

Cette communication ne peut être citée qu'avec l'autorisation de l'auteur

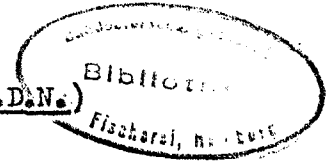
Conseil International pour

C.M. 1975 / K : 32

L'Exploration de la mer

Comité des Crustacés, Coquillages et Benthos

Etude préliminaire de l'acide désoxyribonucléique (A.D.N.)
d'huîtres du littoral atlantique français



par

M-P. GRAS

Institut des Pêches Maritimes
Laboratoire de Biologie
17390 -LA TREMBLAIE
FRANCE

BUT DE L'ETUDE

La mortalité qui décima les huîtres portugaises C. angulata, en 1970-1971, à plus de 80% dans la plupart des secteurs, nécessita l'implantation d'huîtres C. gigas résistantes à la maladie et dont la reproduction s'est avérée excellente (GRAS et coll. 1971). Des gisements artificiels d'huîtres du Pacifique furent créés.

Toutefois, dans certaines zones subsistaient de petites populations de C. angulata qui, mêlées aux apports d'huîtres C. gigas, participaient à la reproduction. Des problèmes de génétique se posèrent alors, parmi lesquels la sélection des spécimens et l'hybridation étaient à considérer plus particulièrement. Il existe en effet deux cas d'hybridation :

-L'hybridation interspécifique où la règle générale est que le croisement entre les deux espèces est stérile ou tout au plus donne des hybrides stériles. Si le repeuplement est effectué avec de tels hybrides ou en mélangeant sur le terrain deux espèces différentes de parents, un remplacement périodique de géniteurs doit être effectué.

-L'hybridation intraspécifique où les hybrides sont fertiles. Dans ce cas, les zones où les huîtres sont cultivées en vue de leur commercialisation doivent être bien délimitées afin d'éviter l'hybridation avec d'autres populations. Le repeuplement est réalisé à partir de stocks (les gisements) sélectionnés en contrôlant la taille des populations, la ponte, la taille et le nombre de larves etc

Il faut noter en outre la difficulté de délimiter les hybrides interspécifiques, en raison de l'imprécision relative de la notion d'espèce. C. gigas et C. angulata sont-elles une même espèce ou deux espèces différentes? Plusieurs auteurs se sont efforcés d'apporter une réponse à cette question :

- RANSON (1967) étudia les prodissoconques
- MORE et coll. (1972) analysa l'arginine kinase du muscle adducteur
- LONGWELL et STILES (1973) considérèrent le point vue cytogénétique
- MENZEL (1974) croisa C. gigas et C. angulata

Mais, même dans les cas de morphologie identique et d'études montrant un même nombre de chromosomes dans les espèces considérées, la génétique biochimique peut apporter des informations importantes en systématique. Chez les micro-organismes, JOHNSON (1973), STALEY et COLWELL (1973) notamment ont montré que les études de l'acide désoxyribonucléique peuvent servir de base en taxonomie. En effet, l'A.D.N., localisé aux chromosomes joue un rôle prépondérant en tant que "vecteur de l'information génétique". C'est la base chimique de tous les êtres vivants. On peut interpréter des différences géniques comme des différences chimiques dans la structure de l'A.D.N. C'est sur ce matériau que s'est effectuée notre étude.

MATERIEL ET METHODES

- Spécimens étudiés :

Crassostrea angulata nées en 1968 dans le bassin de Marennes (Ile d'Oléron)

Crassostrea gigas originaires du Canada (Colombie britannique) importées en 1973 et ensemencées sur le gisement de Mouillelande, en rivièrre Soudre.

Ostrea edulis provenant de Bretagne

- Méthode d'extraction

L'A.D.N. est un polymère de poids moléculaire élevé. Les molécules très longues sont fragiles. Le problème qui se pose lors de son extraction est de conserver l'intégrité de l'acide nucléique et de l'obtenir aussi natif que possible, pour cela, certaines précautions doivent être observées :

- . Eviter un broyage trop intense des cellules qui scinderait les fibres.
- . Maintenir tout au long des opérations une basse température
- . Conserver pH et force ionique constants.

Les huîtres sont homogénéisées dans un tampon citrate de sodium + NaCl à pH 7,4 et centrifugées afin d'éliminer dans le surnageant l'acide ribonucléique. La lyse des cellules est obtenue par action du dodécyl sulfato de Na, au bain-marie à 56°C. Le perchlorate de sodium fait précipiter les protéines. Mettant à profit leur hétéropolarité, après dénaturation par le chloroforme, elles se condensent lors de la centrifugation en une phase qui peut être facilement isolée. La partie supérieure contient l'A.D.N. qui est précipité par l'alcool. Les fibres d'A.D.N. obtenues sont enroulées autour d'une baguette de verre.

Méthodes d'analyse

L'enregistrement de la courbe d'absorption de l'A.D.N. est effectué au spectrophotomètre U.V. (PHILLIPS).

Les électrophorégrammes ont été réalisés sur Cellogel R.S : l'ADN est dissous dans le tampon citrate à pH 7,4. 40 µl d'échantillon sont déposés. Le tampon utilisé lors de l'expérience est composé de :

Tris 0,036 M	}	pH = 7,8
Phosphate de sodium		
E.D.T.A. 0,001 M		

La migration a duré 90 minutes et l'A.D.N. a été identifié par coloration à la pyronine.

RESULTATS ET DISCUSSION

Degré de pureté

Avant d'entreprendre toute étude ultérieure, il est nécessaire de s'assurer que l'A.D.N., bien qu'il apparaisse sous forme de fibres, n'est pas contaminé par d'autres constituants. Son état de pureté peut être connu par analyse spectrale au spectrophotomètre U.V.

Les courbes enregistrées pour les différents échantillons sont identiques et comme le montre la fig. 1, on observe :

- Un seul maximum d'absorption à 260 mµ
- Un minimum vers 230 mµ
- Pas de pic vers 278-280 mµ, zone où les protéines qui auraient pu rester associées à l'A.D.N. au cours des processus d'extraction absorberaient.

Ce spectre obtenu est caractéristique de l'A.D.N. De plus, on peut préciser que cet A.D.N. n'a pas subi de dénaturation car ce phénomène s'accompagne d'un déplacement hyperchrome et de petits changements dans la forme de la courbe.

Electrophorèse

A pH 7,8 l'A.D.N. migre sous forme d'une seule bande.

Les électrophorégrammes obtenus à partir de l'A.D.N. extrait d'Ostrea edulis, Crassostrea angulata et Crassostrea gigas (fig. 2) montrèrent, comme il est attendu, une nette différence entre la première espèce citée et les deux autres. Par contre la distinction entre C. angulata et C. gigas semble plus difficile à réaliser.

L'enregistrement au photomètre permet d'obtenir un profil électrophorétique des bandes (fig. 3) et de les caractériser par leur position. On peut noter une variation de 6 mm entre les distances de migration de l'A.D.N. de C. angulata et de C. gigas.

Contrairement à ce que concluent la plupart des auteurs cités précédemment, qui considèrent C. angulata et C. gigas comme une même espèce, la variation observée conduirait à penser le contraire. Mais celle-ci étant faible, d'autres expériences sur ce même matériau, telles que la détermination des poids moléculaires, la connaissance de la composition et de l'agencement des bases particulièrement significatives pour déterminer les espèces et leurs hybrides, devraient apporter une conclusion plus affirmative.

BIBLIOGRAPHIE

- GRAS, (P) , COMPS (M.) , DAVID (A.) et BARON (G.) , 1971. - Observations préliminaires sur la reproduction des huîtres dans le bassin de Marennes-Oléron en 1971. Bull. Inform. Doc. Inst. Pêches Marit., Science et Pêche n° 207, 16 p.
- JOHNSON (C.B.), 1973.- Use of nucleic acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. Internat. J. syst. Bacteriol. USA, 23 (4) : 309 - 315.
- LONGWELL (A.C.) et STILES (S.S.), 1973.- Oysters genetics and the probable future role of genetics in aquaculture. Malacology review 6 : 151 - 177.
- MENZEL (R.W.), 1974 .- Portuguese and Japanese oysters are the same species. J. Fish Res. Board can. 31 : 453 - 456.
- MORE (P.), MORE (M.T.), MONET (R.) et POISBLEAU (J.), 1972 .- Sur l'arginine kinase des protéines solubles du muscle adducteur de l'huître portugaise (Crassostrea angulata) et de l'huître japonaise (Crassostrea gigas). C.R. Soc. Biol. Fr. 165 n° 9-10 p. 1987 - 1990.
- 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. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 31 (2) : 127 - 199.
- STALEY (T.E.) et COLWELL (R.R.), 1973 .- Deoxyribonucleic acid reassociation among members of genus Vibrio. Internat. J. syst. Bactériol. U.S.A., 23 (4) : 316 - 332.

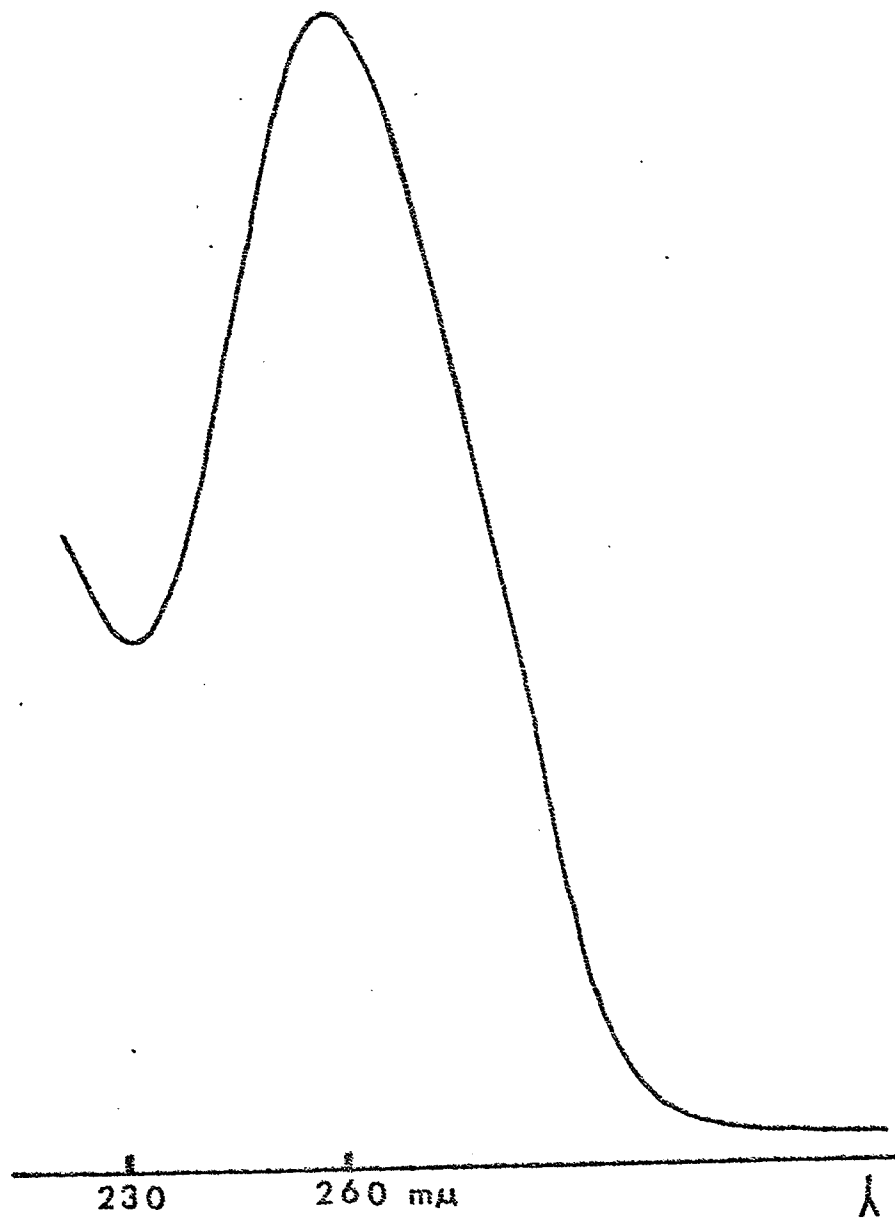
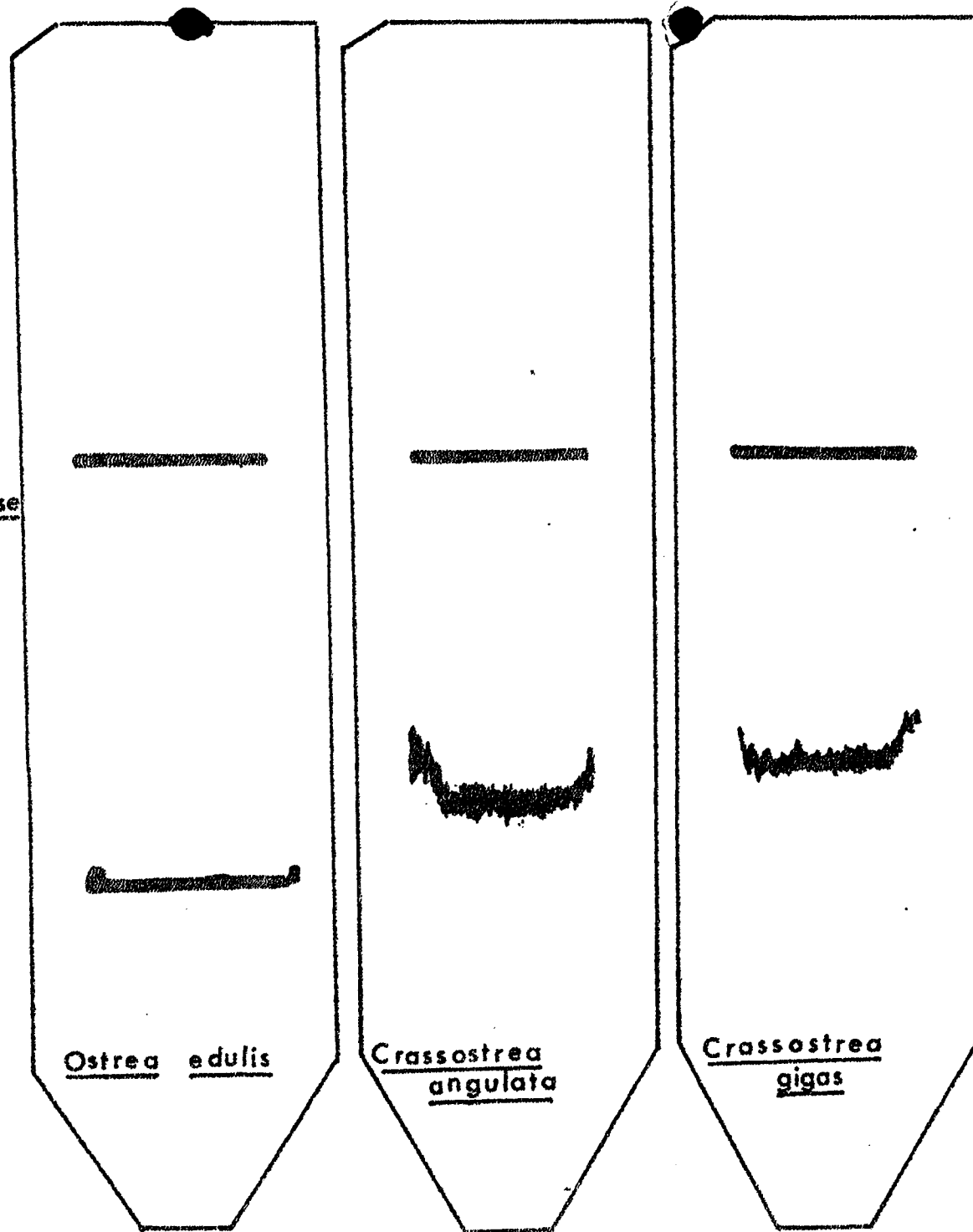


fig.1 - Spectre d'absorption de l'A.D.N.

fig-2 - Migration
de
l'A.D.N par électrophorèse



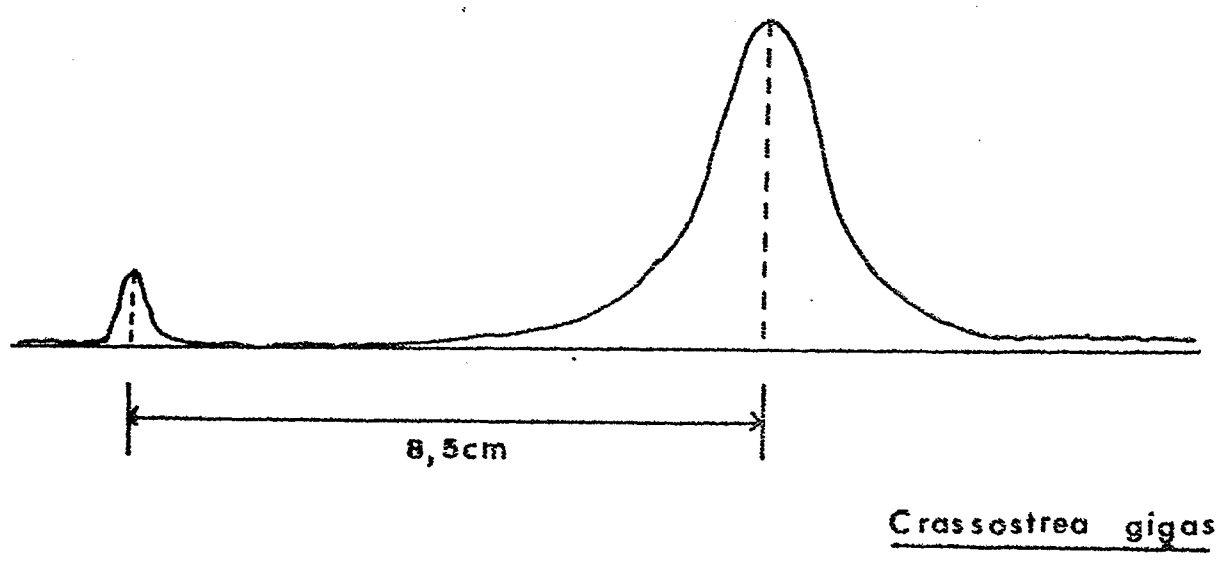
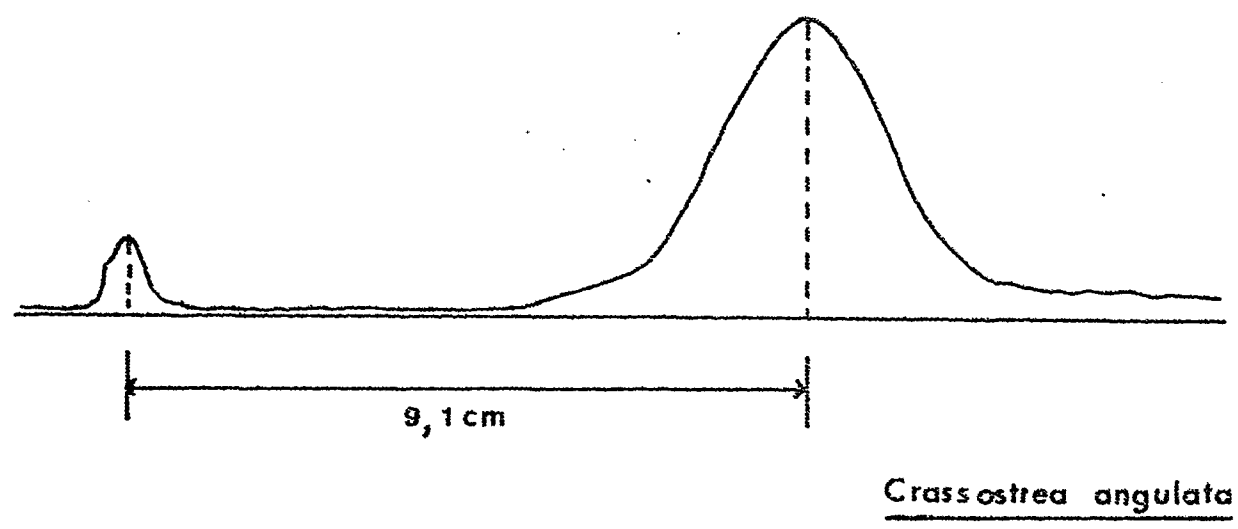


fig.3 — Enregistrements photométriques
des bandes d'A.D.N obtenues par électrophorèse.