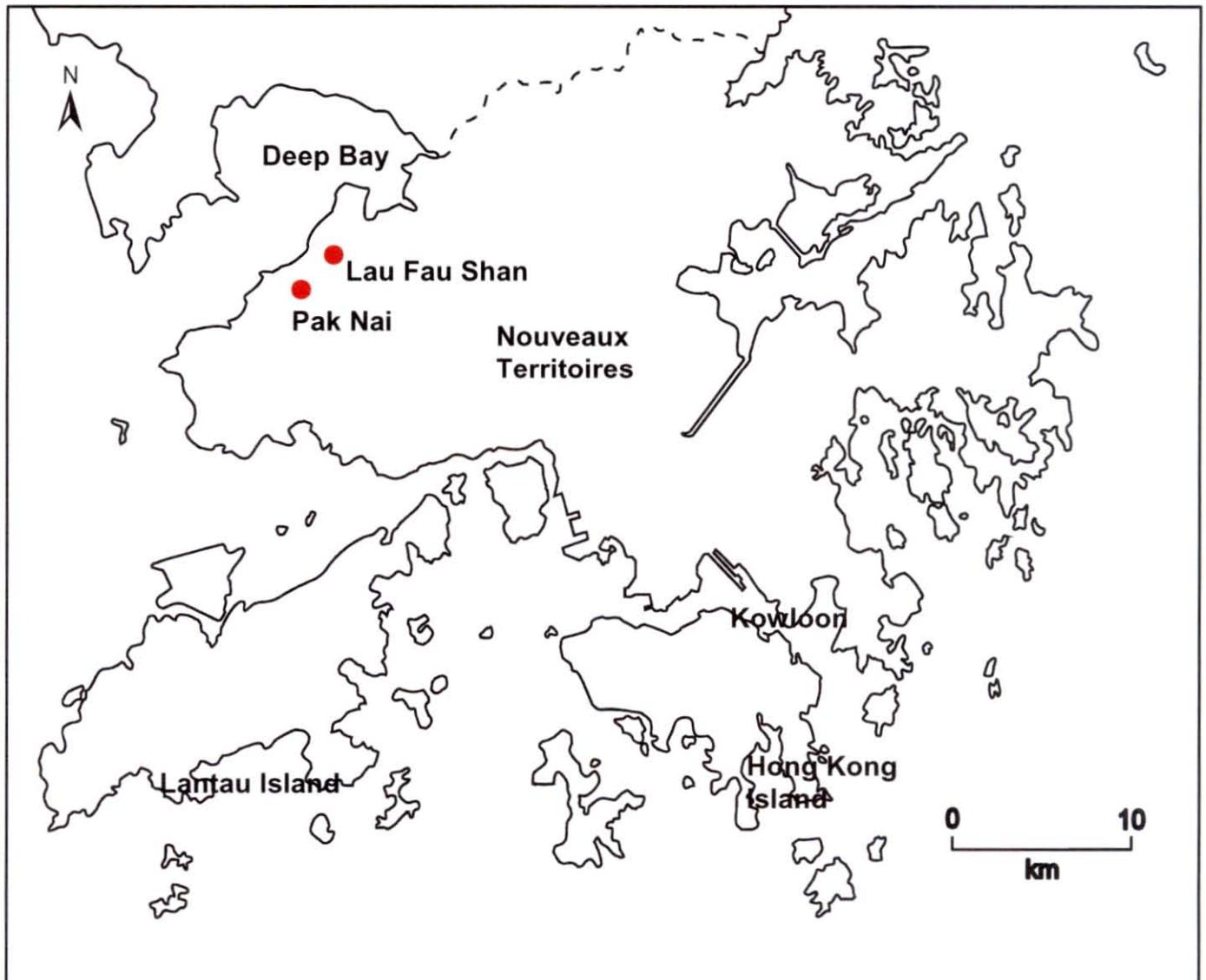


Fig. 2. Carte de Hong Kong montrant les sites d'échantillonnages de Lau Fau Shan et Pak Nai.

Morphologie et allométrie comparative des coquilles

Des comparaisons ont été faites entre les caractères de coquille des individus présumés *C. gigas* et *C. rivularis* pour clarifier les distinctions morphologiques. La figure 1 montre les morphologies externes des coquilles des deux espèces.

Les caractères morphologiques impliqués étaient (1), la forme et la sculpture de surface ; (2) , la couleur extérieure et intérieure de la coquille ; (3), le dessin de la charnière et la position et l'importance du ligament ; (4), la zone de fixation de la valve gauche et (5), la forme, la position, la couleur et la taille relative de la cicatrice du muscle adducteur. Les coquilles ont été mesurées en terme de hauteur, de longueur, et de profondeur. Chaque dimension a été mesurée au 1/10ème de millimètre près.

Analyse RFLP de l'ADN mitochondrial

L'ADN génomique a été isolé de tissus de branchies d'huître, individuellement, en utilisant la méthode au phénol/chloroforme décrite par Moore (1993). Le fragment partiel de mtDNA a été amplifié par PCR en utilisant les amorces sens et anti-sens respectivement LCO1490 (5' - GGTCACAAATCATAAAGATATTGG - 3') et HCO2198 (5' - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA - 3'). Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume de 50µl composé de 0.4 µM de chaque amorce, 2,5 mM de MgCl₂, de 2MM dNTPs, 5 µl de tampon de réaction 10X et de 1,5 unité de Taq polymérase (Silverstar). 0,2 µg d'ADN génomique total ont été ajoutés à ce mélange. Les cycles d'amplifications donnent des produits de PCR double bande dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation de 2 minutes à 94°C, puis 35 cycles incluant une dénaturation de 1 minute à 94°C, une hybridation de 2 minutes à 50°C et une élongation de 1 minute à 72°C, la dernière étape consiste en une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Les fragments d'ADN amplifiés ont été triés en fonction de leur polymorphisme de site de restriction en utilisant quatre endonucléases : *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI*. Ces enzymes ont été choisies parce qu'elles présentaient du polymorphisme de restriction du fragment COI parmi les populations de *Crassostrea gigas* et *Crassostrea angulata* (Boudry *et al.*, 1998). Les réactions de restrictions ont été réalisées en deux heures dans un volume total de 20µl composé de 10 µl de produit de PCR, 2 µl de tampon de réaction 10X et 2 unités d'endonucléase de restriction. Les échantillons digérés ont migré en électrophorèse sur gel d'agarose dans un tampon TAE 1X et révélé en utilisant du bromure d'éthidium. Les fragments de restriction ont été visualisés sur une table UV. Les génotypes ainsi composés (haplotypes) ont été désignés par quatre lettres, représentant les différents profils de chacune des quatre endonucléases de restriction, en référence à Boudry *et al* (1998). Les tailles des fragments de restriction ont été estimées en comparaison d'un marqueur de taille d'échelle 100 à 1000 paires de base (bp). Seuls les fragments supérieurs à 100bp ont été enregistrés.

Analyse des données

Trois ratios d'allométrie de coquille, hauteur/profondeur, hauteur/longueur et profondeur/longueur ont été soumis à des test t pour détecter des différences entre les deux espèces en utilisant SPSS version 10.0.0 (SPSS Inc., 1989-1999).

Pour déterminer les *C. gigas* présumée et *C. rivularis* de Hong Kong, leurs profils RFLP ont été comparés avec ceux de *C. angulata*, *C. gigas* et *C. ariakensis* (Boudry *et al.* 1998, Huvet 2000). Deux *C. ariakensis* (fournies par le Shellfish Research Laboratory, Rutgers State University, New Jersey,

United States) montraient un haplotype L (table3), qui est l'haplotype majeur pour *C. rivularis* de Hong Kong. Ces deux espèces sont présumées génétiquement identiques en ce qui concerne le gène COI, et ainsi les données de *C. ariakensis* ne sont pas comprises dans les analyses de données ultérieures.

Les liaisons génétiques entre les haplotypes obtenus pour les deux espèces de *Crassostrea* de Hong Kong, et pour les populations de *C. angulata* et *C. gigas* d'Europe et d'Asie ont été analysées en calculant le nombre moyen de substitutions par site de restriction entre toutes les paires d'haplotypes. La matrice de distance inter-haplotype a été calculée par le logiciel Arlequin 2.0 (Schneider *et al.* 2000). Un arbre minimum de distance des haplotypes de RFLP a été construit en utilisant la longueur de liaison calculées par la méthode recommandée par Rohlf (1973). Pour analyser les distances génétiques entre les populations, une matrice pairwise de différences de substitution de nucléotide (Nei et Li 1979) a été calculée sous ARLEQUIN.

RESULTATS

Comparaison morphologique et allométrique des coquilles

En général, les deux espèces présentent des caractères internes et externes de coquille très similaires. Parmi les échantillons examinés, la cicatrice du muscle adducteur de *C. gigas* présumée est toujours de forme D allongée dorso-ventralement, alors qu'elle est en croissant chez *C. rivularis*. La forme du muscle adducteur est, par conséquent, reconnue comme étant un trait fiable de la coquille pour distinguer ces deux espèces. Les écailles plus redressées de *C. rivularis* peut être une clef d'identification pour les individus non érodés et intacts. La figure 2 représente les valeurs des écarts moyens et standards des trois ratios allométriques : hauteur/longueur et profondeur/longueur qui s'avèrent significativement différents entre les deux espèces (confondus $p < 0,05$, test t) bien que le ratio hauteur/profondeur ne le soit pas ($p = 0,179$).

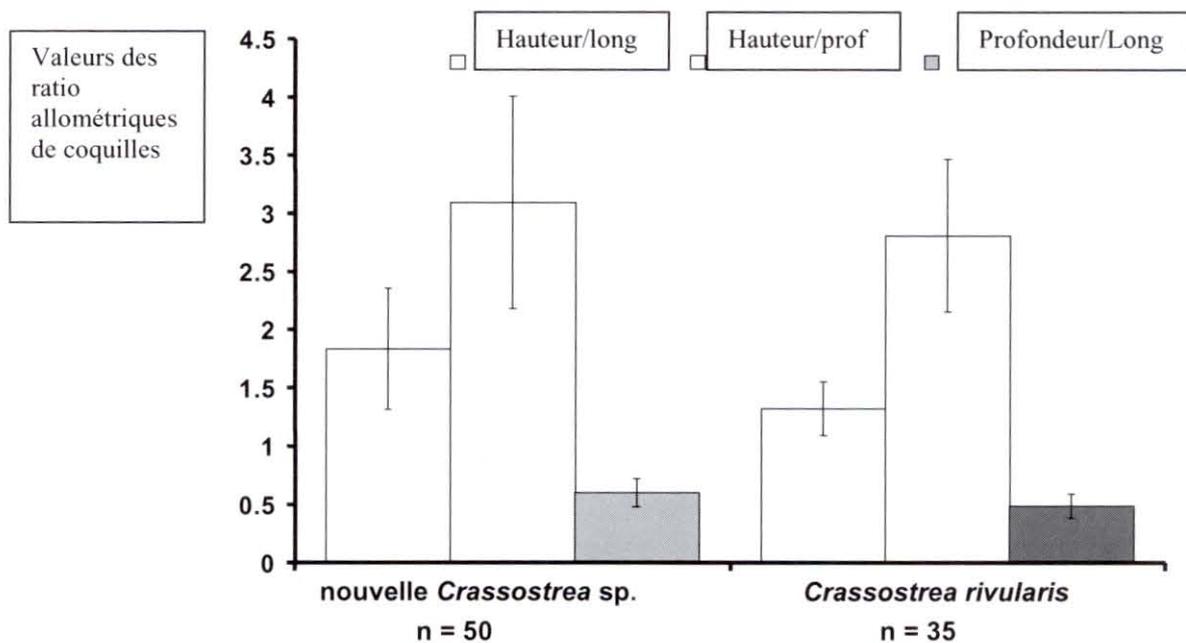


Fig. 3. Moyennes et écart types des ratios allométriques de coquilles, hauteur/longueur, hauteur/profondeur et profondeur/longueur pour la nouvelle *Crassostrea* sp. et *C. rivularis* de Deep Bay, Hong Kong.

Analyses en RFLP de L'ADN mitochondrial

L'analyse RFLP a permis d'obtenir quatre différents haplotypes parmi les 133 huîtres étudiées. Les tailles approximatives de ces fragments de restriction (fig. 4), en paires de base, sont données dans la Tableau 2. En général, *Crassostrea gigas* présumée et *C. rivularis* présentent différents profils de restriction en ce qui concerne les quatre enzymes de restriction testées, *TaqI*, *Sau3A*, *MseI* et *HhaI*. L'identité des espèces de Hong Kong a été vérifiée en comparant leurs profils de restriction avec ceux de (1) *C. rivularis* (= *C. ariakensis*) Américaine, (2) *C. gigas* Japonaise et Française, (Boudry et al. 1998), et (3), *C. angulata* portugaise et taiwanaise.

Les profils RFLP de *C. rivularis* de Hong Kong et des Etats Unis s'avèrent extrêmement similaires. *C. rivularis* de Hong Kong est polymorphe seulement en ce qui concerne le site de restriction de *Sau3A*. Cela montre un haplotype majeur avec une fréquence de 0,94 (n=33/35) et deux mineurs, tous deux de 0,04 (n=1/35). La *Crassostrea gigas* présumée de Hong Kong, montre toutefois un nouvel haplotype monomorphe appelé 'K' pour le profil de restriction en comparaison des résultats déjà publiés (Tableaux 2 et 3, et Fig.4).

Cet haplotype 'K' est totalement différent des haplotypes présentés de *C. gigas* et de *C. angulata*. Un arbre de distances liant les haplotypes présents chez la *C. gigas* présumée de Hong Kong, *C. rivularis*, *C. gigas* et *C. angulata* (Fig.5) montre que la première est génétiquement plus proche de *C. rivularis* que de *C. angulata* et également de *C. gigas* en ce qui concerne le gène *COI*.

Les nombres des différences nucléotidiques entre la nouvelle *Crassostrea* de Hong Kong et les populations de *C. gigas* /*C. angulata* sont élevés (13 - 15) et significativement différents (toutes les valeurs de *p* des tests par paires sont < 0,01, Tableau 4). La population de *Crassostrea sp.* de Hong Kong n'est pas par conséquent l'espèce *C. gigas*, mais une autre espèce.

Tableau 1. Taille approximative en paire de bases (bp) des fragments de restriction du segment COI de *Crassostrea angulata* et *Crassostrea rivularis*, après digestion par quatre endonucléases : *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI*.

Profil de restriction	Fréquence des haplotypes	Endonucléase de restriction			
		<i>TaqI</i>	<i>Sau3A</i>	<i>HhaI</i>	<i>MseI</i>
<i>Crassostrea angulata</i> Cultivée (n=50)	1	380	400	525	285
		280	130	125	160
					115
<i>Crassostrea angulata</i> sauvage (n=48)	1	380	400	525	285
		280	130	125	160
					115
<i>Crassostrea rivularis</i> (n=35)	0.94	700	420	520	180
					250
	0.03	700	390	520	180
					250
0.03	700	500	520	180	
				250	

Tableau 2. Tailles approximatives en paire de bases (bp) des fragments de restriction de *Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas* après digestion par les endonucléases *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI*. Résultats combinés de cette étude et de Boudry *et al.* (1998).

Profil de Restriction	Endonucléases de restriction																		
	<i>TaqI</i>					<i>Sau3A</i>						<i>HhaI</i>				<i>MseI</i>			
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	f	a	b	c	d	a	b	c	d
Taille des fragments (bp)	660	380	430	370	770	520	400	350	450	400	550	710	525	590	580	285	285	250	250
		280	280	270		130	130		110	110	110		125	200	200	160	220	160	190
																115	115		

Tableau 3. Taille des échantillons (n) et fréquence des haplotypes de *Crassostrea gigas* et *C. angulata*. Les données des échantillons de Hong Kong ont été obtenues dans le cadre de cette étude et les autres extraites de Boudry *et al.* (1998) et Huvet (2000). Les haplotypes sont notés en lettres capitales, et correspondent à chaque combinaison des profils de restriction des enzymes *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* and *MseI*.

Pays	Population	Abbré- viation	Taxons	n	Haplotype									
					A baaa	B bbaa	C caab	D caaa	E cabb	J aaaa	K dccc	L eddd	M eedd	N efdd
Japon	Hiroshima	HIR	<i>C. gigas</i>	46			0.97		0.03					
Corée Sud	Chungmu	CHU	<i>C. gigas</i>	14			0.93	0.07						
Taiwan	Tungkang	TUN	<i>C. angulata</i>	40	0.9	0.07				0.03				
Chine	Hong Kong	HKC	<i>Crassostrea</i> sp. (cultured)	50							1			
		HKW	<i>Crassostrea</i> sp. (wild)	48							1			
		HKR	<i>C. rivularis</i>	35								0.94	0.3	0.3
Australie	Tasmania	TAS	<i>C. gigas</i>	11			1							
Nouvelle Zélande		NEW	<i>C. gigas</i>	12			1							
Royaume uni	Guernsey	GUE	<i>C. gigas</i>	16										
	Bangor	BAN	<i>C. gigas</i>	10										
France	Seudre Estuary	SEU	<i>C. gigas</i>	20			0.95		0.05					
	Bonne Anse	BON	<i>C. gigas</i>	9			0.88			0.11				
	Charente	CHA	<i>C. gigas</i>	15	0.07		0.93							
	Arcachon	ARC	<i>C. gigas</i>	15			1							
	Rade de Brest	BRE	<i>C. gigas</i>	24			0.92		0.08					
	Gravelines	GRA	<i>C. gigas</i>	23			0.91	0.04	0.04					
Portugal	Ria Formosa	RFG	<i>C. gigas</i> (?)	11	0.82	0.09	0.09							
	Ria Formosa	RFA	<i>C. angulata</i>	11	0.82		0.18							
	Sebutal	SEB	<i>C. angulata</i>	13	0.85	0.15								
Espagne	Cadiz	CAD	<i>C. angulata</i>	26	0.92	0.08								

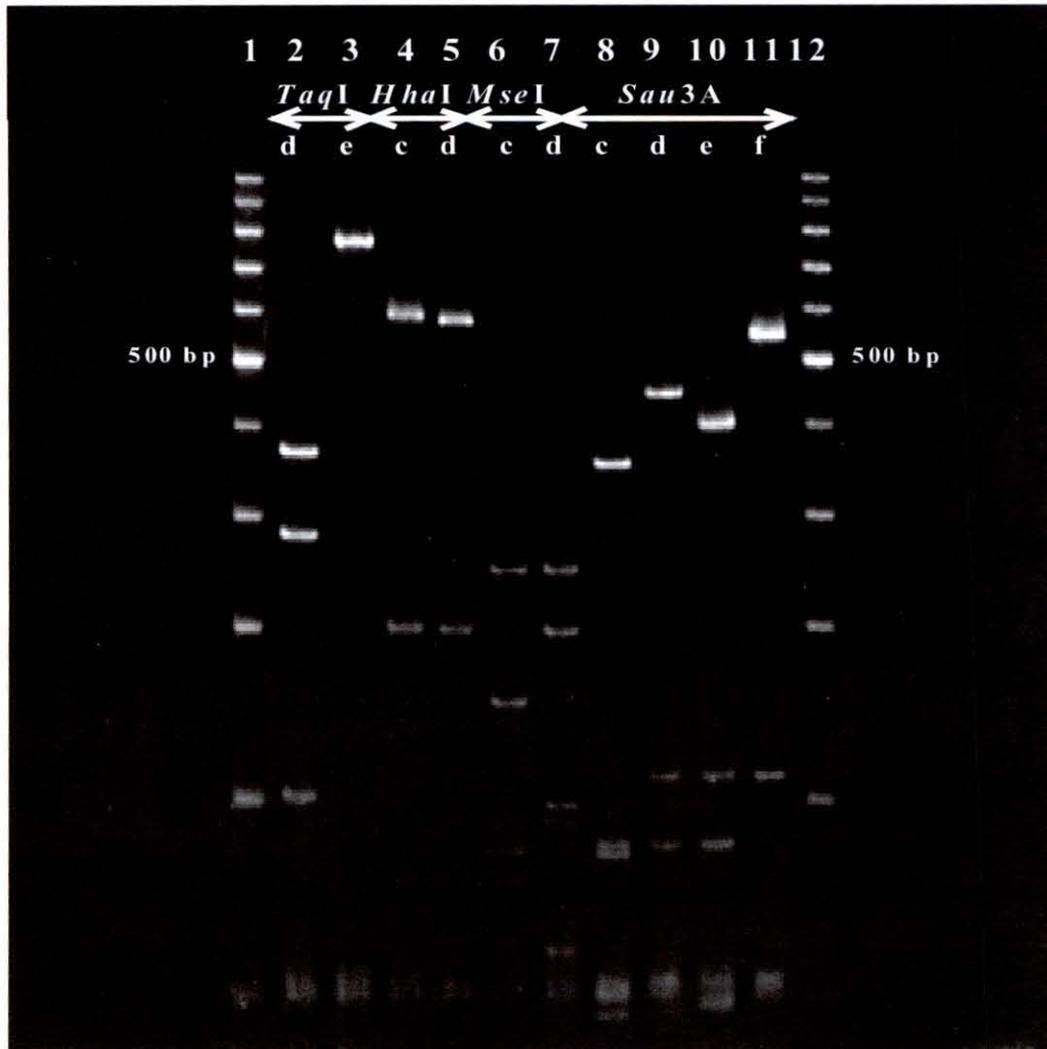


Fig. 4. Séparation électrophorétique sur gel d'acrylamide à 8% de fragments de restriction obtenus par amplification du gène *COI* d'ADN mitochondrial de la nouvelle espèce du genre *Crassostrea* et *C. rivularis*. Bandes 1 et 12 correspondent au marqueur de masse moléculaire (100bp ladder, Promega). Bandes 2 et 3, les profils de restriction de la nouvelle *Crassostrea* sp. et *C. rivularis* pour *TaqI*, Bandes 4 et 5, les profils de restriction de la nouvelle *Crassostrea* sp. et *C. rivularis* pour *HhaI*. Bandes 6 et 7, les profils de restriction de la nouvelle *Crassostrea* sp. et *C. rivularis* pour *MseI*. Bandes 8 à 11, les profils de restriction de la nouvelle *Crassostrea* sp et de *C. rivularis* respectivement un type majeur et deux types mineurs pour *Sau3A*.

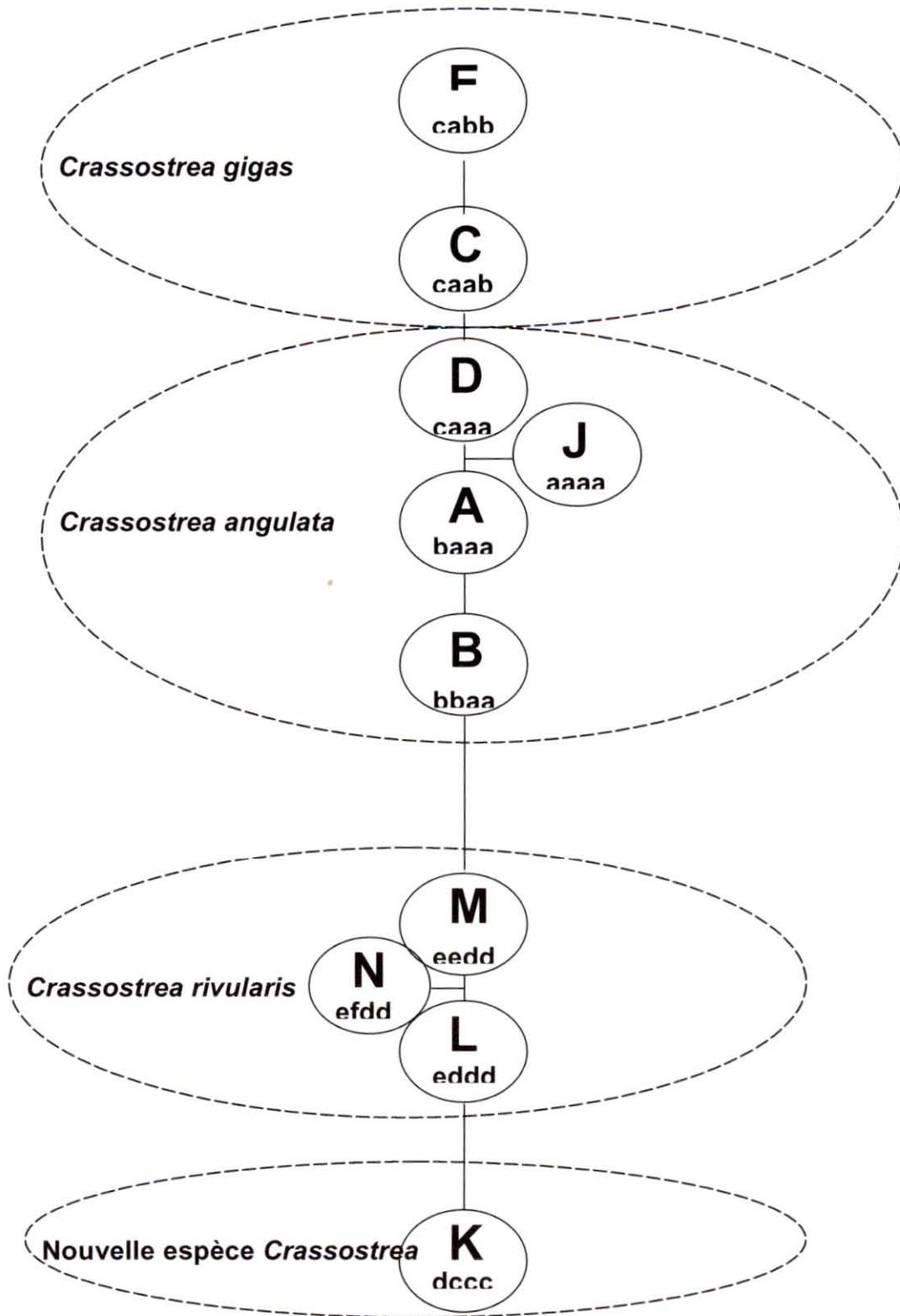


Fig. 5. Arbre de distance des haplotypes RFLP des populations d'huîtres *C. gigas*, *C. angulata*, *C. rivularis* et la « nouvelle espèce » de *Crassostrea* conformément aux résultats du tableau 3. L'ordre des enzymes de restriction est le suivant : *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* et *MseI*. Le tableau 2 fournit les profils de restriction pour chaque enzyme.

Tableau 4. Matrice des substitutions nucléotidiques du mtDNA en analyses RFLP. Valeurs brutes de Nei des différences nucléotidiques entre les populations de *Crassostrea* (au dessus de la diagonale) et significativité des tests par paire (sous la diagonale).

	HIR	CHU	TUN	HKC	HKW	HKR	TAS	NEW	GUE	BAN	SEU	BON	CHA	ARC	BRE	GRA	RFG	GFA	SEB	CAD	
HIR	-	0.23	4.34	15	15	15	0.09	0.09	0.57	1.62	0.28	0.64	0.35	0.09	0.41	0.34	4	3.36	4.54	4.31	
CHU	NS	-	4.12	14.86	14.86	15	0.14	0.14	0.64	1.74	0.34	0.67	0.39	0.14	0.48	0.39	3.79	3.18	4.31	4.08	
TUN	**	**	-	13.05	13.05	14.9	4.25	4.25	4.75	5.85	4.45	4.13	3.99	4.25	4.58	4.34	0.89	1.02	0.69	0.5	
HKC	**	**	**	-	0	10	15	15	15	15	15	14.67	14.87	15	15	14.91	13.27	13.36	13.15	13.08	
HKW	**	**	**	NS	-	10	15	15	15	15	15	14.67	14.87	15	15	14.91	13.27	13.36	13.15	13.08	
HKR	**	**	**	**	**	-	15	15	15	15	15	14.89	15	15	15	15	14.9	15	14.84	14.92	
TAS	NS	NS	**	**	**	**	-	0	0.5	1.6	0.2	0.56	0.27	0	0.33	0.26	3.91	3.27	4.46	4.23	
NEW	NS	NS	**	**	**	**	NS	-	0.5	1.6	0.2	0.56	0.27	0	0.33	0.26	3.91	3.27	4.46	4.23	
GUE	**	NS	**	**	**	**	NS	NS	-	1.7	0.65	1.06	0.77	0.5	0.75	0.72	4.41	3.77	4.96	4.73	
BAN	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-	1.64	2.16	1.87	1.6	1.67	1.72	5.51	4.87	6.06	5.83	
SEU	**	NS	**	**	**	**	NS	NS	**	**	-	0.76	0.47	0.2	0.5	0.44	4.11	3.47	4.66	4.43	
BON	**	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	-	0.78	0.56	0.89	0.8	3.86	3.28	4.35	4.12	
CHA	**	NS	**	**	**	**	NS	NS	**	**	NS	*	-	0.27	0.6	0.52	3.69	3.1	4.19	3.96	
ARC	NS	**	**	**	**	**	NS	NS	NS	**	NS	**	**	-	0.33	0.26	3.91	3.27	4.46	4.23	
BRE	**	NS	**	**	**	**	NS	NS	*	**	NS	*	NS	NS	-	0.57	4.24	3.6	4.79	4.56	
GRA	**	NS	**	**	**	**	NS	NS	**	**	NS	**	NS	NS	NS	-	4.01	3.39	4.55	4.31	
RFG	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-	1.23	1.01	0.83	
GFA	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-	1.19	0.96	
SEB	**	**	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-	0.62	
CAD	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	-

** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$, NS = non significatif.

DISCUSSION

L'analyse RFLP de l'ADN mitochondrial, a montré que l'huître creuse appelée "*Crassostrea gigas* de Hong Kong" était génétiquement différente de *C. gigas*, *C. angulata* et *C. rivularis*. En conséquence, nous la nommons désormais « nouvelle espèce » *Crassostrea sp.* Elle est identifiable, autant morphologiquement que génétiquement, de *C. rivularis* provenant de la même zone (Deep Bay, Hong Kong). Puisque les caractères de coquille des deux espèces sont similaires et que la différenciation par l'allométrie de la coquille demande un échantillon de grande taille ($n > 30$ dans cette étude), les marqueurs ADN sont plus fiables pour identifier les individus. Cette étude montre que l'analyse RFLP du fragment COI permet de faire des distinctions entre plusieurs espèces du genre *Crassostrea* et peut-être étendue afin d'identifier les autres espèces du sud de la mer de Chine. Le séquençage du fragment COI sera la prochaine étape dans l'analyse génétique de ces populations de *Crassostrea*.

Les comparaisons avec des populations Européennes et autres populations asiatiques conspécifiques laissent suggérer que l'espèce de *Crassostrea* la plus cultivée à Hong Kong est une nouvelle espèce, mélangée à quelques individus *C. rivularis*. En raison des difficultés d'identification, la biologie comparée de ces espèces sympatriques est peu connue.

Cette identification déterminante ouvre de nouvelles perspectives pour les études de physiologie sur les espèces de *Crassostrea*. En effet, les *C. gigas* et *C. angulata* Européennes ont été bien étudiées et peuvent être différenciées génétiquement et physiologiquement. Bien que ces deux espèces soient morphologiquement identiques (Ranson 1967), il a été montré qu'elles étaient différentes génétiquement par des études moléculaires et caryologiques (Boudry *et al.* 1998 ; O'Foighil *et al.* 1998 ; Leitao *et al.* 1999). Des études ont aussi montré que *C. angulata* et *C. gigas* sont différentes dans diverses voies physiologiques, incluant la performance de croissance, l'assimilation de nourriture, le taux de filtration, et l'activité (His 1972 ; Bougrier *et al.* 1986 ; Héral 1986, Huvet, 2000).

Les comparaisons avec les populations européennes et autres populations asiatiques conspécifiques suggèrent que l'identité de l'espèce la plus communément cultivée à Hong Kong est une nouvelle espèce, mélangée à quelques individus *C. rivularis*. L'espèce d'huître cultivée à Taiwan est, toutefois, *C. angulata*. En dépit de leur proximité géographique, les populations de *Crassostrea* de Hong Kong et de Taiwan se partagent en différentes espèces. Puisque la nouvelle *Crassostrea sp.* de Hong Kong présente un unique haplotype COI, les espèces en place ont des caractéristiques génétiques uniques à Hong Kong. Toute importation de naissain vers cette zone changerait ce stock génétique dramatiquement.

En Asie, les espèces cultivées de *Crassostrea* montrent une intéressante variation latitudinale : on trouve ainsi des stocks « purs » de *C. gigas* au Japon, incluant Hokkaido, Hiroshima, Miyagi et Kyushu (O'Foighil *et al.* 1998), *C. angulata* à Taiwan et une nouvelle *Crassostrea sp.* et *C. rivularis* à Hong Kong, que nous présentons pour la première fois dans la présente étude. La structure de l'arbre montrant les distances des espèces de *Crassostrea* (Figure 6) coïncide aussi avec la distribution géographique de ces populations. C'est à dire que *C. gigas* est plus proche de *C. angulata* que *C. rivularis*, laquelle est plus apparentée à la nouvelle espèce de *Crassostrea* de Hong Kong. Les huîtres cultivées au Vietnam, aux Philippines et en Thaïlande ont été identifiées sur la base de leurs caractères de coquille comme *C. rivularis*, *C. iredalei* et *C. belcheri* (Talavera et Fautino 1933, Rosell 1991, Klinbunga *et al.* 2000, Tang 2001). La « nouvelle espèce » de *Crassostrea* de Hong Kong ne devrait cependant pas être *C. iredalei* ou *C. belcheri* puisque'il existe une différence de forme et de couleur de la cicatrice du muscle adducteur en comparaison avec la dernière espèce (Talavera et Fautino 1933, Rosell 1991, observations personnelles des auteurs). Il semble que cette espèce de *Crassostrea* soit à part le long des côtes pacifiques de l'Asie avec un petit recouvrement géographique. Les espèces de *Crassostrea* cultivées telle que *C. virginica* dépendent de façon critique des conditions estuariennes avec un niveau de nutriment élevé et un important renouvellement d'eau, ou les fluctuations de salinité sont de 10 à 20 ppt et représentent un écart physiologique optimum (Shumway 1996). Les populations de *C. virginica* le long de la côte atlantique nord américaine est et des côtes du golfe du Mexique montre aussi deux

entités génétiques révélés par analyse RFLP de l'ADN mitochondrial (Reeb et Avise 1990). Cette discontinuité génétique a été attribuée à l'influence d'un flux de gènes et l'hydrographie contemporaine. Ceci peut-être étendu au scénario d'Asie du pacifique ; la spéciation de *Crassostrea* est plus probablement due à une séparation géographique avec un flux de gène restreint à l'intérieur d'habitats estuariens. Une plus complète image génétique inter-espèces et populations des *Crassostrea* de l'Asie du pacifique pourrait être obtenue, si des échantillons d'autres sites de la côte sud de la Chine étaient étudiés. L'île d'Okinawa constitue une zone de transition où *C. gigas* du Japon rencontre *C. angulata* de Taiwan. Les populations génétiques des espèces de *Crassostrea* de cette île, pourraient montrer, cependant, comment *C. gigas* et *C. angulata* interagissent génétiquement. Les marqueurs nucléaires de ces populations devront être étudiés pour montrer si l'hybridation survient entre les deux espèces. En dépit d'une bonne documentation historique sur la culture et de la description biologique de *Crassostrea* à Hong Kong (Morton 1975, 1977 ; Morton et Wong 1975 ; Morton et Morton 1983), les questions concernant le flux de gène et l'hybridation au sein et entre les populations de Hong Kong et d'Asie seront seulement résolues en étudiant les marqueurs nucléaires, tels que l'ITS-1 (Hedgecock et al. 1999 ; voir également ci dessous) et des microsatellites (Huvet et al. 2000).

BIBLIOGRAPHIE

- Bernard, F.R., Cai, Y.Y. and Morton, B. 1993. *Catalogue of the Living Marine Bivalve Molluscs of China*. Hong Kong: The University of Hong Kong Press.
- Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F. and Gérard, A. 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thünberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 226: 279-91.
- Bougrier, S., Raguenes, G., Bachere, E., Tige, G. and Grizel, H. 1986. Essai de réimplantation de *Crassostrea angulata* en France. Résistance au chambrage et comportement des hybrides *C. angulata*-*C. gigas*, ICES, C.M. 1986/F:38.
- Bromhall, J.D. 1958. On the biology and culture of the native oyster of Deep Bay, Hong Kong, *Crassostrea* sp. *Hong Kong University Fisheries Journal* 2: 93-107.
- Chan, K.W., Cheung, R.Y.H., Leung, S.F. and Wong, M.H. 1999. Depuration of metals from soft tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) transplanted from a contaminated site to clean sites. *Environmental Pollution* 105: 299-310.
- Cheung, Y.H. and Wong, M.H. 1992. Trace metal contents of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) purchased from markets in Hong Kong. *Environmental Management* 16: 753-61.
- Folmer, O., Black, W.H., Hoeh, W., Lutz, R. and Virjenhock, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-9.
- Hedgecock, D., Li, G., Banks, M.A. and Kain, Z. 1999. Occurrence of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Ariake Sea, Japan. *Marine Biology* 133: 65-68.
- Héral, M. 1986. L'ostréiculture Française traditionnelle. In *Aquaculture, Volume 1. Technique et Documentation* (ed. G. Barnabé), 345-90. Paris: Lavoisier.
- His, E. 1972. Premiers éléments de comparaison entre l'huître Portugaise et l'huître Japonaise. *Bulletin l'Institut Pêche Maritimes* 219: 1-9.
- Huvet, A. 2000. Ressources génétiques et phylogéographie des huîtres creuses *Crassostrea gigas* et *C. angulata*: variabilité, différenciation et adaptation des populations naturelles et introduites. Ph.D. Thesis, Université François Rabelais, Tours, France.
- Huvet, A., Lapègue, S., Magoulas, A. and Boudry, P. 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics* 1: 251-62.

- Klinbunga, S., Ampayup, P., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Yoosukh, W. 2000. Development of species-specific markers of the tropical oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Marine Biotechnology* 2: 476-484.
- Leitão, A., Boudry, P., Labat, J. and Thiriou-Quévèreux. 1999. Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia* 41: 175-86.
- Mok, T.K. 1973. Studies on spawning and settling of the oyster in relation to seasonal environmental changes in Deep Bay, Hong Kong. *Hong Kong Fisheries Bulletin* 3: 89-101.
- Mok, T.K. 1974a. Observations on the growth of the oyster, *Crassostrea gigas* (Thünberg), in Deep Bay, Hong Kong. *Hong Kong Fisheries Bulletin* 4: 45-54.
- Mok, T.K. 1974b. Study of the feasibility of culturing the Deep Bay Oyster, *Crassostrea gigas* (Thünberg), in Deep Bay, Hong Kong. *Hong Kong Fisheries Bulletin* 4: 55-68.
- Moore, D. 1993. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Volume 1, Unit 2-2 (ed. F.M. Ausubel), 1-2. New York: John Wiley and Sons.
- Morris, S. 1985. Preliminary guide to the oysters of Hong Kong. *Asian Marine Biology* 2: 119-38.
- Morton, B. 1975. Pollution of Hong Kong's commercial oyster beds. *Marine Pollution Bulletin* 6: 117-22.
- Morton, B. 1977. The tidal rhythm of feeding and digestion in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thünberg, 1793) *Journal of the Linnean Society of London* 26: 135-51.
- Morton, B. and Morton, J. 1983. *The Sea Shore Ecology of Hong Kong*. Hong Kong: Hong Kong University Press.
- Morton, B. and Wong, P.S. 1975. The Hong Kong oyster industry. *Journal of the Hong Kong Branch of the Royal Asiatic Society* 15: 139-49.
- Nei, M. and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of National Academy of Science, the United States of America* 76: 5269-5273.
- O'Foighil, D., Gaffney, P.M., Wilbur, A.E. and Hilbish, T.J. 1998. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Marine Biology* 131: 497-503.
- Phillips, D.J.H., Thompson, G.B., Gabuji, K.M. and Ho, C.T. 1982. Trace elements in the Pacific oyster in Hong Kong. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11: 533-7.
- Ranson, G. 1967. Les espèces d'huîtres vivant actuellement dans le monde, définies par leurs coquilles larvaires ou prodissoconques. Etude des collections de quelques uns des grands musées d'Histoire Naturelle. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 31(2): 127-99.
- Reeb, C.A. and Avise, J.C. 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124: 397-406.
- Rohlf, F.J. 1973. Algorithm 76. Hierarchical clustering using the minimum spanning tree. *The Computer Journal* 16: 93-95.
- Rosell, N.C. 1991. The slipper-shaped oyster (*Crassostrea iredalei*) in the Philippines. In *Estaurine and Marine Bivalve Mollusk Culture*. (ed. W. Menzel), 307-313. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Schneider, S., Roessli, D., and Excoffier, L. 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Shumway, S.E. 1996. Natural environment factors. In *The Eastern Oyster Crassostrea virginica* (ed. V.S. Kennedy, R.I.E. Newell and A.F. Eble), 467-513. Maryland: Maryland Sea Grant College.
- Talavera, F. and Faustino, L.A. 1933. Edible mollusks of Manila. *The Philippines Journal of Science* 50: 1-66.
- Tang, V.T. 2001. *The Eastern Sea-Resources and Environment*. Hanoi: Thi Gi Publisher.
- Wong, M.H., Choy, C.K., Lau, W.M. and Cheung, Y.H. 1981. Heavy metal contamination of the Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in Deep Bay, Hong Kong. *Environmental Research* 25: 302-9.
- Young, L. and Melville, D. 1993. Conservation of the Deep Bay environment. In *The Marine Biology of the South China Sea* (ed. B. Morton), 211-31. Proceedings of the First International Conference on

the Marine Biology of Hong Kong and the South China Sea, Hong Kong 1990. Hong Kong: Hong Kong University Press.

II. ETUDE DES POPULATIONS D'HUITRES CREUSES DE MANGROVE, *CRASSOSTREA GASAR* (ADANSON, 1757), PAR L'APPORT DU MARQUEUR NUCLEAIRE ITS2.

INTRODUCTION

Les huîtres sont des mollusques bivalves marins dont les nombreuses espèces ont colonisé la quasi totalité des milieux côtiers tempérés et tropicaux. Elles font l'objet, dans de nombreux cas, d'une culture intensive. Le genre *Crassostrea* regroupe plusieurs espèces d'huîtres creuses, il est le plus répandu et le mieux connu car il alimente un commerce important.

Les différentes espèces ont d'abord été décrites selon des critères morphologiques et de localisation géographique, ainsi que par des essais de croisements (Gaffney and Allen, 1994) et des études de caryotypes (Leitao et al., 1999). Ces premières classifications ont pu être confirmées ou redéfinies grâce à l'apport de la biologie moléculaire et des marqueurs moléculaires (ex : *C. sikamea* Banks et al., 1994). Les marqueurs sont des fragments d'ADN qui servent de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre. Ils sont notamment utilisés en phylogénie moléculaire pour construire les arbres phylogénétiques (Ladron De Guevara et al., 1996) ou, comme c'est le cas ici pour permettre d'observer l'évolution au sein d'une espèce et tenter de retracer les événements qui sont à l'origine de sa répartition actuelle. Grâce aux progrès récents de la biologie moléculaire, en particulier la découverte des séquences très variables (ITS, microsatellites, transposons) et la technique d'amplification des séquences d'ADN par PCR, de nombreux marqueurs génétiques sont maintenant disponibles (Klinbunga et al., 2001). La fiabilité de ces méthodes permet d'écarter les incertitudes causées par des problèmes de plasticité morphologique et de répartition plus ou moins bien définie. Chez les huîtres, les marqueurs moléculaires, s'ils sont variables peuvent permettre d'observer une différenciation individuelle et donc de réaliser des analyses de parenté (Huvet et al., in press), mais aussi d'obtenir des informations d'ordre historique sur l'évolution d'une espèce et la structuration des populations (Huvet et al., 2000).

Ainsi dans le cas d'huîtres creuses peuplant les côtes de l'Amérique du sud et de l'Afrique, des études sur des marqueurs mitochondriaux 16S (Boutet, 1999) ont permis d'apporter des précisions sur la taxonomie et la phylogéographie des différentes espèces présentes. Ce travail a permis en particulier de différencier deux espèces sympatriques en Amérique du sud : *Crassostrea rizophorae* et *C. gasar* (Lapègue et al., in press).

C. gasar est une huître creuse vivant dans un milieu mésohalin, la mangrove. La mangrove est une formation végétale très particulière des zones côtières tropicales (cf : figure 1). Elle se développe sur des vases plus ou moins salées des zones balayées par les marées mais protégées des vagues. Ces formations sont importantes écologiquement et économiquement, par leur production primaire parmi les plus élevées du monde, par leur rôle protecteur vis-à-vis de la côte et peut-être surtout par le rôle qu'elles jouent dans la reproduction de nombreuses espèces animales dont beaucoup sont exploitées comme des poissons et des crustacés (Ajana, 1979).

Décrite en 1757 sur les côtes Ouest africaines par Adanson, on sait donc aujourd'hui que *C. gasar* est également présente de l'autre côté de l'atlantique, en Amérique du sud. Cette espèce, parfaitement adaptée à ce milieu variable, semble pouvoir supporter d'importantes fluctuations de salinité (Gilles, 1991). En raison de ses excellentes qualités organoleptiques, cette huître est consommée, par les populations côtières et dans les grandes villes du Sénégal. Depuis de nombreuses années des essais d'aquaculture se sont développés, notamment à Joal et en Casamance. Mais, pour diverses raisons, dont la méconnaissance de la biologie de cette espèce, ces essais sont restés infructueux (Diadhiou, 1995).

La répartition de cette huître sur les côtes africaines et américaines a permis d'effectuer un échantillonnage sur plusieurs sites distincts. Cette répartition laisse supposer que les flux géniques peuvent être limités et pose la question de l'origine des populations. En effet, les transports marchands sont susceptibles de casser les barrières géographiques en permettant le déplacement « artificiel » d'individus sur de grandes distances (ex : *C. angulata*, Boudry et al., 1998). De plus la nature ouverte de l'océan, la taille importante des populations et la phase larvaire planctonique sont autant de facteurs pouvant permettre des flux géniques importants entre populations.

Les premiers travaux effectués sur cette espèce avec le marqueur ITS1 (InterTranscriptase Sequence 1) ne permirent pas d'obtenir de résultats satisfaisants (Verdon, 2000). De plus, ne possédant aucune amorce pour des marqueurs moléculaires de type microsatellite chez cette espèce, une étude de génétique des populations a donc été réalisée avec un autre marqueur nucléaire variable : l'ITS2 (InterTranscriptase Sequence 2). Cette séquence sépare les gènes qui codent pour les ARN ribosomiques 5,8 S et 28 S. Cette séquence n'étant pas transcrite, elle n'est pas soumise aux pressions de sélection, ainsi les mutations ne sont pas délétères pour l'organisme et peuvent donc s'accumuler et être transmises à la descendance.

Ce fragment a été étudié grâce aux techniques « classiques » de la biologie moléculaire : amplification du fragment, à partir d'amorces mises au point chez d'autres espèces du genre *Crassostrea* (Xu et al., 2001), révélation d'un polymorphisme de fragments de restriction (RFLP) et séquençage. La RFLP est une bonne technique pour l'étude de la divergence génétique entre les populations à large aire de répartition (Avisé et al, 1987 ; Seutin et al, 1993). Trois populations de chaque continent seront étudiées. Leur séparation géographique (cf : figure 1) laisse supposer une limitation des flux géniques naturels. Ce travail a donc pour but de rechercher des marqueurs nucléaires polymorphes susceptibles de mettre en évidence la présence de barrières géographiques limitant les flux géniques. Le séquençage permettant d'affiner au maximum les informations recueillies pour chaque type observé devrait permettre de retracer l'évolution de la répartition de l'espèce.



Figure 1 : répartition mondiale des écosystèmes de type mangrove (Aubresil.net).

MATERIEL ET METHODES

La détection du polymorphisme entre les différentes populations d'huîtres *C. gasar* étudiées nécessite successivement plusieurs étapes. En premier lieu, l'ADN est extrait de chaque individu. On réalise ensuite une amplification du fragment ITS2 qui sera le produit de base pour l'analyse du polymorphisme par les méthodes de RFLP et de séquençage.

Les populations étudiées :

Pour cette étude, 6 populations provenant d'Afrique et d'Amérique ont été choisies parmi, un nombre important d'échantillons de diverse provenance. La répartition géographique de ces populations est représentée sur la figure 2.

Le Tableau 1 présente le lieu de prélèvement de chacune des populations et le nombre d'individus étudiés. Pour chaque individu un morceau de tissu, pouvant être de la branchie, du manteau ou du muscle a été prélevé et conservé dans l'éthanol absolue à température ambiante.

Tableau 1 : Liste des différentes populations étudiées, site de prélèvement et nombre d'individus disponibles.

Continent	Population	Lieu de prélèvement	Nombre d'individus
AFRIQUE	DAM	Nigéria - Delta du niger	29
	NOB	Sénégal- - Kafountine, Casamance	10
	ALM	Sénégal- Pointe des Almadies	22
AMERIQUE DU SUD	SIN	Guyane - Mont Sinery	44
	PAR	Brésil - Baie de paranagua	27
	CAN	Brésil - Cananéia	50

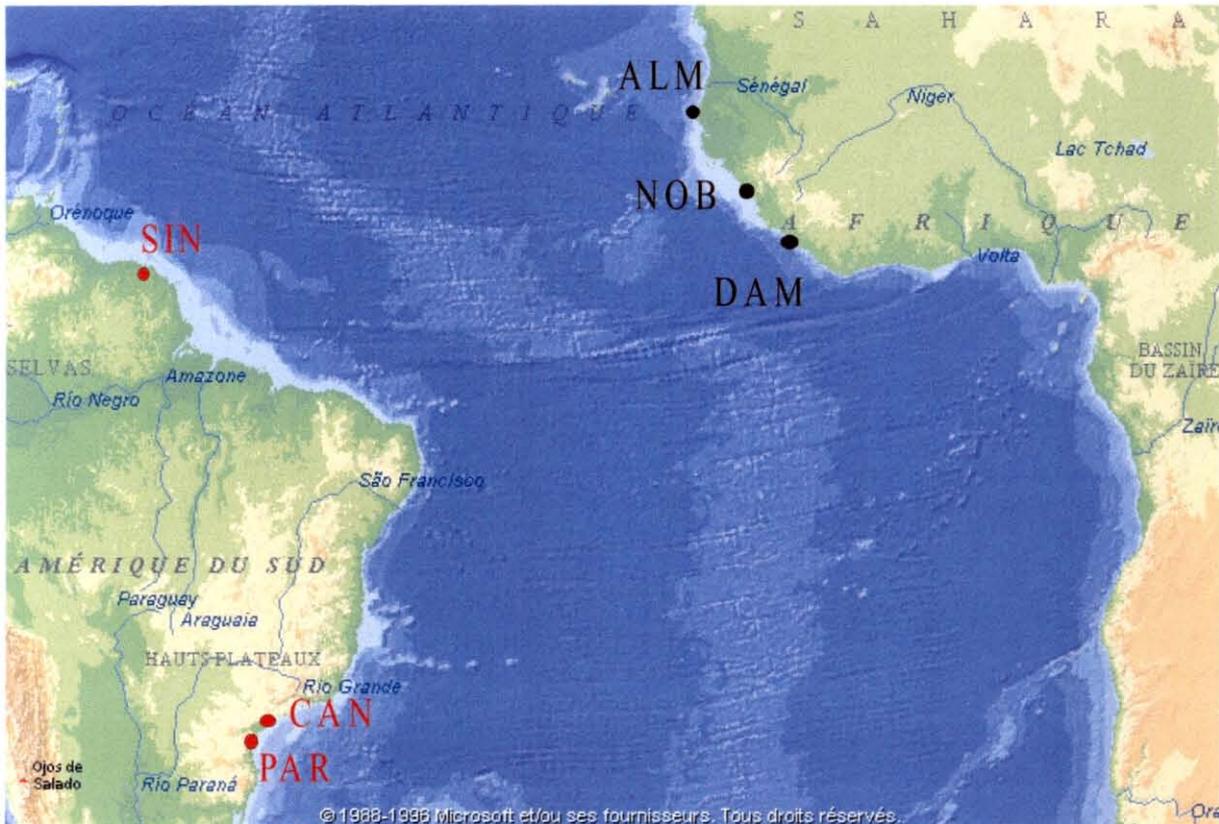


Figure 1 : Carte situant les différentes populations étudiées de chaque côté de l'océan Atlantique

Extraction de l'ADN :

L'ADN est extrait par la méthode dite du phénol-chloroforme comme décrit par Desmarais et al. (1995).

Trois étapes se succèdent (cf : protocole détaillé et composition des tampons en annexe 1).

1- Dissociation des tissus et destruction des membranes cellulaires par l'action d'un tampon dénaturant contenant : du SDS (Sodium Dodécil Sulfate) qui est un détergent ionique se fixant uniformément sur les protéines et les dénaturant en les chargeant négativement, de l'EDTA (éthylène diamine tétraacétique) qui est un agent chélateur complexant les ions Ca^{2+} indispensables à la cohésion cellulaire (composition du tampon en annexe 1) et par l'action de la protéinase K active à $55^{\circ}C$, qui dégrade les protéines par rupture des liaisons esters entre les acides aminés.

2- Extraction des acides nucléiques par adjonction successive de phénol aqueux, qui est un déprotéinisant, au tampon d'extraction, puis de chloroforme au surnageant aqueux contenant l'ADN pour éliminer les traces de phénol résiduelles.

3- Précipitation de l'ADN en présence d'éthanol absolu et stockage 2h à $-20^{\circ}C$. Après centrifugation les culots d'ADN sont lavés avec de l'éthanol à 70° . Enfin les culots secs sont repris avec 75 à $100\mu l$ de TE (Tris-EDTA) 1X.

Amplification de la séquence ITS2 :

Pour permettre l'étude du polymorphisme, il faut un grand nombre de copies du fragment d'ADN ITS2 pour appliquer les différentes techniques et permettre une révélation des résultats par électrophorèse. Ce grand nombre de copies est obtenu grâce à la réaction de polymérisation en chaîne (Saiki R. K. et al., 1985).

Cette technique permet l'amplification *in vitro* d'ADN spécifique. Une polymérase thermostable (à 95°C) de la bactérie *Thermus aquaticus*, la Taq polymérase est utilisée pour catalyser l'élongation simultanée de deux oligonucléotides (amorces) complémentaires aux régions bordant la séquence à amplifier. Lorsque la réplication du segment compris entre les deux amorces est terminée (un cycle), les deux duplex formés sont dénaturés par la chaleur pour produire des matrices monocaténaïres et un second cycle de réplication est effectué en abaissant la température en présence de tous les composants requis pour la polymérisation. La répétition des cycles de synthèse et de dénaturation entraîne un accroissement exponentiel du nombre de fragments (ici ITS2). Ainsi de très petites quantités d'ADN sont requises comme matrice et une quantité suffisante d'ADN est amplifiée pour qu'une bande visible sur gel soit obtenue.

Les amorces utilisées ont été mises au point lors d'une étude sur les huîtres creuses *C. virginica* et *C. gigas* (Xu Z. et al., 2001), et sont supposées utilisables pour les différentes espèces du genre. Les deux amorces nommées ITS2 R et F se composent de 19 et 20 paires de bases (les séquences sont données en annexe 2). Le fragment ITS2 amplifié comprend environ 750 paires de bases (cf : séquence en annexe 5)

Le protocole et la séquence des amorces sont détaillés en annexe 2.

Révélation du polymorphisme :

Lors de cette étude deux étapes se sont succédées pour permettre la mise en évidence de polymorphisme génétique entre les différentes populations. Les deux techniques utilisées sont : la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et le séquençage.

RFLP

La RFLP utilise les propriétés d'enzymes bactériennes dites de restrictions, synthétisées par ces organismes dans le but de casser l'ADN étranger pouvant pénétrer dans la cellule. Ces enzymes reconnaissent une séquence spécifique de 4 à 10 paires de bases et coupent la molécule d'ADN en un site très précis. Ainsi des différences entre les échantillons dans la séquence amplifiée peuvent être mises en évidence par reconnaissance ou non de sites de restriction par l'enzyme. Les différences des profils de restriction révélées par électrophorèse permettent donc de conclure à la présence d'un polymorphisme génétique. Les enzymes sont mises en présence du produit de PCR brut et incubées au bain marie à leur température optimale d'activité. Les résultats de la digestion sont révélés sur gel d'acrylamide. Les deux protocoles sont détaillés en annexe 3.

Séquençage

Le séquençage consiste à révéler directement la séquence des acides nucléiques (cf : annexe 4). Les produits de PCR purifiés (cf : annexe 4) sont analysés par la méthode de séquençage multiplex d'ADN double brin avec des amorces marquées et l'enzyme sequiterm excell II (épicycle) préconisée pour

l'utilisation du séquenceur disponible au laboratoire (Licor). Le principe de cette technique repose 1) sur le séquençage enzymatique décrit par Sanger en 1977, 2) sur la technique de PCR asymétrique :

1) Elongation à partir d'une amorce d'un ADN complémentaire à une matrice par une ADN polymérase ; terminaison aléatoire de la chaîne néosynthétisée par des didéoxyribonucléotides. Ici deux amorces (sens et antisens) encadrant le fragment à séquencer sont utilisées en même temps. L'une des amorces est marquée par un fluorochrome absorbant à 700 nm, l'autre à 800 nm. Le laser du séquenceur active simultanément les deux fluorochromes et permet ainsi la lecture de la séquence à partir des deux amorces soit dans les deux sens.

2) Une série de 30 cycles de dénaturation, hybridation des amorces et élongation permet d'amplifier le signal.

En pratique, 1 à 6 μ l de produit de PCR purifié (selon la concentration d'ADN évaluée par comparaison à un ladder 40 et 250 fmole) sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant 1 picomole de chaque amorce, le tampon de l'enzyme et 5 unités d'Excell II DNA polymérase. Ce mélange est réparti dans 4 tubes contenant les didéoxyribonucléotides ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP. Le mélange est incubé 2 minutes à 92°C suivi de 30 cycles de 30 secondes à 92°C, 30 secondes à 54°C et 1 minute à 70 °C. A la fin de la réaction, une solution d'arrêt est ajoutée aux échantillons. Après une dénaturation de 3 minutes à 92°C, les échantillons sont déposés dans un gel d'acrylamide-urée (composition du gel cf :annexe 4) dénaturant à 5.5% pour la séparation des fragments nucléotide par nucléotide.

Analyse des données :

Les données compilées sur tableur sont analysées avec le logiciel Statgraph. Plusieurs tests de comparaisons non paramétriques de Kruskal-wallis comparer les proportions des différents types observés ont été réalisés.

Les séquences obtenues sont comparées par le programme d'alignement multiple Clustal W disponible sur Internet (site www.infobiogen) et grâce au logiciel DNA man .

Les cartes de restriction ont été réalisées avec le logiciel d'analyse nucléaire du site infobiogen.

Les séquences ont été comparées avec la base de données genbank grâce au logiciel Blast disponible sur internet.

RESULTATS

Mise au point de l'amplification de la séquence ITS2 :

L'utilisation des amorces ITS2 « Forward » et « Reverse » avec le protocole de PCR détaillé plus avant donne de bons résultats et une amplification quasi constante des ADNs extraits utilisés à faible concentration. Cependant, il est vite apparu, lors d'essais de RFLP et d'électrophorèse des produits de PCR sur gel d'acrylamide, que des bandes parasites, plus ou moins nettes, résultantes d'hybridations aspécifiques des amorces apparaissaient. Ce problème complique la lecture des profils de restriction et surtout fausse le séquençage et donc entraîne des erreurs d'interprétation des résultats. Pour résoudre cela, la première démarche fut d'augmenter la stringence (donc la spécificité) du protocole de la PCR. On a donc tout d'abord augmenté la température d'hybridation des amorces (jusqu'à 10°C de plus que pour le protocole initial) et on a réalisé une gamme de concentration en MgCl₂ (la diminution de la concentration en MgCl₂ augmentant la stringence). Ces premiers essais de réglage ne permirent pas d'éliminer les bandes aspécifiques observées et de plus diminuaient la qualité de la RFLP par manque de copies de la séquence ITS2 (séquence qui sépare les gènes qui codent pour les ARN ribosomiques 5,8 S et 28 S) dans le produit de PCR.

Une nouvelle mise au point fut alors effectuée en recherchant la température d'hybridation la mieux adaptée et en modifiant les concentrations d'ADN matrice. Pour cela nous avons réalisé une gamme combinant la température d'hybridation, qui s'étale de 44 à 66°C avec un intervalle de 2°C et la dilution de l'ADN extrait, qui va de 1 à 50% (cf : figures 3 à 5). Cette gamme a donc permis de déterminer la température optimale d'hybridation chez *C. gasar*, qui fut établie à 54°C. En revanche pour la concentration de l'ADN, il est apparu que la trop grande disparité de la qualité des extractions ne permettait pas de fixer une concentration idéale pour tous les échantillons. Il a donc fallu adapter la concentration d'ADN pour chaque individu, lors de la PCR. En effet les différents tissus ne sont pas tous de la même qualité, la conservation étant de plus ou moins bonne qualité à cause de la quantité des tissus dans l'épendorf et de problème d'évaporation de l'alcool. Malgré tout il est difficile de prévoir la qualité de l'extraction d'ADN et de l'amplification à la vue du tissus.

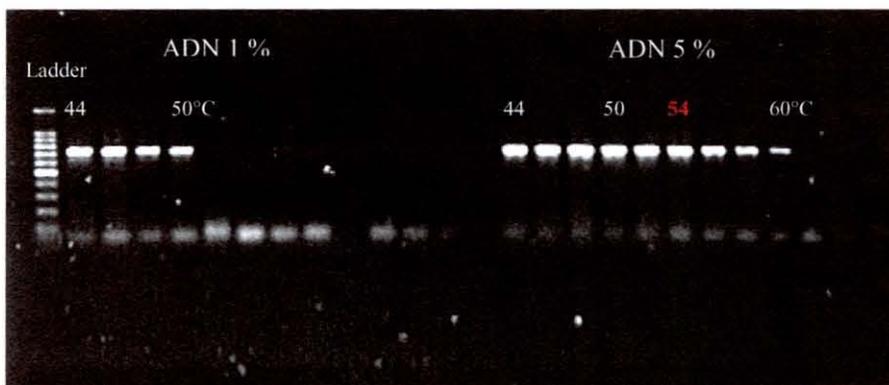


Figure 3 : Gamme de température pour la mise au point de la PCR avec ici des ADN matrices diluées à 1 et 5 %.

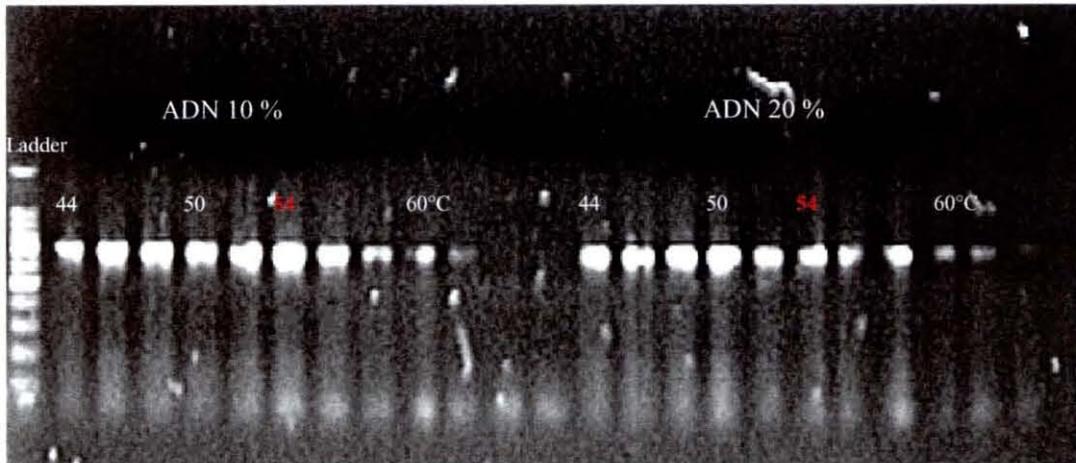


Figure 4 : Gamme de température pour la mise au point de la PCR avec des ADN matrices diluées à 10 et 20 %.

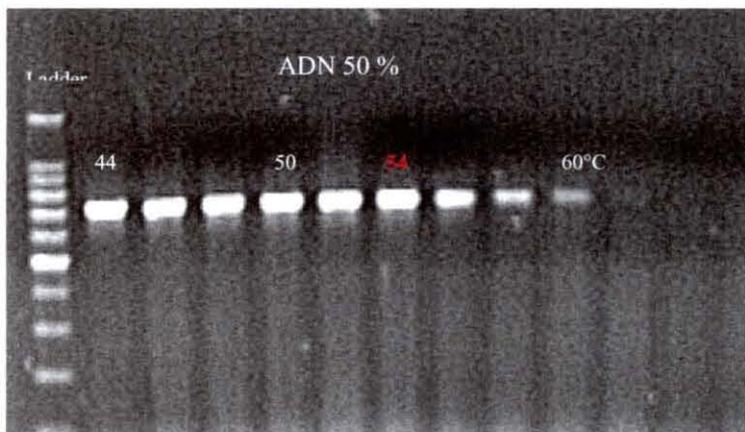


Figure 5 : Gamme de température pour la mise au point de la PCR avec des ADN matrices diluées à 50 %.

Détection du polymorphisme par la technique de RFLP :

Dans cette étude, l'utilisation des amorces (ITS2 R et F) a permis d'amplifier le fragment d'ADN ITS2. Ce fragment s'est révélé être un bon marqueur moléculaire pour mettre en évidence le polymorphisme entre les différentes populations de *C. gasar* étudiées.

La première étape de l'étude du polymorphisme fut de tester plusieurs enzymes de restrictions en RFLP. Les différents types d'enzymes et les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Différentes enzymes testées et résultats obtenus (protocole RFLP pour chaque enzyme cf : annexe 3) :

Enzymes testées	Résultats
Hha I	Polymorphisme, 2 profils
Taq I	Polymorphisme, 2 profils
Mse I	monomorphe
Xho I	monomorphe
Bgl I	monomorphe (pas de site de restriction)
Acc I	monomorphe (pas de site de restriction)
Bsp 143 I	monomorphe

L'enzyme Hha I a permis de mettre en évidence des différences dans les profils de restriction entre les individus des populations africaines. En effet deux profils apparaissent : Un, H 1, avec deux bandes, assez éloignées l'une de l'autre, une en dessous et une au dessus de 300 paires de base et un autre, H 2, avec deux bandes de tailles très proches (cf : figures 7 à 11). On remarque de plus que dans ces populations africaines le profil H 1 semble à première vu plus présent que le deuxième. En revanche pour les populations américaines ce polymorphisme n'est pas observé, seul le profil H 2 est présent (cf : figures 12 à 16).

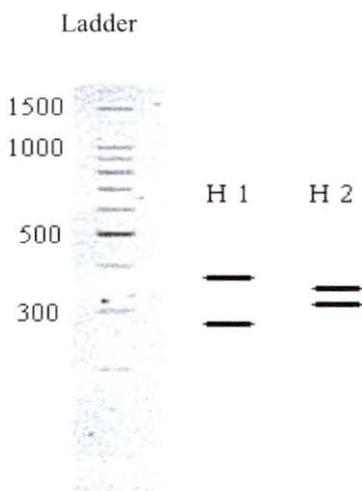


Figure 7 : Schéma représentatif des deux profils.

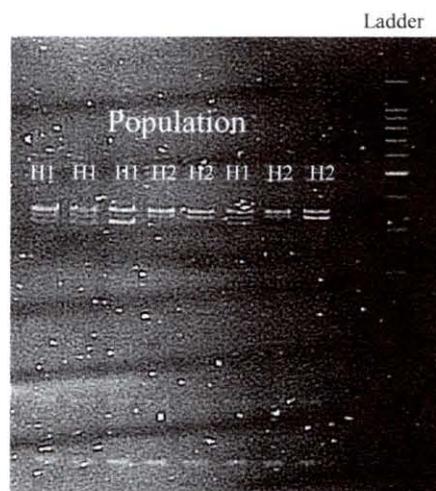


Figure 8 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus NOB par l'enzyme HhaI sur gel d'acrylamide à 8 %. On voit bien apparaître ici les deux profils différents décrits plus avant.

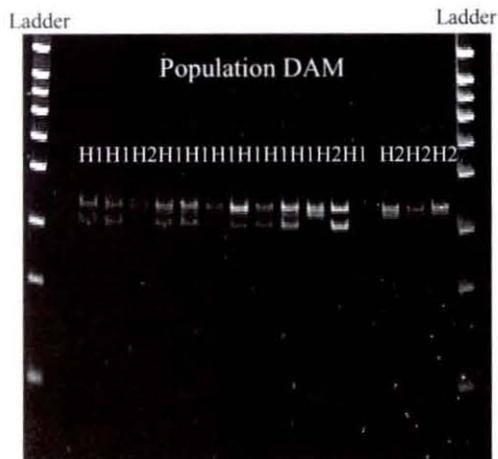
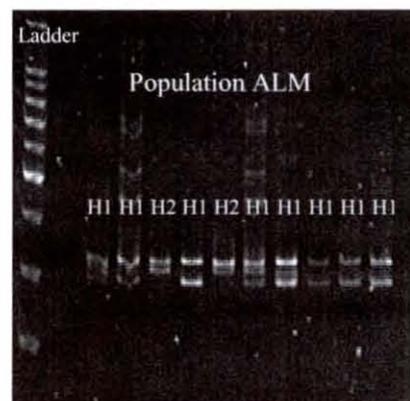
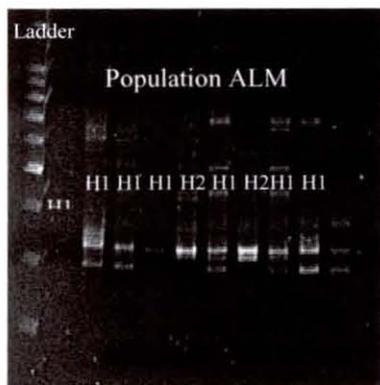
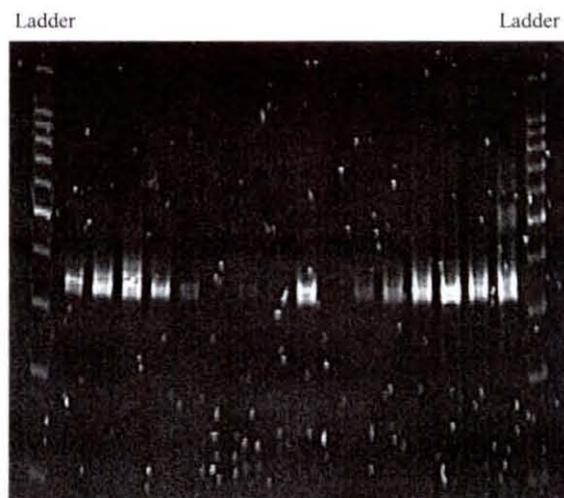
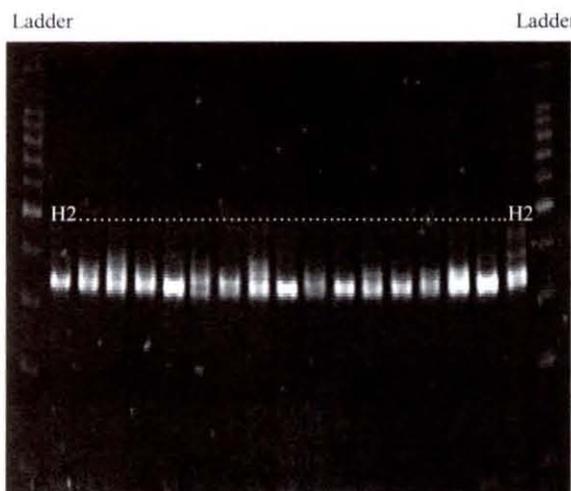


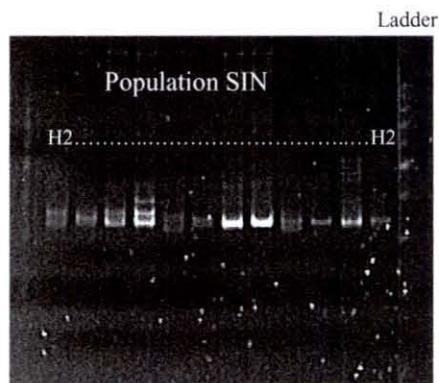
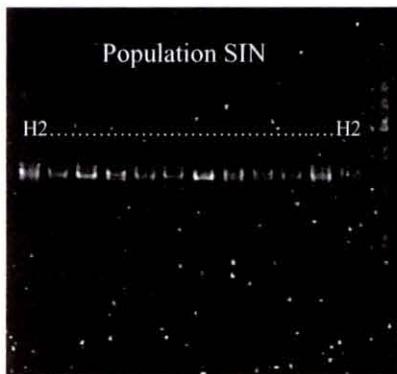
Figure 9 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus DAM par l'enzyme Hha I sur gel d'acrylamide à 8%. On voit bien apparaître ici encore les deux profils différents décrits plus avant (H 1, H 2).



Figures 10 et 11 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus ALM par l'enzyme Hha I sur gel d'acrylamide à 8%. On voit bien apparaître ici aussi les deux profils différents décrits plus avant (H 1, H 2).



Figures 12 et 13 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus CAN par l'enzyme Hha I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas seul le profil H 2 apparaît.



Figures 14 et 15 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus SIN par l'enzyme Hha I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas aussi seul le profil H 2 apparaît.

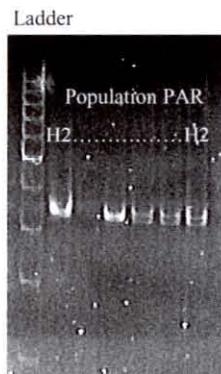


Figure 16 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus PAR par l'enzyme Hha I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas encore seul le profil H 2 apparaît.

L'enzyme Taq I met en évidence une différence génétique entre les populations africaines et américaines. En effet deux profils différents sont obtenus par RFLP : T 1 et T 2 (cf : figure 17 représentant les deux profils). Chaque profil semble inféodé à un continent le profil T 1 pour les populations africaines (cf : figures 18 à 22) et le profil T 2 pour les populations américaines (cf : figures 23 à 27). Cependant le T 2 semble apparaître aussi chez 4 individus de la population ALM qui se situe en Afrique (cf : figure 22). Les gels d'acrylamides sont difficiles à lire en raison du nombre important de fragments de restriction et de la petite taille des fragments polymorphes.

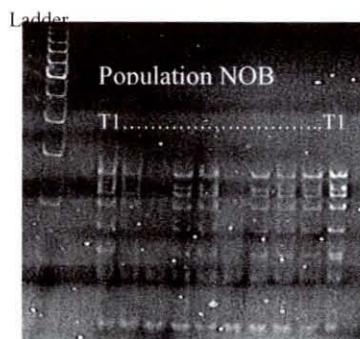
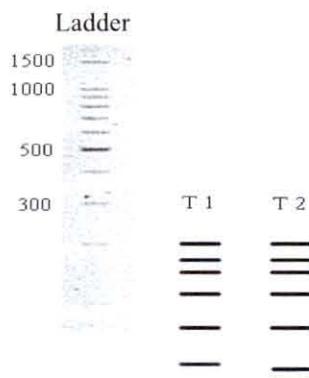
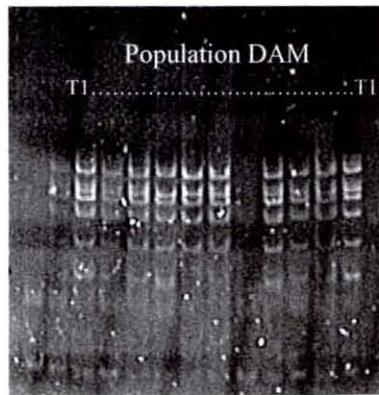
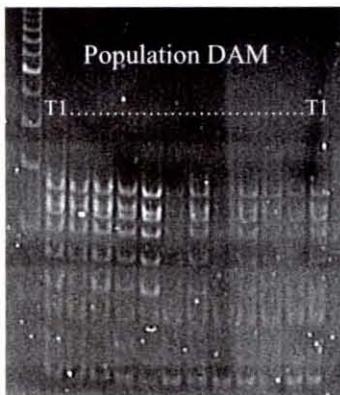
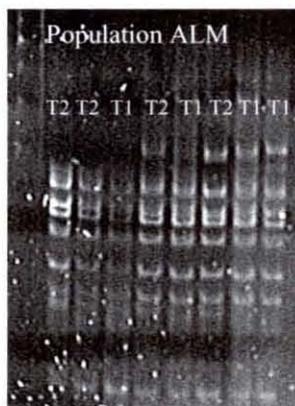
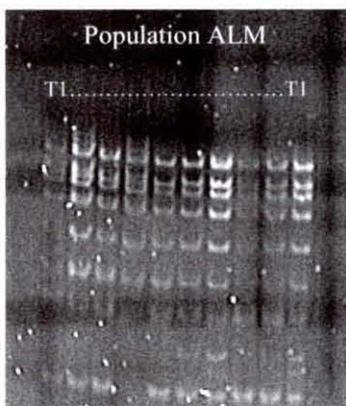


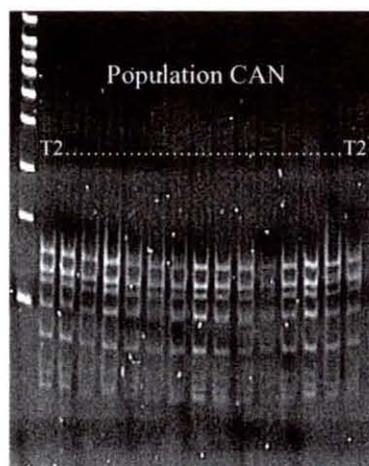
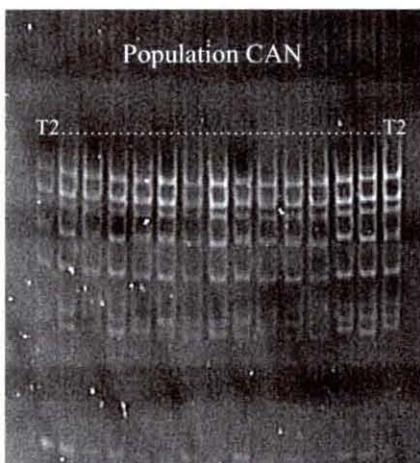
Figure 17 : Schéma représentant les profils T 1 et T 2. Figure 18 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus NOB par l'enzyme Taq I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas seul le profil T 1 apparaît.



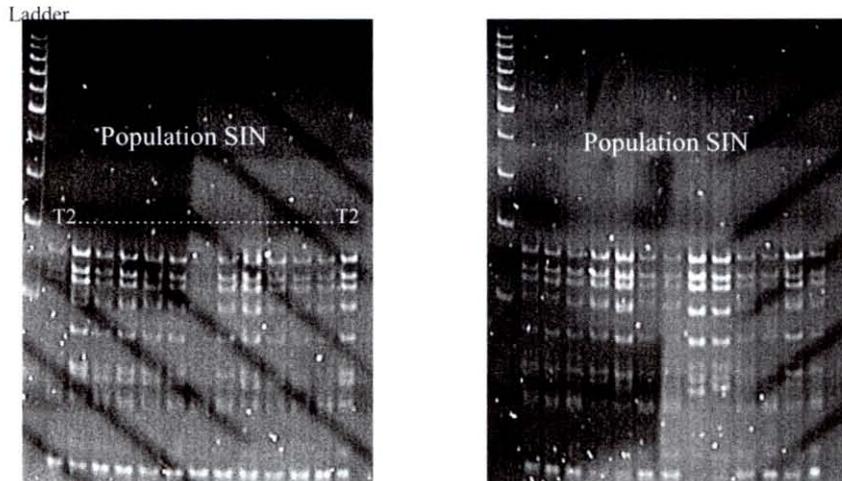
Figures 19 et 20 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus DAM par l'enzyme Taq I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas aussi seul le profil T 1 apparaît.



Figures 21 et 22 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus ALM par l'enzyme Taq I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas deux profils apparaissent : T 1 et T 2.



Figures 23 et 24 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus CAN par l'enzyme Taq I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas seul le profil T 2 apparaît.



Figures 25 et 26 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus SIN par l'enzyme Taq I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas aussi seul le profil T 2 apparaît.

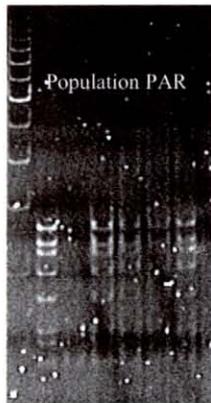


Figure 27 : Résultats de la digestion des produits de PCR des individus SIN par l'enzyme Taq I sur gel d'acrylamide à 8%. Dans ce cas aussi seul le profil T 2 apparaît.

Ces différentes observations ont fait l'objet d'une analyse statistique. Les fréquences de chaque profil sont répertoriées dans le tableau : 3, et celles des différents génotypes observés sont répertoriés dans le tableau : 4. La figure 28 représente sous forme d'un histogramme la répartition des profils H 1 et H 2 révélés par l'enzyme Hha I.

Tableau 3 : Fréquence des différents profils observés pour chaque population.

Continents	Populations	Effectif	H 1	H 2	T 1	T 2
Afrique	NOB	8	0.500	0.500	1.000	0.000
	DAM	14	0.786	0.214	1.000	0.000
	ALM	19	0.789	0.211	0.789	0.211
Amérique	CAN	29	0.000	1.000	0.000	1.000
	SIN	24	0.000	1.000	0.000	1.000
	PAR	5	0.000	1.000	0.000	1.000

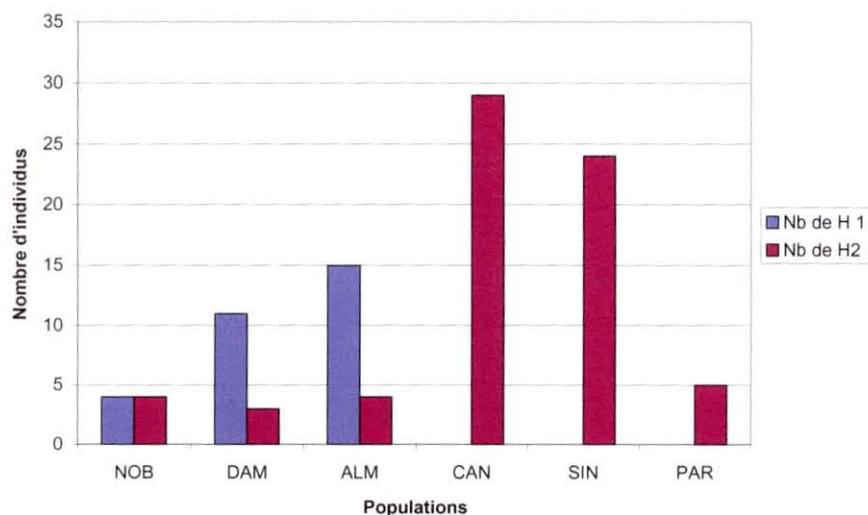


Figure 28 : Histogramme regroupant les résultats des RFLP avec l'enzyme Hha 1. Ce schéma indique le nombre de chacun des profils pour chaque population.

Tableau 4 : Fréquences des quatre génotypes observés.

Continents	Populations	H 1/T 1	H 1/T 2	H 2/T 1	H 2/T 2
Afrique	NOB	0.500	0.000	0.500	0.000
	DAM	0.786	0.000	0.214	0.000
	ALM	0.632	0.105	0.158	0.105
Amérique	CAN	0.000	0.000	0.000	1.000
	SIN	0.000	0.000	0.000	1.000
	PAR	0.000	0.000	0.000	1.000

Deux tests de Kruskal-Wallis sont donc effectués. Le premier démontre une différence significative sur la présence des profils en fonction des continents ($p < 0.01$) (cf : tableau 5), le deuxième concernant le continent africain (seul possédant deux profils distincts) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les populations pour le facteur profil ($p = 0,265$) (cf : tableau 6). Aucun test n'a pu être effectué spécifiquement sur le continent américain, celui-ci ne présentant qu'un seul profil.

Tableau 5 : Test non paramétrique de Kruskal-Wallis sur le facteur profil en fonction des continents.

Kruskal-Wallis Test for morphe by continent

continent	Sample Size	Average Rank
Afrique	41	28,7805
Amerique	58	65,0

Test statistic = 60,2757 P-Value = 0,0

Tableau 6 : Test non paramétrique de Kruskal-Wallis sur le facteur profil en fonction des populations du continent africain.

Kruskal-Wallis Test for morphe by population

population	Sample Size	Average Rank
ALM	19	19,8158
DAM	14	19,8929
NOB	8	25,75

Test statistic = 2,65254 P-Value = 0,265466

Séquençage

Résultats du séquençage :

Les différentes tentatives de séquençage ont été réalisées avec le séquenceur automatique Licor. Le séquençage de huit individus de 5 populations (CAN 1 et 3, NOB 10 et 11, DAM 19 et 21, PAR 3 et SIN 17) a été réalisé en testant trois concentrations d'ADN (1, 3 et 6 μ l de produit de PCR). Ces quantités ont été choisies aux vues de la concentration en ADN assez faible des produits de PCR. Les séquences des deux brins réverses sont obtenues grâce aux deux lasers sensibles aux longueurs d'ondes 700 et 800 nm excitant les deux fluorochromes complexés aux amorces sens et antisens. Malgré un réel manque de temps pour la mise au point du protocole, il a été possible d'obtenir une partie de la séquence ITS2 pour deux individus appartenants aux populations CAN et DAM. En effet nous avons pu lire environ 600 pb pour CAN 1 et 450 pb pour DAM 21. Pour les autres individus seulement 100 à 300 pb sont lues avec trop d'incertitudes et ne permettent pas d'effectuer une bonne analyse. Il semble donc qu'il y ait de grosses disparités entre les échantillons en raison de la qualité des produits de PCR. Il faut donc envisager une meilleure détermination de la concentration en ADN des produits amplifiés pour ajuster la quantité de ces produits à utiliser pour la réaction de séquence. Il faudrait de plus tenter d'obtenir des fragments plus uniformes grâce à une meilleure spécificité des amorces. La figure 29 représente une partie du gel de séquence révélé par le laser émettant à 700 nm.

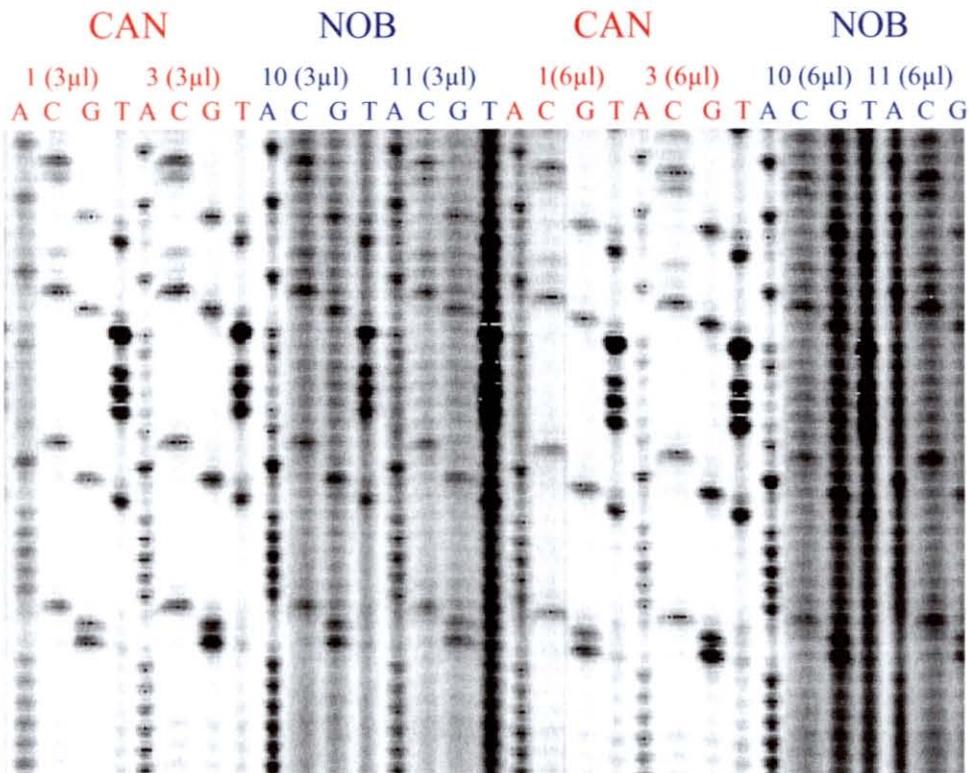


Figure 29 : Extrait de la photo du gel de séquence, obtenue avec le laser 700 nm. Sont indiqués au-dessus : le nom des populations, le numéro de l'échantillon (la quantité d'ADN placée dans le mix), les quatre déoxynucléotides. On peut voir sur cette photo que le gel est plus foncé pour les individus NOB ce qui à terme a rendu impossible la lecture du gel.

Analyse de la séquence

1. Alignement des séquences :

Nous avons pu aligner les séquences CAN 1 et DAM 21 sur environ 400 pb avec le logiciel clustlaw. Nous obtenons 97% d'homologie (cf : figure 30). Un alignement avec la séquence de *Crassostrea gigas* nous donne 56% d'homologie. Seules 400 bases ont été retenues car le reste présentait trop d'ambiguïtés.

2. Alignement avec les bases de données :

Le logiciel Blast (Altschul, 1990) comparant la séquence soumise à la base de données Genbank met en évidence un recouvrement avec la séquence ITS2 de *C. gigas*.

3. Analyse des sites de restriction :

Le logiciel d'analyse nucléaire du site d'infobiogen nous a permis d'obtenir la liste des enzymes de restriction les plus courantes coupant la séquence de 400 paires de bases. Il a ainsi été possible de sélectionner les enzymes divergentes entre les deux séquences. Une carte de restriction a donc été réalisée avec ces enzymes (cf : figure 30). Celle-ci nous permet de voir que plusieurs enzymes susceptibles de révéler du polymorphisme entre les deux continents peuvent encore être testées pour compléter l'étude.

Neufs enzymes ont ainsi pu être sélectionnées : - 4 coupant sur la séquence africaine, *BsI*, *MboII*, *TaqI* et *BsaXI*.

- 5 coupant sur la séquence américaine, *BcgI*, *BsaJI*, *StyI*, *AcII* et *TscI*.

Toutes les enzymes reconnaissent des sites de coupure présentant des différences entre les deux séquences. Ainsi elles ne coupent qu'un seul type et permettent la mise en évidence du polymorphisme génétique.

Un site polymorphe pour *TaqI* a bien été trouvé, sur une région présentant des délétions, ce qui confirme les résultats obtenus par RFLP. En revanche sur cette portion du fragment aucun site polymorphe pour *HhaI* n'a été mis en évidence.

Upper line : DAM21, from 1 to 421

Lower line : CAN1, from 1 to 430

identity= 97%

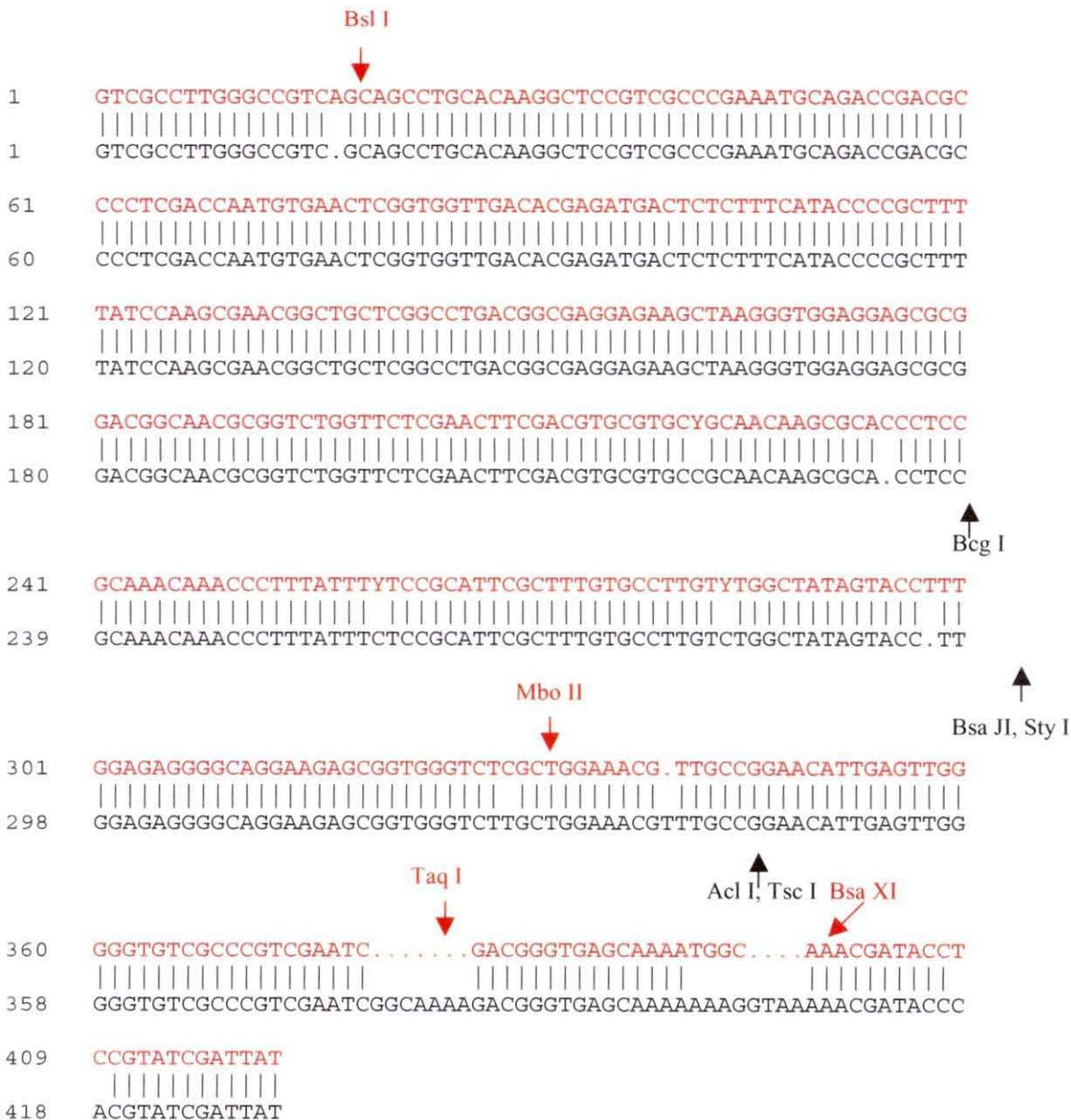


Figure 30 : Aligement des deux séquences obtenues. Les différentes enzymes retenues après l'analyse sont positionnées sur la figure.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La découverte de la présence de l'espèce *C. gasar* sur les côtes américaines (Lapègue et al., soumis) initialement décrites sur les côtes africaines (Adanson, 1757) a inévitablement suscité de nombreuses interrogations.

En effet la présence d'une espèce dans deux continents séparés par un océan laisse penser :

- certaines populations sont plus récentes que les autres.
- l'éloignement géographique implique une limitation des flux géniques et ainsi la mise en place de divergences génétiques.

C'est par une étude de génétique des populations sur les séquences variables du génome qu'il est possible de mettre en évidence des différences entre des individus morphologiquement identiques et génétiquement très proches.

Notre étude réalisée sur le fragment ITS2, séparant les gènes 5,8 et 28 S, a tout d'abord permis de démontrer que celui-ci était un bon marqueur moléculaire dont la variabilité permet de mettre en évidence des différences entre les individus vivant dans des sites différents.

Le premier objectif de cette étude était donc de détecter une différenciation entre populations. Pour cela les fragments ITS2, amplifiés par PCR, de tous les individus disponibles de chaque population ont été comparés par RFLP. Après une analyse statistique des résultats il est possible de confirmer l'hypothèse de la présence de populations génétiquement distinctes. En effet les résultats, obtenus grâce à l'étude réalisée avec l'enzyme de restriction *HhaI*, mettent en évidence une différence nette entre les populations africaines et américaines. En effet, on peut observer sur le continent africain un polymorphisme intra-population (présence de deux profils de restriction H 1 et H 2) totalement absent sur le continent américain (présence uniquement du profil H 2). En revanche, ces premiers résultats n'ont pas permis de différencier les populations d'un même continent. Les pourcentages de chaque profil pour les populations africaines ne sont pas significativement différents et pour le continent américain il n'y a aucun polymorphisme mis en évidence par cette première étude. Une des hypothèses au vu de ces résultats serait donc que la différence génétique entre les deux continents est très nette, ce qui implique une absence de flux géniques récents de l'Afrique vers l'Amérique.

L'étude réalisée avec l'enzyme *TaqI* met elle aussi en évidence un polymorphisme inter-continent qui confirme les premiers résultats. Chaque continent présente un profil différent, majoritaire ou unique dans chaque population. Seule la population ALM du Sénégal présenterait les deux profils. Ces résultats sont à confirmer étant donné la difficulté de lecture des profils de restriction. En revanche aucun polymorphisme inter-population n'est observé sur le continent américain.

Cela pourrait s'expliquer par le fait que la colonisation américaine est trop récente pour que des mutations différenciant les populations aient pu s'installer et que la colonisation a été faite à partir d'une base génétique restreinte.

Le deuxième objectif est de commencer à retracer l'histoire évolutive de la répartition de l'espèce sur les différentes régions de l'océan Atlantique. Les résultats obtenus avec l'enzyme *HhaI* montrent un polymorphisme intra-population uniquement en Afrique. Ceci laisse donc supposer que les populations de ce continent sont plus anciennes. En effet l'étude du polymorphisme est basée sur l'observation de l'accumulation des mutations au cours du temps. Il est donc logique de penser que le nombre de mutations augmente au cours du temps et qu'une population est d'autant plus ancienne que le polymorphisme interindividuel est important. Les populations américaines n'ont semble-t-il pas eu le temps d'accumuler des mutations sur le site de restriction de l'enzyme *HhaI* et sont donc plus récentes. Ces résultats nous permettent donc de penser que les populations américaines ont une origine africaine.

Ces premières conclusions semblent pouvoir être affinées avec les résultats moins probables avec l'enzyme Taq I. En effet celle-ci révèle deux profils différents dont chacun semble spécifique d'un continent. Seule la population ALM du Sénégal semble « faire le lien » entre les deux continents en possédant les deux profils, deux individus possédant le génotype américain. Mais ces résultats sont encore trop incertains et ne nous permettent pas pour le moment de conclure à un effet fondateur ayant pour origine des individus de la population sénégalaise de la pointe des Almadies.

Le séquençage nous a permis d'obtenir une séquence pour deux individus vivants sur les deux continents. L'analyse de ces séquences révèle une forte homologie (97%) entre les individus des deux continents alors que l'homologie avec *C. gigas* est beaucoup plus faible (56%). Ceci nous laisse penser que la divergence bien que claire d'après les résultats de RFLP ne semble pas ancienne ce que confirme les résultats obtenus lors de l'étude du gène mitochondrial 16S (100% d'homologie). Le logiciel Blast nous confirme que le fragment séquencé est bien une partie de l'ITS2 en corrélant une petite partie de notre séquence à celle de l'ITS2 de *C. gigas*. Enfin l'analyse des sites de restrictions permet d'envisager une poursuite du travail plus rapide avec les enzymes appropriées à la mise en évidence du polymorphisme. Il faudra malgré tout très certainement tester plusieurs enzymes parmi celles retenues car l'étude n'a été réalisée que sur une partie plus restreinte du fragment amplifié par PCR.

Ce travail a donc permis d'apporter des réponses aux questions, restées en suspens, sur l'histoire évolutive de cette espèce et sur les possibilités de flux géniques. Il reste malgré tout à confirmer ces résultats par une étude sur un nombre plus important d'individus et de populations. De plus le séquençage réalisé laisse envisager de bonnes possibilités pour la suite de l'étude, après une mise au point plus fine du protocole, il sera possible de séquencer rapidement tous les individus. Cette nouvelle base de données ainsi obtenue permettra sans doute de retrouver la ou les populations africaines originaires des individus américains et peut être de déterminer les circonstances de la colonisation américaine.

BIBLIOGRAPHIE :

Ajana A.M, 1979. Preliminary investigation into some factors affecting the settlement of the larvae of the mangrove oyster *Crassostrea gigas* (Adanson) in the Lagos lagoon. *Malacologia*, 18(1-2), 271-275.

Allen S.K., Gaffney P.M., 1993. Genetic confirmation of hybridization between *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea rivularis* (Gould). *Aquaculture* 113 : 291- 300.

Avise J.C., Arnold J., Martin Ball R., Bermingham E., Lamb T., Neigel J. E., Reeb C.A., Saunders N.C., 1987. Interspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18 : 489-522.

Banks M.A., McGoldrick D.J., Borgeson W., Hedgecock D., 1994. Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. *Marine Biology* 121(1): 127-135

Boutet I., 1999. Taxonomie et phylogéographie des huîtres creuses dans l'Atlantique sud. Rapport de stage de maîtrise, Université de La Rochelle, effectué au LGP.

Boudry P., Heurtebise S., Collet B., Cornette F., Gérard A., 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 226: 279-291.

- Desmarais E., Vigneron S., Buresi C., Roizes G., 1995. Détection du polymorphisme dans l'ADN : application en biologie et médecine diagnostique, épidémiologique et pronostique. Edition INSERM, Paris.
- Diadhiou H., 1995. Biologie de l'huître de palétuvier *Crassostrea gasar* dans l'estuaire de la casamance (Sénégal) : reproduction, larves et captage du naissain. Thèse, Université de Bretagne Occidentale.
- Gilles S., 1991. Settlement and growth of the West African mangrove oyster, *Crassostrea gasar*, in the Casamance, Senegal. *Revue Hydrobiology Tropical* 24 (3) :197-207.
- Huvet A., Balabaud K., Bierne N., Boudry P., 2001. Microsatellite analysis of 6-hour-old embryos reveals no preferential intra-specific fertilization between cupped oysters *Crassostrea gigas* or *Crassostrea angulata*. *Marine Biotechnology* (in press).
- Huvet A., Lapègue S., Magoulas A., Boudry P., 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetique* 1 : 251-262.
- Klinbunga S., Ampayup P., Tassanakajon A., Jarayabhand P., Yoosukh W., 2001. Genetic diversity and molecular markers of cupped oysters (genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand revealed by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Marine Biotechnology* 3 (2) : 133-144.
- Ladron De Guevara B., Winkler F., Rodriguez-Romero F., Palma-Rojas C., 1996. Comparative karyology of four american oyster species. *The Veliger* 39 (3) : 260- 266.
- Lapègue S., Boutet I., Leitao A, Heutebise S., Garcia P., Thiriot-Quévieux, Boudry P.. The African mangrove oyster, *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757), is present along the Atlantic coast of south America. *Soumis à Biology Bulletin*.
- Leitao A., Boudry P., Labat J.-P., Thiriot-Quévieux C., 1999. Comparative karyological study of cupped oyster species. *Malacologia* 41 (1) : 175-186.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F. et al, 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 : 1350-1354.
- Seutin G., Brawn J., Ricklefs R.E., Bermingham E., 1993. Genetic divergence among populations of a tropical passerine, the streaked saltator (*Saltator albicollis*). *Auk*. 110 : 117-116.
- Verdon B., 2000. Phylogéographie des huîtres creuses des mangroves de l'Atlantique sud par l'apport des marqueurs moléculaire. Rapport de stage de maîtrise , Université de La Rochelle, effectué au LGP.
- Xu Z., Guo X., Gaffney P. M., Pierce J. C., 2001. Chromosomal location of the major ribosomal RNA genes in *C. virginica* and *C. gigas*. *The Veliger* 44 (1) : 79-83.