

## Fiche Bio 2009-01 : le génotypage comme outil de reconnaissance de souches de crevettes *L. stylirostris*

E. Goyard, S. Baron

Contact : egoyard@ifremer.fr, sbaron@genindexe.com



### 1. Introduction

Dans le cadre de l'opération d'introduction de variabilité génétique au sein du cheptel calédonien de crevette *L. stylirostris*, trois marqueurs génétiques de type « microsattélites » (Garcia et al., 1996 ; Vonau et al., 1999) avaient été utilisés dans le laboratoire de biologie moléculaire d'Ifremer-Tahiti pour l'évaluation de la variabilité génétique du cheptel Calédonien et de 2 souches hawaïennes candidates à l'introduction en Calédonie (Goyard et al., 2003). Il avait été montré que deux de ces trois marqueurs permettaient d'assigner les individus à la population Calédonienne ou à la population Hawaïenne et qu'ils pouvaient donc constituer un outil utile à l'expérimentation et à la gestion ultérieure des deux souches par les professionnels. Une collaboration a été établie à partir de 2004 avec l'entreprise privée GENINDEXE afin que cet outil soit disponible en routine.

Cette fiche bio-technique fait le point sur ce dossier au moment où les professionnels de la filière commencent à faire appel à cet outil pour s'assurer de l'absence de transferts accidentels de gènes hawaïens au sein des populations de géniteurs de souche calédonienne. Le fait d'avoir travaillé avec des échantillons différents et des méthodes différentes dans les deux laboratoires rend en effet nécessaires la comparaison et la compilation des résultats obtenus afin de disposer d'un document de référence pour l'interprétation des résultats.

### 2. Matériel et méthodes

#### Prélèvements de tissus et extraction d'ADN

Les pléiopodes d'au moins 30 individus par population étudiée ont été prélevés puis conservés individuellement dans de l'alcool à 70%.

Dans l'étude Ifremer (Goyard et al., 2003), les animaux calédoniens étaient issus de différentes éclosures et les animaux hawaïens appartenaient aux deux populations disponibles à l'époque (Hawaii-1 et Hawaii-2). L'ADN des animaux échantillonnés a été extrait suivant la méthode phénol chloroforme

Pour le transfert de la technique à Genindexe, les prélèvements ont été faits (i) sur les animaux de la population « Hawaii-1 » qui se sont reproduits après leur introduction en Calédonie en 2005, (ii) sur les géniteurs calédoniens qui se sont reproduits au même moment, (iii) et sur des crevettes introduites à Fidji à partir de Brunei. Après quelques essais, c'est l'extraction de l'ADN au Chelex qui a été retenue chez Genindexe. Ces échantillons initiaux ont ensuite été complétés par les premiers échantillons envoyés par les producteurs à Genindexe.

#### Analyses de biologie moléculaire

L'ADN de ces échantillons a ensuite été amplifié in vitro suivant une technique de PCR (Réaction en Chaîne de Polymérisation) sur les 3 marqueurs génétiques retenus (Styli-19, Vana-1, Vana-2).

Dans l'étude Ifremer, les produits de PCR ont ensuite subi une migration de type électrophorèse sur un gel d'acrylamide avant d'être colorés à l'argent pour permettre la lecture des bandes correspondant à des allèles d'un même locus. Cette technique, beaucoup plus lourde qu'un marquage radioactif ou que l'utilisation d'un séquenceur automatique ou d'un scanner, se justifiait par l'absence d'équipement adéquat à Ifremer-Tahiti. Enfin, la taille approximative des allèles (exprimée en nombre de paires de base de la portion d'ADN répliquée) a été estimée visuellement à l'aide d'un marqueur de taille  $\Phi$ X174 DNA/Hirf I Marker de Promega (Photo 1).

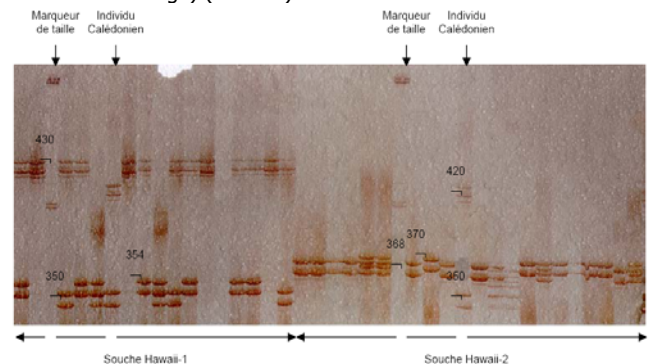


Photo 1 : visualisation des allèles au locus Vana-01 par coloration argentique sur gel d'acrylamide

Chez Genindexe, le multiplexage en PCR des ces 3 marqueurs microsattélites sur le séquenceur ABI 3130 a été mis au point à partir des données de base disponibles (séquences des amorces, température d'annealing, taille des allèles, protocole d'extraction d'ADN - Vonau et al., 1999 ; Bierne et al., 2000). La taille des allèles a été estimée automatiquement par cet appareil avec le logiciel Genemapper (photo 2)

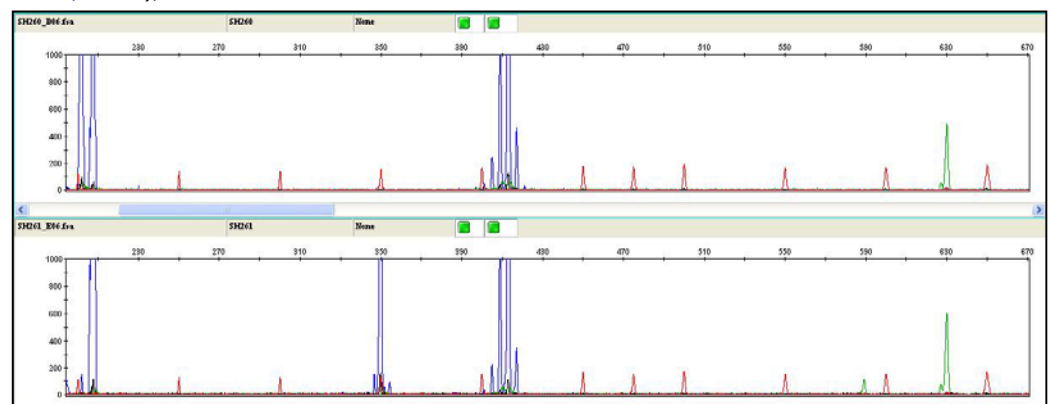


Photo 2 : électrophorégrammes de deux individus différents

#### Compilation des résultats

Pour chacun des marqueurs, les tailles des allèles observés dans les deux laboratoires et dans chaque population ont été comparés et les correspondances ont été recherchées en tenant compte des tailles relatives de ces allèles.

Fig 1 : allèles observés au locus **STYLI-19** sur les 3 populations étudiées par Ifremer et Genindexe

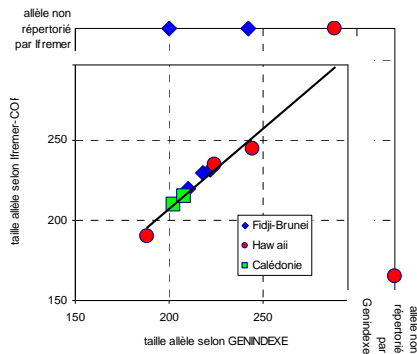


Fig 2 : allèles observés au locus **VANA-1** sur les 3 populations étudiées par Ifremer et Genindexe

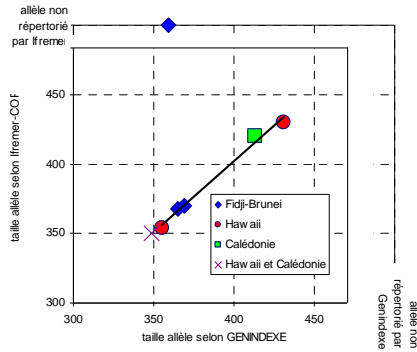


Fig 3 : allèles observés au locus **VANA-2** sur les 3 populations étudiées par Ifremer et Genindexe

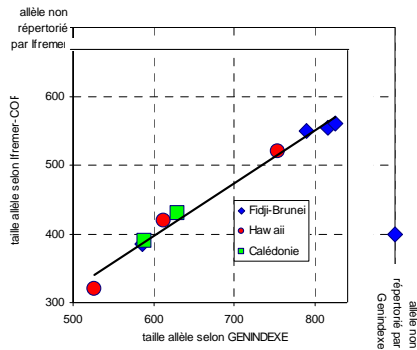


Tableau 1 : Allèles observés sur les différentes populations étudiées aux 3 locus styli-19, vana-01 et vana-02 et répertoriés en fonction de leurs tailles estimées par Ifremer et par Genindexe.

	Allèle répertorié par Ifremer (2002)	Allèle répertorié par Genindexe (2005)	Ecart de taille entre laboratoires	Calédonie	Hawaii-1 (introduite)	Brunei-Fidji (Hawaii-2) (non introduite)
<b>Styli-19</b>	165	-			X	
	190	188	2		X	
	-	200				X
	210	202	8	X		
	215	208	7	X		
	220	210	10			X
	230	218	12			X
	232	222	10			X
	235	224	11		X	
	-	242				X
245	244	1		X		
-	288			X		
<b>Vana-01</b>	350	349	1	X	X	
354	355	-1		X		
-	359					X
368	365	3			X	
370	369	1			X	
420	413	7	X			
430	431	-1		X		
<b>Vana-02</b>	320	526	-206		X	
385	586	-201				X
390	589	-199	X			
400	-					X
420	612	-192		X		
430	630	-200	X			
520	754	-234				X
550	790	-240		X		
555	816	-261		X		
560	826	-266		X		

### 3. Résultats commentés

#### Correspondances entre laboratoires et écarts de taille

Les écarts de taille estimée entre les deux laboratoires sont faibles sur les marqueurs styli-19 et vana-01, mais très élevés sur vana-2 (tableau 1 et fig. 1, 2 et 3). La méthode d'analyse utilisée par Genindexe étant très fiable, une erreur d'estimation des tailles a été très probablement commise par Ifremer. Mais cela ne change pas fondamentalement les résultats puisque c'est la taille relative des différents allèles observés d'un individu à l'autre qui compte dans l'interprétation finale.

On conviendra d'utiliser la nomenclature de Genindexe à partir de maintenant (tableau 1).

Sur les 29 allèles observés au total, 2 n'ont été observés que par l'Ifremer et 4 que par Genindexe. Sur les 18 allèles observés sur les populations « Calédonie » et « Hawaii-1 », 1 n'a été observé que par l'Ifremer et 1 autre que par Genindexe

L'allèle de taille 349 estimée par Genindexe sur le locus Vana-1 est le seul qui soit observé à la fois dans la population « Calédonie » et « Hawaii-1 ». Lorsqu'il est observé, il ne permet donc que d'affirmer que l'individu prélevé n'appartient pas à la population « Brunei-Fidji »

#### Origine commune de « Hawaii-2 » et « Brunei-Fidji »

La correspondance des allèles observés par Ifremer sur la population « Brunei-Fidji » et la population « Hawaii-2 » (qui n'a pas été introduite en Calédonie) permettent de penser qu'elles sont issues de la même population domestiquée ou que l'une est issue de l'autre.

### 4. Conclusions et perspectives

Malgré la confirmation d'un allèle commun aux populations « Calédonie » et « Hawaii-1 », l'outil génotypage transféré à Genindexe permet d'assigner les individus purs ou hybrides de première génération à leur population. Il représente donc un outil efficace pour la gestion des populations parentales dans un schéma d'amélioration génétique par croisement tel que celui qui est envisageable compte tenu de l'effet de vigueur Hybride observé dans les tests de performances menés depuis par Ifremer (Goyard et al., 2007).

**Bierne, N.,** Beuzart, I., Vonau, V., Bonhomme, F., Bédier, E., AQUACOP, 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 184, 203–219

**Vonau V.,** Ohresser M., Bierne N., Delsert C., Beuzart I., Bedier E., Bonhomme F., 1999. Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Anim. Genet.* 30, 234–235

**Goyard E.,** Arnaud S., Vonau V., Bishoff V., Mouchel O., Pham D., Wyban J., Boudry P., Aquacop, 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New-Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. *Aquat. Living Resour.* 16, 501–508

**Goyard E.,** Goarant C., Ansquer D., Broutou F., Brun P., de Decker S., Dufour R., Galinié C., Mailliez J-R., Peignon J-M., Pham D., Vourey E., Harache Y., Patrois J. (2007). Introduction en Nouvelle-Calédonie de la souche de crevette *Litopenaeus stylirostris* domestiquée à Hawaii : Bilan de l'opération après deux années de testage de performances des crevettes de types génétiques « Calédoniennes », « Hawaïennes » et « Hybrides ». Ifremer/DAC/RST 2007-01, 48 pp.

**Garcia D.K.,** Dhar A., Alcarvar-Warren A.A., 1996. Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals presence of two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5, 1–83.