

40504



ECOLE
NATIONALE
VÉTÉRINAIRE
TOULOUSE

6608-2003-161

ANNEE 2003 THESE : 2003 - TOU 3 - 4161

SPÉCIATION DES REQUINS : APPROCHES MOLÉCULAIRES ET APPLICATION À LA TRAÇABILITÉ DU COMMERCE DES AILERONS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Charles, Grégoire, Bénédicte CARAGUEL
Né, le 4 juin 1979 à TARBES (Hautes-Pyrénées)

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Jean-Luc GUERIN
Mme Christelle CAMUS-BOUCLAINVILLE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

SPECIATION DES REQUINS: APPROCHES
MOLECULAIRES ET APPLICATION A LA
TRACABILITE DU COMMERCE DES AILERONS

6608-2003-161



sommaire

Introduction	5
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. Etude du marché international des ailerons de requin	8
I.1. Présentation de l'aileron en tant que produit	8
I.1.a. L'aileron commercialisé.....	8
I.1.b. Historique de la consommation d'ailerons dans la cuisine chinoise.....	9
I.1.c. Les propriétés médicinales du requin.....	11
I.1.d. Les propriétés toxiques des ailerons	11
I.2. Le traitement des ailerons et leur commerce	13
I.2.a. Le traitement	13
I.2.b. Description générale du marché des ailerons de requins	17
I.3. L'exploitation des requins.....	21
I.3.a. Les différents secteurs de pêches	21
I.3.b. Etat des captures mondiales	22
I.3.c. Etats et évaluation des stocks.....	23
II. Importance écologique des requins et programmes de protection.....	24
II.1. Rôle écologique des requins et impacts de la surpêche.....	24
II.2. Prise de conscience de la communauté internationale.....	25
II.3. Problématique.....	26
II.1.a. Position du problème	26
II.1.b. Notion d'espèce	27
III. Choix des techniques et des marqueurs moléculaires de détermination du polytypisme génétique.....	27
III.1. Les marqueurs biochimiques : exploration du polytypisme protéique	28
III.2. Les marqueurs génomiques: étude du polytypisme à l'échelle des nucléotides .	30
III.2.a. Etape préliminaire : la réaction de PCR	31
III.2.b. La technique du RFLP.....	32
III.2.c. La technique RAPD.....	34
III.2.d. L'utilisation des microsatellites	35
III.3. Le séquençage direct	36
III.3.a. Les marqueurs nucléaires	37
III.3.b. Les marqueurs mitochondriaux.....	39

ETUDE EXPERIMENTALE.....	45
I. Matériel et Méthodes.....	47
1. Constitution de la banque de tissus	47
2. Techniques de prélèvement.....	49
3. Extraction de l'ADN génomique par la méthode CTAB	50
I.3.a. Principe	50
I.3.b. Mode opératoire.....	51
I.3.c. Vérification de la pureté de l'ADN et calcul de la quantité d'ADN.....	52
4. Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction).....	53
I.4.a. Principe	53
I.4.b. Mode opératoire.....	53
I.4.c. Amorces utilisées	54
5. Migration sur gel : électrophorèse.....	55
I.5.a. Principe	55
I.5.b. Mode opératoire.....	55
6. Extraction de l'ADN du gel d'électrophorèse (Kit QIAquick).....	57
I.6.a. Principe	57
I.6.b. Mode opératoire.....	57
7. Le séquençage	58
I.7.a. Principe	58
I.7.b. Mode opératoire.....	58
I.7.c. Précipitation	60
I.7.d. Electrophorèse et lecture.....	60
8. Correction des chromatogrammes.....	61
9. Analyses de séquences	61
II. Résultats.....	62
1. Vérification de la conservation de la molécule d'ADN suite au traitement.....	62
2. Conception de la banque de référence.....	63
3. Analyse de la variabilité inter-spécifique.....	65
4. Analyse de la variabilité intra-spécifique : comparaison de 2 marqueurs.....	70
5. Identification de la séquence d'un aileron inconnu.....	71
6. Cas d'une séquence inconnue en banque	73
7. Validation de la méthode : test sur neufs ailerons.....	77

III. Discussion	79
IV. Conclusion-Perspectives	82
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	Erreur ! Signet non défini.
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	84

Introduction

Les requins n'ont jamais représentés un grand intérêt à la capture à cause de la faible valeur commerciale de leur chair. Néanmoins une partie des requins reste très prisée : les ailerons. Utilisés pour préparer la traditionnelle soupe d'ailerons de requin, les ailerons sont très demandés en Asie du Sud-est. La forte valeur ajoutée des ailerons incite une surexploitation des requins et un effondrement des stocks, phénomène dramatique pour l'équilibre écologique marin. La prise de conscience de la communauté internationale l'a amené depuis l'an dernier à inscrire sur les listes de la CITES deux espèces de requin, le requin baleine et le requin pèlerin. Cependant aucune technique n'est décrite pour contrôler les ailerons déjà transformés. Nous proposons donc de mettre au point un système de spéciation génétique des ailerons. La traçabilité génétique, déjà utilisée pour d'autres produits alimentaires d'origine animale, est une arme très efficace grâce à la qualité et la quantité d'information contenue dans l'ADN. La mise en place de contrôles ponctuels sur les marchés, les aéroports ou chez les grossistes, permettrait alors un suivi qualitatif de ce commerce.

La conception de cette thèse s'articule d'abord sur un travail de recherche bibliographique ; puis sur l'organisation de plusieurs campagnes de terrains qui ont permis de collecter de l'ADN de requin ; enfin sur une étude expérimentale, à la Station de Biologie Marine de Concarneau, où chaque prélèvement a été analysé pour obtenir la séquence nucléotidique finale.

Dans une première partie, nous proposerons une synthèse des données bibliographiques relatives au marché des ailerons : le commerce, l'exploitation des requins et les programmes de protection en place. Nous dresserons le bilan des techniques moléculaires disponibles et nous choisirons un marqueur d'espèce adapté à l'étude.

La deuxième partie sera consacrée à la mise au point de la technique de contrôle avec la conception de la banque de référence et les analyses comparatives de séquences. Enfin, nous simulerons une série de tests en aveugle pour valider la méthode d'analyse.

1^{ère} partie :

**INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE**

Dans cette première partie nous décrirons et nous analyserons le commerce international des ailerons de requin en remontant les filières, des ailerons commercialisés jusqu'aux requins capturés. Nous évoquerons ensuite les causes et les conséquences d'un tel marché puis nous exposerons les mesures et les solutions mises en places dans la lutte contre la surexploitation des requins. Enfin, nous explorerons les différentes voies d'analyses moléculaires disponibles pour choisir la méthode de spéciation la mieux adaptée à notre étude.

I. Etude du marché international des ailerons de requin

I.1. Présentation de l'aileron en tant que produit

I.1.a. L'aileron commercialisé

i. Les gammes dites « classiques »

Les ailerons de requins sont préparés et vendus sous différentes formes qui correspondent finalement aux différentes étapes de préparation du produit fini :

- tout d'abord, l'aileron, juste séché au soleil, recouvert de sa peau encore intacte ;
- ensuite l'aileron dit « semi-préparé », c'est-à-dire un aileron séché auquel on a enlevé la peau mais dont la structure cartilagineuse est encore présente ;
- l'aileron « préparé » est lui composé des deux couches de ceratotriches ;
- on trouve les ailerons préparés congelés
- ou salés ;
- on trouve aussi des « mèches » d'ailerons qui sont en réalité les rayons d'élastoïdine bouillis, séparés puis déshydratés pour être emballés dans un assortiment de plusieurs ailerons.
- Enfin, il est possible d'acheter des conserves de soupe d'ailerons toute faite.

Les ailerons de requin représentent un des produits de pêche le plus cher au monde. La valeur de l'aileron brut varie selon la couleur, la taille, la largeur et le taux en « rayons », mais presque toutes les grandes espèces de requin ont une valeur commerciale. Sur le plan nutritionnel les ailerons sont composés en grande partie de protéines et de matières gélatineuses, on y trouve aussi des lipides et quelques sels minéraux.

ii. Les gammes d'ailerons synthétiques

Les ailerons de synthèses sont habituellement issus d'extraits d'algues marines ou d'une combinaison de produits similaires. On les trouve occasionnellement dans les marchés et sont vendus comme « ailerons végétariens » ou illégalement, comme de vrais ailerons de requins. Ces ailerons n'intéressent pas directement notre étude.

I.1.b. Historique de la consommation d'ailerons dans la cuisine chinoise

Historiquement la consommation de requins et d'ailerons de requins a une connotation mystérieuse. Bien que ne remontant pas directement à l'origine de la Chine, le requin a vraiment une longue et vénérable histoire en tant qu'aliment et dans une moindre mesure, en tant que médicament.

Selon Rose (1996), la première référence écrite relative à la consommation de requin date de la dynastie SONG. En 1141, un empereur SONG, en visite officielle chez des dignitaires dans le sud du pays, fut invité à manger de la peau de requin comme partie intégrante d'un plat élaboré. Cependant, c'est réellement pendant la dynastie MING (1368-1644) que le requin est devenu un met incontournable des banquets officiels. Le requin était alors servi aux personnalités rendant visite au gouvernement impérial à Beijing. Plus tard l'ironie du sort a voulu que des hauts dignitaires en mission au nom de l'empereur MING dans le sud-Est de la Chine se soient retrouvés sans rien à manger dans une région inhospitalière. Ils ont alors cuisiné et mangé des ailerons de requins abandonnés après découpe, telles des ordures, par les autochtones.

Pendant la dynastie QING (1644-1911), les ailerons ont été intégrés aux repas officiels. Aussi bien les ailerons que la peau de requin étaient alors servis à l'empereur. Les chinois, moulés dans une logique hiérarchique, ont classé les ailerons de requins en deuxième position parmi les huit trésors de la mer. Au fur et à mesure, l'aileron de requin est devenu une tradition culinaire dans tout le palais impérial et dans une moindre mesure dans la haute société chinoise. Avec la fin de la dynastie QING, les festins Manchu-Han n'ont pas été longtemps tolérés par les autorités, mais les ailerons de requins sont restés des mets appréciés. Appelés « ailerons de requin TAN », en référence à une famille influente réputée pour ses fines connaissances en cuisine chinoise, ce plat devint le met le plus consommé de la Nouvelle République. Depuis cette période, les ailerons de requins ont aussi tenus un rang élevé dans la cuisine Cantonaise et Hong-Konguaise.

Puis, Hong Kong est devenue la capitale reconnue de la cuisine à base d'ailerons de requin avec le plus grand nombre de recettes dans le monde. Les ailerons de requin ne sont devenus populaires en Chine qu'après la deuxième guerre mondiale. Au début des années 70, la soupe d'ailerons de requin était accessible à tous pour 0.50 \$ HK le bol. Le marché et les stocks ont explosés et l'aileron de requin mélangé à du riz est devenu un plat très commun. Dans les années 80 et 90, de plus en plus de restaurants huppés ont servi de l'aileron de requin et des restaurants spécialisés ont émergé. La soupe d'aileron de requin est alors devenu un met cher et consommé pour des occasions exceptionnelles : accueil d'un hôte de marque, repas d'affaire... L'aileron de requin s'est largement répandu dans la société taiwanaise, forte de son économie. A eux deux, Taiwan et Hong Kong représentent le tiers de la consommation mondiale d'aileron de requin. La majorité des ailerons sont transformés à Hong Kong puis sont exportés à Taiwan et en Chine qui va rapidement devenir le principal consommateur grâce à son ouverture économique vers le reste du monde. Les ailerons sont aussi largement consommés dans le Sud-est Asiatique et au Japon. Les marchés américain et européen, bien qu'en nette régression depuis peu, tenaient une place dans le commerce international avec paraît-il des apparitions sporadiques d'ailerons de requin dans la cuisine française.

La complexité de la tradition culinaire chinoise impose, lorsque l'on déguste une soupe d'ailerons de requin, d'obéir à trois grands principes : on ne doit pas y ajouter de vinaigre, ni d'alcool et la dégustation de la soupe doit être suivie de jeune pousses de soja.

I.1.c. Les propriétés médicinales du requin

Les premières références de l'utilisation du requin dans la médecine datent de la dynastie TANG (618-907) où la peau et la bile étaient utilisées dans des préparations thérapeutiques. Ben Cao Gan Mu (*Compendium of Materia Medica*, 1590) indique aussi l'utilisation de viande pour l'alimentation générale et de la peau pour soigner les intoxications alimentaires lors de consommations de poissons. Les bienfaits de la consommation de requin sont applicables à beaucoup de domaines : ralentissement du vieillissement, entretien des intestins, renforcement des articulations et une augmentation de l'appétit. A Hong Kong, les gens restent persuadés que les ailerons contribuent à la lutte contre le diabète. Contrairement aux idées reçues, le requin ne posséderait pas de vertus aphrodisiaques. En outre, les ailerons ne contiennent pas de « mauvais » cholestérol mais, malheureusement, les autres ingrédients de la soupe en sont très chargés. Cependant, des recherches récentes ont montré la présence de métaux lourds en quantité toxique dans les ailerons.

I.1.d. Les propriétés toxiques des ailerons

Dans plusieurs études américaines, il a été retrouvé des taux élevés de mercure dans les ailerons de requin qui, deviendraient alors dangereux pour la santé du consommateur. Présidé par Steven Galster, la Wild Aid Asia a mené deux séries de tests de toxicité, aléatoires, sur des ailerons vendus à Bangkok. Ils ont révélé que 70% des ailerons étaient contaminés par du mercure, un métal lourd toxique fréquemment retrouvé dans les eaux usées non traitées. Mais aussi que pour les tests positifs, certains contenaient jusqu'à 42 fois la dose de mercure acceptable pour la consommation humaine. Cette forte concentration s'explique par la place du requin comme prédateur majeur en fin de chaîne alimentaire. En effet, les petits poissons se nourrissent de plancton ou d'invertébrés dans les eaux côtières fortement polluées, eux même mangés par des carnivores plus grands qui seront mangés à leur tour par d'autres prédateurs et ainsi de suite jusqu'au rang final des requins. A chaque rang de cette pyramide, les matériaux toxiques se concentrent de manière croissante dans les organismes jusqu'à atteindre des niveaux maximum chez les super prédateurs que sont les requins. Cet argument de « requins plus dangereux morts que vivants » a souvent été utilisé par les défenseurs des requins pour persuader les consommateurs asiatiques. Malheureusement, ce problème de santé publique n'a que peu affecté la motivation des amateurs de soupe qui dépensent encore des fortunes pour savourer ce met.

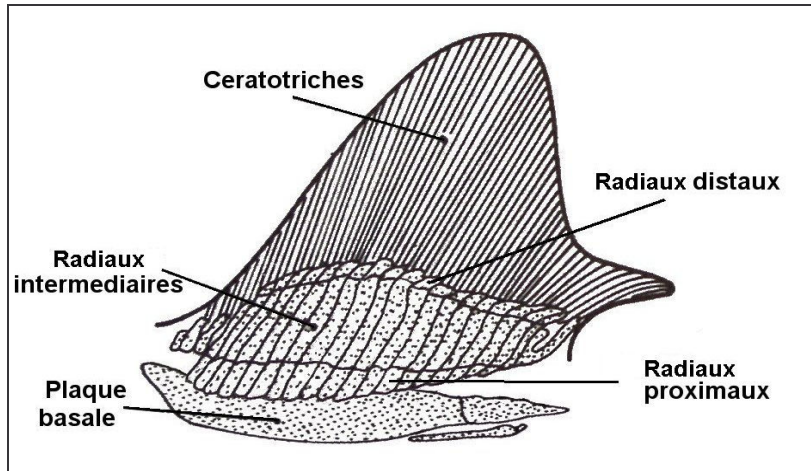


Figure 1. Coupe longitudinale de la nageoire dorsale (Vannini, 1982).

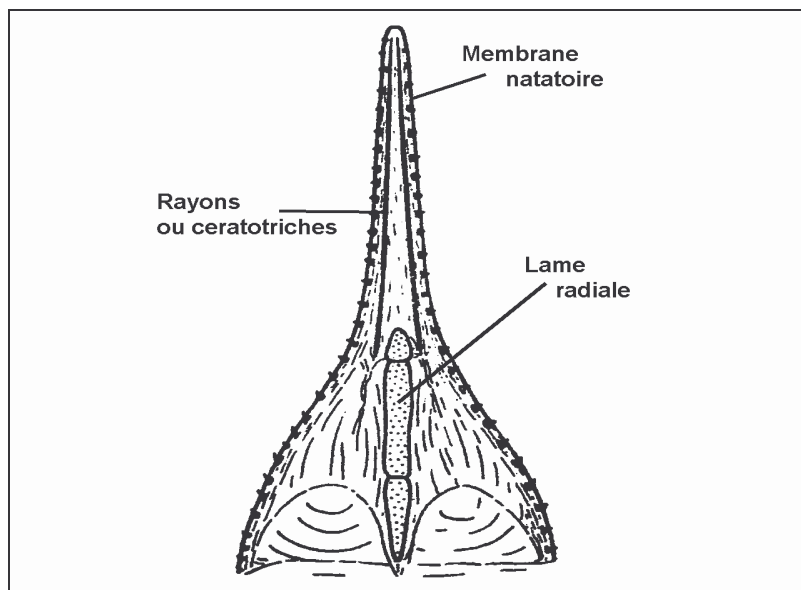


Figure 2. Coupe transversale de la nageoire dorsale (Grassé, 1958).

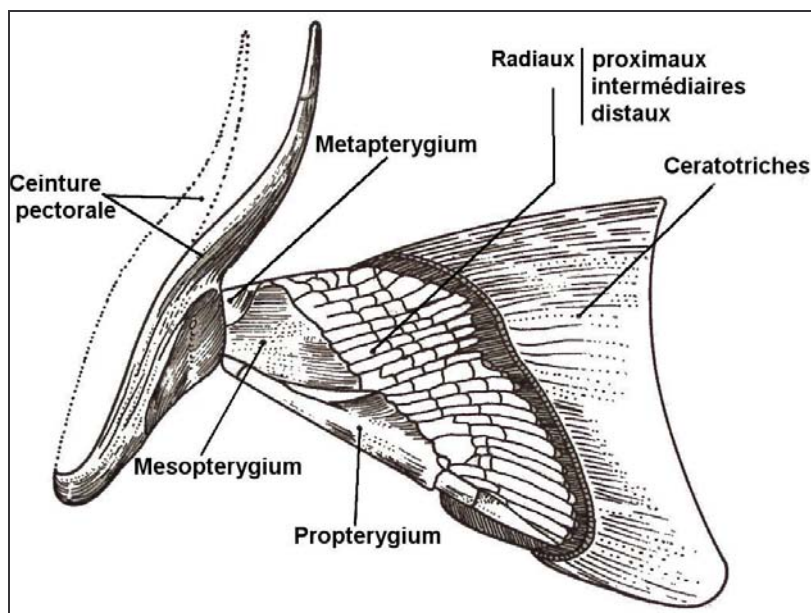


Figure 3. Structure squelettique de la nageoire pectorale (Vannini, 1982).

I.2. Le traitement des ailerons et leur commerce

I.1. Le traitement

i. Anatomie de l'aileron

Les appendices locomoteurs des poissons consistent en nageoires ou *ptérigies*, dont les unes sont paires et les autres impaires. Les premières correspondent aux membres des Tétrapodes, tandis que les secondes, situées sur la ligne médiane du corps, n'ont au contraire que de lointains rapports avec les replis natatoires qui existent chez les batraciens et certains Reptiles aquatiques. Les nageoires paires sont les pectorales et les pelviennes. Les nageoires impaires sont la dorsale, l'anale et la caudale. Toutes les nageoires ont une double armature endosquelettique et exosquelettique. A l'endosquelette, ou squelette proprement dit, appartiennent les pièces cartilagineuses ou osseuses qui supportent les rayons. A l'exosquelette, appartiennent les rayons eux-mêmes qui supportent la membrane natatoire.

Concernant les nageoires impaires (Figure 1), la dorsale et l'anale sont soutenues par des éléments métamérisés appelés les radiaux. Les radiaux sont au départ des extensions cartilagineuses des vertèbres (endosquelette). Ils finissent, au cours du développement, par se dissocier de la colonne vertébrale et fusionner à leur base pour former la plaque basale. Les segments proximaux, intermédiaires et distaux y sont insérés comme les dents d'un peigne. La plaque basale de la dorsale est dite neurale et celle de l'anale est dite hémale. Les radiaux qui soutiennent la nageoire caudale sont davantage unis aux vertèbres et n'ont pas fusionné ; ils portent le nom d'épuraux. Les rayons qui composent l'exosquelette sont d'origine dermique et tendent la membrane natatoire comme des vergues. Chez les Chondrichthyens, ces rayons sont appelés ceratotriches. Ce sont des baguettes frêles, fusiformes, flexibles, translucides. La matière qui les constitue est une scléroprotéine fibreuse dénommée élastoïdine. Elle diffère de l'élastine car elle résiste à la digestion de la trypsine et ne donne pas de gélatine par coction comme le collagène. Originaires de l'épiderme, les ceratotriches terminent leur formation dans le derme en recouvrant, sur les deux faces de la nageoire, la lame radiale (Figure 2).

Les nageoires paires des requins (Figure 3), qui s'articulent sur les ceintures scapulaire et pelvienne, suivent le modèle des ichthyoptérigies. De structure relativement complexe, les pectorales sont définies comme des palettes natatoires mobiles ayant à leur base trois pièces cartilagineuses que l'on appelle selon leur position : propterigium, mesopterigium et

metapterigium. Chacune de ces pièces est articulée à la ceinture scapulaire et supporte sur son bord distal un nombre variable de radiaux. La lame radiale est, comme pour les nageoires impaires, recouverte d'un double feuillet de rayons ou ceratotriches. Les pelviennes suivent la même organisation, sauf qu'elles ne sont pas tribasales mais bibasales car le mesopterygium est supprimé. S'articulant autour de la ceinture pelvienne, ces nageoires sont aussi constituées de radiaux et de rayons qui occupent une place et un rôle identique (Grassé, 1958).

Même si ce sont les organes de la locomotion et de l'orientation, les nageoires ou ailerons occupent proportionnellement une place minimale sur le corps d'un requin. Kreuzer et Ahmed (1978) rapportent dans une étude que le poids des ailerons frais représente 5% du poids total de l'animal, avec une distribution de 1,5 à 11,2% selon les espèces. Suite à cette étude, le taux de 5%, par rapport au poids carcasse, a été retenu comme moyenne aux Etats-Unis dans le cadre du plan de gestion des requins. Anderson et Ahmed (1993) ont ensuite légèrement baissé cette estimation à 4,5% pour des ailerons frais et à 1,44% pour des ailerons secs. Les différences observées s'expliquent par les différentes méthodes de découpe et de préparation des ailerons. A ces faibles pourcentages, il faut en plus ajouter le fait que tout l'aileron n'est pas consommé et que seuls les rayons sont utilisés en soupe. Une étude de Nair et Madhavan (1974) rapporte que le pourcentage d'aiguilles dans un aileron de type « blanc » par rapport au poids total frais est de 3 à 5%, et de 2 à 3% pour les ailerons de type « noirs ». Rapportés au poids sec les taux sont respectivement de 12 à 25% et de 4 à 15%. Sachant que les ailerons ne représentent déjà que 5% en moyenne du poids total de la carcasse, on constate donc que la proportion réellement exploitée du requin pour les soupes oscille entre 0,075 à 0,25%. Cela revient à dire que pour produire 1 Kg de rayons, il faut capturer entre 400 et 1350 Kg de requins.

ii. Les espèces cibles

Un des premiers critères d'importance pour choisir les ailerons est leur taille, ce qui est en relation directe avec le taux de rayons contenu dans l'aileron. Il paraît alors logique que les requins de grande taille soient la cible préférée de ce commerce. Les grandes espèces sont regroupées parmi deux des dix ordres que comptent les requins : les Lamniformes et Carcharhiniformes. On les retrouve dans plusieurs écosystèmes marins et à différentes latitudes. Ils sont généralement côtiers, semi pélagiques ou pélagiques et sont répartis de la ceinture circumtropicale à des latitudes tempérées. Plusieurs entretiens avec des négociants d'ailerons à Hong Kong (Rose, 1996) ont révélé que les espèces les plus commercialisées sont

les requins marteaux (du genre *Sphyrna*), le requin tigre (*Galeocerdo cuvier*), le requin océanique (*Carcharhinus longimanus*), le requin soyeux (*Carcharhinus falciformis*), le requin bordé (*Carcharhinus limbatus*) et le requin bleu (*Prionace glauca*). Ceci s'explique par le fait que ces espèces sont des requins à large distribution ou à grands effectifs. Leur capture est le résultat d'un effort de pêche dans plusieurs océans. Même si les ailerons de requin bleu ne sont pas de haute qualité du fait de leur faible taux de rayons, les négociants estiment qu'ils comptabilisent au total 50 à 70% des transactions à Hong-Kong. Les ailerons des requins renards (genre *Alopias*), requin nourrice (*Nebrius ferrugineus*), requin léopard (*Stegostoma fasciatum*), ainsi que les raies qui n'ont qu'une faible valeur commerciale, et ne sont donc que peu recherchés. D'après les marchés de Hong-Kong, la gamme de prix pour le kilo d'aileron sec varie entre 40 euros à 564 euros pour les espèces les plus appréciées, un prix au kilo de 846 euros a même été évoqué pour un aileron rare.

iii. La transformation

Les ailerons des requins de grandes tailles sont vendus par lots qui se composent pour chacun de la première dorsale, des pectorales et du lobe inférieur de la caudale. Ces ailerons ayant déjà une forte valeur ajoutée, les acheteurs offrent un meilleur prix pour un lot de quatre ailerons originaires du même requin que pour un mélange assorti. Le lobe inférieur de la caudale est l'aileron qui a la plus forte valeur en rapport avec son taux élevé de rayons d'élastoïdine; chez certaines espèces cette partie représente pour plus de la moitié du poids sec total du lot. La seconde dorsale, la paire de pelviennes et l'anale ne sont vendus que secondairement sous forme de filet ou de mélange après transformation. Ces ailerons n'ayant qu'une faible valeur, ils ne sont récupérés que sur les grands spécimens ou sur les espèces où leur taille est importante comme chez le requin citron (*Negaprion acutidens*).

Les ailerons sont séparés le plus vite possible de la carcasse. On les découpe à la base, aux ras des ceratotriches. Ensuite on procède à la découpe dite « en demi-lune » (half-moon cut) pour minimiser la partie charnue présente à la base de l'aileron. Elle supprime les insertions musculaires, responsables de la motricité de l'aileron, pour limiter la putréfaction de l'aileron au moment du séchage. Cette découpe demande de l'expérience et du savoir faire car une coupe trop juste laisserait des résidus de muscles, affectant ainsi l'odeur et la couleur de l'aileron pour obtenir au final un produit de qualité et de valeur inférieure. En outre, l'ablation de cette partie charnue joue aussi un rôle important dans le poids total de l'aileron. Composée essentiellement de muscle, la base de l'aileron est plus lourde que le reste de l'aileron ce qui

influe directement sur le prix de celui-ci. La finesse de la découpe consiste donc à enlever suffisamment de chair pour ne pas détériorer les qualités organoleptiques de l'aileton au moment du séchage ; mais pas trop afin de garder un poids intéressant à la vente. Cette coupe est faite sur tous les ailerons sauf le lobe inférieur de la caudale où, pour des raisons anatomiques, la coupe est rectiligne. En effet, il n'y a pas de muscle moteur de ce lobe et les rayons cartilagineux sont directement accessibles. Après la re-découpe, les ailerons sont nettoyés et rincés avant d'être glacés, congelés ou directement séchés.

Le séchage des ailerons peut se faire de différentes manières. Frais, les ailerons sont suspendus à un fil sur le bateau de pêche voir après le débarquement ; où ils sont exposés au soleil sur des tapis, des plateaux, ou des râteliers. Pour éviter qu'ils roussissent ou qu'ils ondulent, les ailerons seront tournés et retournés régulièrement. Dans certains cas, on saupoudre légèrement les ailerons de sel et on en applique sur la coupe avant le séchage. Cette opération permet une meilleure conservation de l'aileton par une augmentation de la pression osmotique et donc un développement microbien moins important. Des séchoirs automatiques sont aussi utilisés, mais les commerçants préfèrent la technique traditionnelle aux ailerons séchés au four. Le séchage implique une réduction du poids de 30 à 50%, mais aussi des moisissures et une perte de volume variable selon les espèces prélevées. Les ailerons, une fois séchés, sont conditionnés dans des cartons, des caisses en bois ou dans des sacs d'emballages. Ils sont ensuite expédiés sur les sites de traitement en général dans les pays du Sud-est asiatique où la main d'œuvre est bon marché.

La transformation des ailerons consiste d'abord à les tremper dans l'eau pour les réhydrater. Les ailerons congelés ou glacés seront placés dans l'eau pendant 8-10 heures et séchés pendant 16-24 heures. Après le trempage initial, les ailerons sont à nouveau trempés dans de l'eau chaude jusqu'à ce que la peau devienne souple. Les ailerons bien ramollis sont ensuite jetés dans de l'eau glacée et la peau et les denticules sont retirés à l'aide d'une brosse métallique ou d'un racloir en fer. Les ailerons sont de nouveau mis dans l'eau et les restes de chair ainsi que la plaque basale en cartilage sont enlevés. Suit encore un rinçage dans l'eau. Puis dans certains cas, les ailerons peuvent être traités avec un agent blanchissant qui retire le sang laissé par la vascularisation de la plaque basale.

A la suite de ce traitement les ailerons sont de nouveau séchés : au soleil ou avec des séchoirs mécaniques, tout en gardant leur forme d'origine. Parfois, certains transformateurs retirent la plaque radiale de cartilage présente entre les deux couches de rayons fibreux avant de les sécher.

Ensuite les ailerons, ou ce qu'il en reste, peuvent être préparés en bouquet de rayons ou en filets en les trempant encore pendant plus de 12 heures dans l'eau puis en les faisant bouillir pendant 10mn afin d'enlever la membrane gélatineuse et d'isoler les rayons. On les jette ensuite dans de l'eau glacée et on les sépare bien de la membrane. Pour faire des bouquets de rayons, il ne reste plus qu'à arranger les rayons en éventail et les faire sécher. En ce qui concerne les filets, on dispose les rayons encore humides en petits paquets de 100 g puis on les fait sécher. Les ailerons préparés peuvent être à chaque étape séchés puis réhydratés à volonté (Rose, 1996).

I.2. Description générale du marché des ailerons de requins

Pour arriver à comprendre un marché, il faut obligatoirement décortiquer celui-ci en analysant la place de chaque intervenant et les relations qui les relient. Démarche qui se justifie d'autant plus dans le cas d'un commerce oriental qui se veut discret et culturellement peu accessible pour des occidentaux. En effet, les données disponibles n'existent qu'en chinois et restent difficiles à traduire. En outre le sujet étant sensible les différents acteurs de la filière ne communiquent que très peu, voire pas du tout sur leur activité. Pour réussir à remonter cette filière, il faut d'abord récupérer les quelques données accessibles et exploitables, informations qui ne sont disponibles qu'à l'échelle d'un pays ou d'un territoire à partir des registres douaniers. Ainsi il est possible de déterminer la place de certain pays dans ce commerce en tant que producteur, négociant, transformateur ou consommateur. Nous analyserons ce marché en ce basant sur le rôle clef de Hong Kong comme plaque tournante dans les relations d'imports-exports qui lient les principaux acteurs du marché.

Tout d'abord intéressons-nous à la production annuelle d'ailerons frais de requin à Hong Kong, c'est-à-dire les ailerons récupérés sur des requins pêchés à Hong Kong. Les données récoltées sont le résultat des pesées effectuées au marché de Hong Kong. Actuellement les débarquements de requins sont anecdotiques et ne sont même plus pesés car représentant moins de 1% de la pêche produite. La proportion des prises, tous élasmobranches confondus, ne représentait que 1% des captures totales en 1981 et 0,3% en 1990. L'estimation de la production d'ailerons frais est basée sur les déclarations faites par les pêcheurs aux agents de l'AFD, sur les 7 plus grands marchés aux poissons de Hong Kong. Seuls les requins de grande valeur et utilisés pour la consommation locale sont enregistrés. Ainsi, les requins débarqués ayant des ailerons trop petits pour être exploités ne sont pas comptés dans les prises. La production est sûrement sous estimée par rapport à la production totale. Néanmoins, on

suppose que la production Hong Kongaise est minime et joue un rôle mineur dans l'économie locale. Ainsi, d'après les données représentées sur le graphique ci-dessous (Figure 4), on remarque que la production locale d'ailerons frais sur les 10 dernières années a stagnée autour de 2 tonnes par an, pour ensuite passer sous la barre de la tonne. Une production très faible comparée au pic de 1968 qui, avec plus de 281 tonnes produites, marquait la pleine activité de la pêche des requins. Il paraît quand même évident que Hong Kong n'a pas le statut de producteur dans ce commerce et que la production locale n'intervient pas dans les échanges extérieurs.

Dans un premier temps nous analyserons les importations d'ailerons à Hong Kong de 1964 à 1995 (Figure 5). La courbe des importations totales d'ailerons montre une augmentation forte et régulière de 2742 tonnes importées en 1980 à 6121 tonnes en 1995, ce qui signe une croissance de 123,2% en 16 ans. Les croissances annuelles les plus importantes à noter sont celles de 1987 et de 1992 avec environ 23% d'ailerons en plus par rapport aux années précédentes. De très faibles baisses ont eu lieu en 1982 et 1983, avec respectivement 0,7% et 7% de marchandise en moins. Néanmoins, une partie de la forte croissance des importations depuis 1987 est imputable aux importations de marchandises venant de Chine qui y ont subi une transformation après y avoir été exporté par Hong Kong. De retour à Hong Kong, ces ailerons faussent les statistiques d'exportation puisqu'ils sont comptés deux fois. Pour réajuster les chiffres, on a tracé la courbe des importations réelles qui est le résultat de la soustraction des ailerons chinois au total des importations. Cette courbe est donc la traduction de toutes les importations d'ailerons produits par des pays autres que la Chine depuis 1987. On observe quand même une croissance régulière avec une augmentation des importations réelles de 61% en 16 ans. Les pics de croissance de 1987 et de 1992 sont encore présents avec des augmentations moyennes de 19%. Au vu de ces chiffres, il est donc clair que la production d'ailerons, en relation avec les importations, a régulièrement augmentée au cours des 16 dernières années. L'augmentation des produits importés depuis 1986, bien que faussée par le rôle de transformateur de la Chine, est sans aucun doute le résultat d'un effort important de production des autres pays.

Enfin, on peut s'intéresser aux statistiques d'exportation de Hong Kong sur la même période (Figure 6). Fidèles à l'évolution des importations, les exportations totales suivent une croissance forte et régulière de 1980, avec 278 tonnes d'ailerons, à 1995 avec 3 642 tonnes. Avec une croissance moyenne annuelle autour de 40%, les années 86, 87, 88 marquent des pics d'exportation. Sur trois ans la quantité d'ailerons exportée a augmenté de 97,7%, ce qui est énorme. Depuis 1980 les chiffres ont été multipliés par 13 et par 6 depuis 1986,

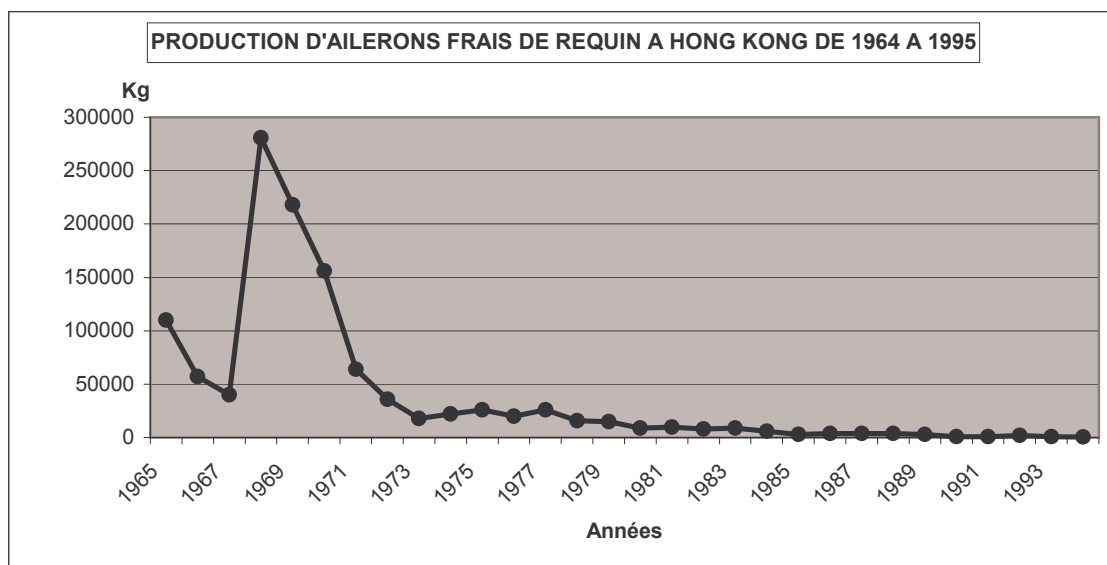


Figure 4. Production d'ailerons frais de requin à Hong Kong (Parry-Jones, 1996b).

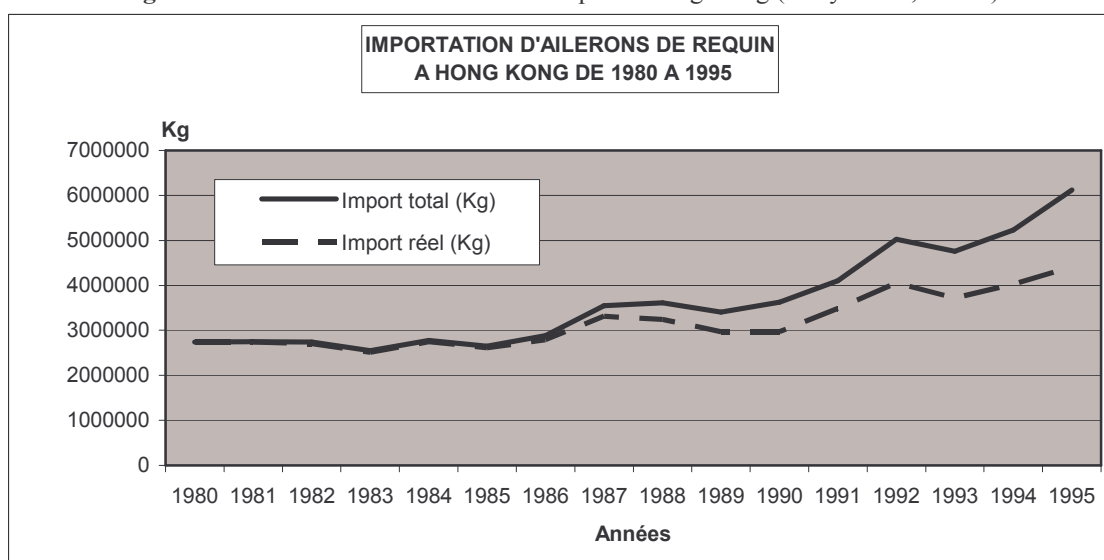


Figure 5. Evolution des importations d'ailerons secs ou salés de requin à Hong Kong (Parry-Jones, 1996b).

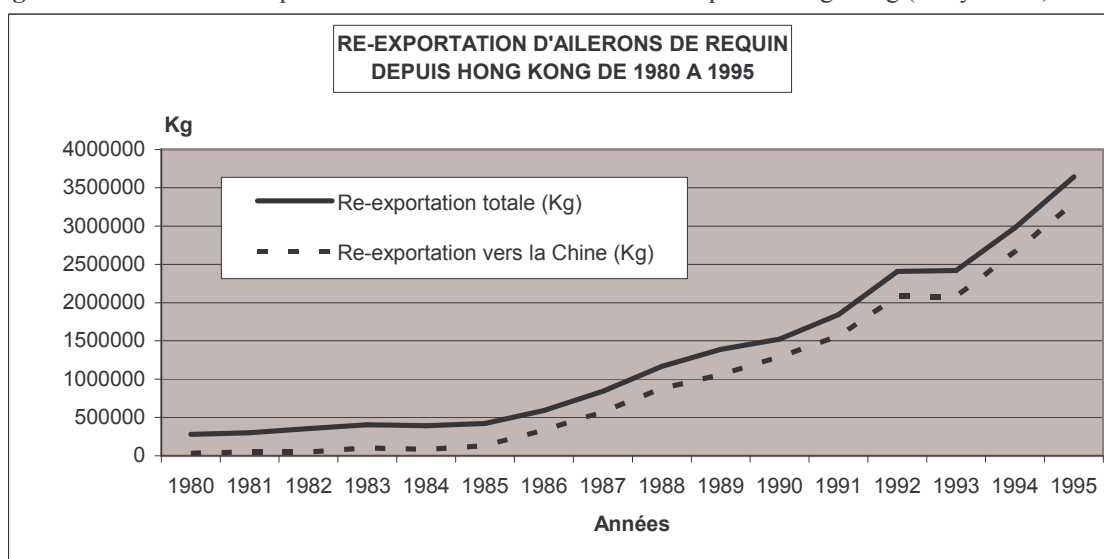


Figure 6. Evolution des exportations d'ailerons secs ou salés de requin depuis Hong Kong (Parry-Jones, 1996b).

lorsque Hong Kong a commencé à expédier des ailerons en Chine pour la transformation. Les exportations vers la Chine constituent la majeure partie des exportations totales avec 56% des ailerons qui partaient pour la Chine en 1986 et plus de 91% en 1995. Même si la Chine joue un rôle de transformateur dans ces exportations, elle représente tout de même le plus gros consommateur mondial d'ailerons de requin (Parry-Jones, 1996a). L'écart entre la courbe des exportations totales et celle des exportations vers la Chine reste à peu près stable depuis les 16 ans ; ce qui implique que la Chine est le moteur de la croissance du marché mondial de l'aileron en créant une demande toujours plus importante. Hong Kong exporte des ailerons dans plus de 75 pays différents. Même si au début des années 80, la Thaïlande, Singapour, les Etats-Unis et la Chine représentaient les plus grands importateurs d'ailerons, la Chine a vite fait cavalier seul depuis 1987, suivie de loin par le Canada et le Japon, nouveaux amateurs d'ailerons. L'émergence de ces deux pays s'explique d'abord par la forte communauté chinoise au Canada puis par le goût immodéré des japonais pour ce nouveau produit de la mer. L'écart de quantité entre les produits entrants et les produits sortants s'explique par la consommation locale d'ailerons en soupe qui est aussi très importante. En effet, possédant une grande activité commerciale, Hong Kong est une des capitales mondiales des affaires. Ces proches cousins chinois y ont un fort pouvoir d'achat et les dîners d'affaires y sont très nombreux. La soupe d'ailerons de requin y est donc un des mets les plus appréciés et les plus consommés par les Hong Konguais.

En résumé, pour expliquer l'évolution de ce marché, il est intéressant de faire un parallèle avec l'histoire politique de la Chine au fil du siècle dernier. La consommation d'ailerons a d'abord été découragée, voire interdite par le gouvernement chinois après la deuxième guerre mondiale. Réputé pour être un plat luxueux et réservé au plus riches, il ne pouvait convenir à l'idéologie d'un peuple égalitaire. Mais au milieu des années 80, le relâchement des contrôles sur les marchés, la croissance économique, et une tolérance grandissante ont donné lieu à une explosion de la demande en ailerons. Une telle ouverture du marché a eu un impact énorme sur la production et les prix mondiaux. Ce commerce a pris son envol en 1987, avec le développement des flottes axées sur la pêche locale de requin et la mise au point de techniques de conservation et de transformation. La Chine a commencé à jouer un rôle clef dans le commerce international d'ailerons en tant que consommateur, mais aussi en tant que transformateur. Les différentes analyses révèlent les nombreux échanges, imports, exports et re-exports ; entre la Chine et une des deux plaques tournantes du marché : Hong Kong.

La Chine représente donc le moteur du marché international d'ailerons de requin, régulé par Hong Kong et Singapour directement alimenté par une production planétaire allant du pêcheur simple artisan aux gros industriels.

Le commerce des ailerons de requins a une structure très complexe avec une multitude de parcours possibles. L'aileron passe alors par au moins quatre intermédiaires dans le cas le plus simple et jusqu'à une dizaine dans les cas plus complexes. En moyenne, l'aileron est l'objet de 4 à 5 transactions pour arriver dans les mains de l'acheteur. Le nombre d'intervenants et la barrière culturelle ne permet pas d'obtenir des informations fiables et précises sur les produits finaux. La traçabilité des ailerons paraît être une notion beaucoup trop contraignante et difficilement applicable.

I.3. L'exploitation des requins

I.3.a. Les différents secteurs de pêches

On distingue alors trois types de pêches : les pêches artisanales ou traditionnelles, les pêches accessoires et les pêches ciblées sur le requin.

Les pêches artisanales ou traditionnelles sont celles des bateaux côtiers qui restent dans une limite de 12 nautiques de la côte. Ces embarcations possèdent des moyens limités et représentent a priori un effort de pêche minimale sur les requins. On retrouve ce type de pêche sur toute la ceinture tropicale, ce sont souvent des pêcheurs pauvres et qui produisent une pêche journalière faible. Leur chair, ayant une faible valeur commerciale, les requins ne représentent pas un objectif de pêche. Pourtant, sous la forte demande des acheteurs asiatiques, les pêcheurs du tiers monde pêchent aujourd'hui le requin pour la forte valeur ajoutée de ses ailerons. Cette pêche exploite plutôt les requins côtiers de la famille des Carcharhinidae ayant une répartition localisée et des stocks très limités. Le deuxième type de pêche concerne les « long-liners » qui capturent des thons sur des palangres de 1 à 2 km de long. Les thoniers restent dans une bande de 12 à 200 nautiques de la côte pendant quinze jours à trois semaines. Les longues lignes utilisées ne sont pas des outils de pêches sélectifs et il est très fréquent que des requins et même des oiseaux marins se prennent aux hameçons. On dit alors que ces prises sont accessoires.

Pourtant, elles constituent en moyenne entre 5 et 10 % des prises totales. Même si les requins ne sont pas directement ciblés par cette pêche, les marins n'hésitent pas à monter l'animal à bord pour lui découper les ailerons et rejeter le reste du corps à l'eau. Appelé « Fining », cette pratique est très critiquée par le gaspillage qu'elle implique. L'argent gagné par la vente des ailerons revient directement au pêcheur, c'est l'équivalent de ce que l'on nomme communément « la part du pêcheur ». Enfin, le dernier type de pêche, essentiellement asiatique, est directement ciblé sur les requins. Ce sont souvent de grosses unités de pêches qui vont pêcher au large, loin des zones territoriales à plus de 200 nautiques de la côte. L'objectif de ces bateaux est d'être le plus productif possible ; ce sont des bateaux usine avec ateliers de découpe et de conditionnement intégrés. Les campagnes durent de 6 à 12 mois, et des bateaux ravitailleurs viennent régulièrement faire la navette entre le pays d'origine et le bateau pêcheur pour échanger les provisions avec les requins capturés. Les carcasses entières de requins sont débarquées dans les ports de pêche. Les asiatiques consomment tout sur un requin, de la peau qui est cuisinée au foie, sans oublier les yeux, il ne reste alors plus que la colonne vertébrale qui est utilisée en thérapeutique et la mâchoire en joaillerie. Les zones les plus exploitées sont les eaux autour de la Papouasie-Nouvelle Guinée, l'Indonésie et le canal du Mozambique. Ces pêches industrielles capturent essentiellement des espèces pélagiques en grands nombres et font d'énormes dégâts dans les stocks (Chen *et al.* , 1996).

I.3.b. Etat des captures mondiales

L'unique source synthétique des captures de requins au niveau mondial sont les statistiques officielles de la FAO. Cependant, de nombreux chercheurs suppose que les chiffres communiqués, concernant les poissons cartilagineux, sont sous-estimés de 30 à 50%. Les données concernant les Chondrichtyens sont souvent limitées et les statistiques des pêcheries nationales rapportent rarement la production de peau, cuir, mâchoire, viande et œuf, huile de foie, de cartilage et mêmes d'ailerons séparément. De plus, dans les pays du tiers-monde, les pêcheries artisanales produisant de la viande salée et autre produits pour la consommation locale pourraient aussi être sous estimés dans les rapports nationaux. Enfin, les données de production accessibles au niveau national ne sont souvent pas inclus dans les rapports publiés par la FAO et pourraient par ailleurs ne pas être largement accessibles.

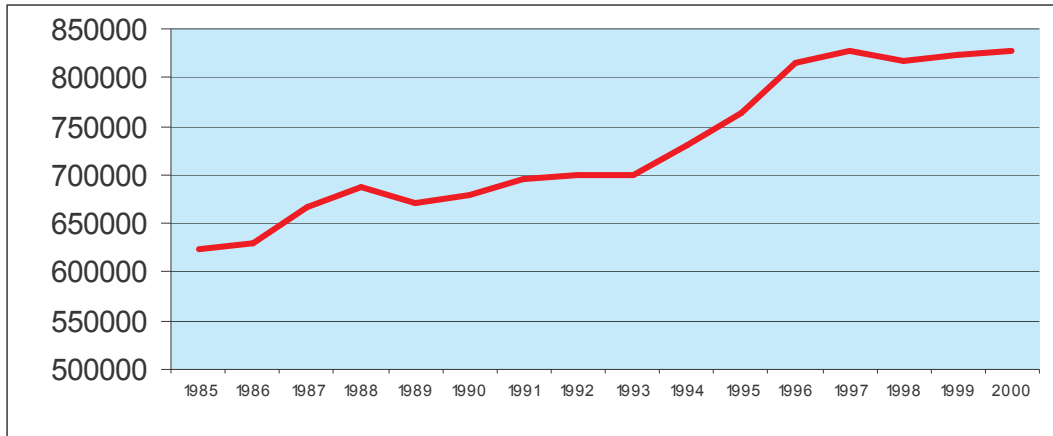


Figure 7. Evolution des captures mondiales des poissons cartilagineux de 1985 à 2000, exprimé en tonnes (Statistiques officielles de la FAO, 2002).

Les chiffres disponibles permettent tout de même d'évaluer l'évolution des captures mondiales de requins. La tendance générale est une augmentation sur les 15 dernières années, avec un plateau au début des années 90 puis une forte croissance jusqu'en 98 et à nouveau une stabilisation. Les captures ont presque doublé depuis 85, ce qui s'explique par de gros efforts de pêches marqués à la fin des années 80 et au milieu des années 90.

I.3.c. Etats et évaluation des stocks

Sur le plan international, l'impact global de la pêche sur les Chondrichthyens fait actuellement l'objet d'une attention particulière. La plupart des populations de chondrichthyens sont relativement improductives comparées aux populations de poissons osseux ; un handicap qui résulte de leurs stratégies de reproduction très lentes. Cela se traduit par une faible résistance des populations de requins aux pêches ciblées. Environ 50% de la capture mondiale estimée de poissons cartilagineux est constituée de prises accessoires qui n'apparaissent pas dans les statistiques officielles des pêches et ne font pratiquement l'objet d'aucune gestion. Ainsi, certaines raies, les poissons scies et des aiguillats de profondeur ont été virtuellement éradiqués de certaines grandes régions. Depuis janvier 2003, Baum *et al.* ont pu pour la première fois chiffrer la chute des stocks de requins en Atlantique Nord-ouest. D'après les chiffres, basés sur les prises déclarées par les pêcheurs « long-liners » nord-américains, les auteurs remarquent un déclin supérieur à 50% des prises de grands requins depuis 1986. Cette moyenne cache en plus une forte disparité entre les espèces qui ne réagissent pas de la même manière à la surexploitation. Le traitement statistique a mis en évidence chez le requin-marteau, le grand requin blanc et les requins renards une chute de plus de 75% en quinze ans.

Le requin bleu étant celui qui réagit le mieux à cette exploitation avec une baisse de 60% par rapport au stock initial. Cette étude est donc révélatrice du fort effondrement des populations pélagiques et côtières de requin sur une courte période. Sachant qu'un plan d'action américain gère et régule la pêche des requins dans cette zone, on peut supposer que la chute des stocks dans les autres parties du monde est au moins identique si ce n'est pire car aucun programme de protection n'y est en place. Prédateurs parfaitement adaptés au milieu, ces animaux tolèrent très mal l'exploitation humaine. Ayant une stratégie de reproduction très lente, ils mettront beaucoup de temps à régénérer les stocks. Aujourd'hui, plusieurs espèces sont en danger d'extinction et l'équilibre écologique marin risque d'être sérieusement ébranlé. Des mesures sérieuses de protection et de gestion doivent être prises au plus vite.

II. Importance écologique des requins et programmes de protection

II.1. Rôle écologique des requins et impacts de la surpêche

La plupart des requins et certaines raies sont des prédateurs placés au sommet de la chaîne. Cependant, on ne connaît pas très bien l'impact éventuel des prélèvements de grande ampleur sur les écosystèmes marins. En utilisant le programme ECOSIM, Stevens *et al.* (2000) ont réussi à recréer artificiellement l'écosystème marin et à simuler l'exploitation de plusieurs requins. Les impacts de la pêche sont étudiés sur une seule espèce en considérant ses relations trophiques. Trois environnements différents sont analysés : un écosystème côtier tropical au Venezuela, un récif corallien à Hawaï et un système océanique du Pacifique Sud. Nous ne développerons que l'écosystème du récif corallien qui est le plus représentatif et le plus illustré. Les auteurs se sont alors focalisés sur le requin Tigre (*Galeocerdo cuvier*) grand prédateur réputé pour sa voracité. Ce requin a un régime alimentaire très diversifié. Il se nourrit de crustacés, de poissons coralliens, de petits poissons pélagiques, de tortues, de thonidés, d'oiseaux marins, d'autres requins et même de congénères. Si l'on simule sa disparition sur une période de 100 ans, on observe de grands bouleversements de la biomasse avec certaines conséquences qui peuvent paraître surprenantes. Le nombre de requins récifaux et de tortues augmente d'un facteur 9, les poissons de fond et les oiseaux triplent leurs effectifs. Les populations de crustacés quant à eux n'augmentent que légèrement. Ces premières conséquences paraissent logiques et faciles à comprendre : le requin tigre est un des plus grands consommateurs d'oiseaux et l'unique prédateur des tortues marines et des autres

requins de récifs. En outre, l'augmentation du nombre de requins s'explique par absence d'un compétiteur hors norme. Néanmoins, même si au premier abord certaines conséquences ne paraissent pas logiques, elles sont parfaitement rationnelles. Chez les thonidés on observe une chute brutale des stocks et les poissons de profondeurs subissent une forte augmentation, qui ne font pas parti du régime alimentaire des requins tigres. Pour comprendre ces phénomènes, il faut analyser le réseau trophique au deuxième puis au troisième degré. Tout d'abord la chute des thonidés, alors proies du tigre, s'explique par une augmentation de la population d'oiseaux. Les juvéniles de thonidés sont une proies facile pour les oiseaux parce qu'ils naviguent généralement à la surface de l'eau. En augmentant le nombre d'oiseaux on diminue le nombre de juvéniles et donc d'adultes. La croissance de l'effectif de poissons de fond s'explique par un troisième effet consécutif. Les principaux prédateurs des poissons de fond sont les thons. Donc n'ayant plus de prédateur, la régulation de la population n'a plus lieu et la biomasse augmente. Pour résumer, la disparition du requin tigre augmente le nombre d'oiseaux qui se nourrissent davantage de thonidés juvéniles qui ne sont plus assez nombreux pour réguler la population des poissons de fond.

Cet exemple illustre les conséquences directes et prévisibles de la disparition des requins mais aussi nous fait prendre conscience des conséquences secondaires et tertiaires qui ne sont pas facilement prévisibles mais qui implique un grand désordre écologique. La place du requin est donc primordiale au un bon équilibre de l'écosystème marin.

II.2. Prise de conscience de la communauté internationale

La première réaction internationale vient de la FAO* en 1998 qui a commandé une série d'études régionales sur les pêches et une évaluation sérieuse des stocks. Les résultats inquiétants ont permis l'année suivante la création par les Nations Unies d'un Plan d'Action International sur la Conservation et la Gestion des Requins (IPOA-Sharks). Cette mesure de développement durable doit responsabiliser chaque pays et demande à chacun de mettre en place un Plan d'Action National dans les plus brefs délais. En 2000, une liste rouge est publiée par l'IUCN** incluant les espèces de requin en danger d'extermination. Cette liste réactualisée régulièrement par un Groupe de Spécialiste des Requins (GSR) n'a pas de réelle autorité mais permet de fixer les priorités dans les programmes de conservation.

* FAO : Food and Agriculture Organisation

** IUCN : The World Conservation Union

La Convention sur le Commerce International des Espèce en Dangers de la Faune et de la Flore Sauvage ou CITES*** (Convention de Washington, 1975) a un fort impact autoritaire. En 1994, la Conférence des Parties demande, dans un premier temps, une enquête approfondie sur l'état du commerce des espèces de requins (Résolution 9.17). La dixième Conférence des Parties (1997) n'a fait que reprendre les maigres résultats du rapport commandé trois ans avant. La Conférence des Parties de 2000 traite les propositions d'inscription dans la liste II trois espèces « stars »: le requin baleine, le requin pèlerin et le grand requin blanc. Les trois inscriptions ont été rejetées par la majorité des 151 pays membres (Cunningham, 2002). Les pays hostiles à cette proposition ont justifié leur choix en désignant la FAO comme seule responsable possible de la gestion et des pêches et non la CITES. Néanmoins, deux ans plus tard, voyant que les Plans d'Action Nationaux n'ont été adoptés que par quelques pays, la douzième Conférence des Parties est le siège d'une lutte à couteaux tirés sur l'inscription des requins pèlerin et baleine. Les deux espèces sont finalement inscrites à quelques voix près en liste II.

L'Union Européenne, l'un des plus gros producteur d'ailerons avec l'Espagne, vient de finir, en juin, le texte de son Plan d'Action et vote régulièrement des résolutions sur l'interdiction du « fining » en obligeant les pêcheurs européens à débarquer les ailerons sur les carcasses de requins. Malheureusement, la pression des professionnels de la mer ne permet pas une application stricte des textes.

II.3. Problématique

II.1.a. Position du problème

Le requin est un animal qui est essentiellement exploité pour ses ailerons. La forte demande asiatique encourage une production en croissance depuis plus de 15 ans. En outre, les stocks de requins s'effondrent, et la place primordiale du prédateur dans l'écosystème marin, laisse imaginer un déséquilibre dont les conséquences sont difficilement prévisibles mais risquées. Aujourd'hui deux espèces sont inscrites sur la liste II de la CITES et le contrôle des marchandises, pas encore en place, demandera une méthodologie fiable et précise. On sait que la première question à laquelle il faut répondre concerne l'identification de l'espèce. Or les études morphologiques et anatomiques sont impuissantes face à des ailerons sans peau et sans ossature.

*** CITES: Convention of International Trade in Endanger Species of Wild Fauna and Flore

Il ne reste plus qu'à s'orienter vers l'étude des molécules, en choisissant une technique adaptée pour répondre à la question : A quelle espèce appartient cet aileron ?

Le système d'analyse permettra de contrôler les marchandises en fraude contenant des espèces protégées. Nous n'envisageons pas des analyses systématiques mais seulement des contrôles inopinés lors de marchés ou de transit dans les aéroports.

II.1.b. Notion d'espèce

Lorsque l'on associe une séquence à une espèce, on doit pouvoir être sûr de l'espèce et des caractères qui la définisse. Néanmoins, la notion d'espèce est une notion floue et mal définie ou plutôt « indéfinissable » comme Darwin l'a rapporté dans une de ses lettres. En d'autres termes, l'espèce est une référence figée dans un système évolutif en perpétuel changement. Pourtant, trois critères utilisés seuls ou en association sont récurrents dans la définition de l'espèce. Ce sont les critères morphologiques, d'interfécondités / interfertilités et de descendance. Les critères d'identification utilisés dans cette étude sont issus d'une synthèse de plusieurs travaux. On basera nos identifications morphologiques sur les clefs fournies par Garrick (1982, 1985), Compagno (1984, 1988), Last (1994) et Grace (2001). On limitera notre travail aux espèces de grande taille, directement ciblées par le commerce des ailerons de requins. On ciblera donc 55 espèces dont 29 du genre *Carcharhinus*. Les requins de ce genre sont très proches morphologiquement et font souvent l'objet de discussions entre systématiciens pour les différencier. La génétique et la morphologie sont deux disciplines complémentaires, indissociables mais non équivalentes.

En résumé, un travail fondamental d'identification sera nécessaire pour déterminer morphologiquement les espèces cibles, qu'on associera ensuite à un marqueur d'espèce qu'il reste à déterminer.

III. Choix des techniques et des marqueurs moléculaires de détermination du polytypisme génétique

L'objectif de notre étude est de proposer une analyse mettant en évidence une variabilité interspécifique suffisante pour discriminer des espèces proches de requins. Nous définissons alors cette variabilité interspécifique comme **polytypisme**. La première étape consiste à travailler sur des ailerons qui ont subi un traitement (découpe,

pelage, séchage, cuisson...) et qui n'autorisent plus d'analyse morphologique ou anatomique. Nous orienterons alors nos analyses vers la biologie moléculaire. Plusieurs domaines moléculaires sont accessibles pour révéler le polytypisme : selon l'échelle on pourra utiliser le **polytypisme biochimique** (affectant la structure d'une enzyme par exemple), le **polytypisme nucléotidique** (identifié au niveau des sites nucléotidiques de la séquences ADN) ou le **polytypisme chromosomique** (affectant la structure des chromosomes). Il s'agit ensuite de choisir un couple marqueur/outil tenant compte de l'accessibilité, du coût et de l'efficacité de la technique.

On entend par marqueur, la molécule cible qui correspond aux critères de discrimination et qui répond à notre problématique : dans le cas présent un marqueur d'espèce. D'ors et déjà nous écarterons l'exploration chromosomique qui repose sur des techniques complexes de cytologie et l'obtention d'informations peu fiables. Nous présenterons et étudierons donc la possibilité d'emploi de plusieurs marqueurs génétiques à l'échelle protéique puis nucléotidique.

III.1. Les marqueurs biochimiques : exploration du polytypisme protéique

On entend par marqueurs biochimiques, les protéines de structures ou enzymatiques qui ont été les premiers marqueurs à avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique dans les années 60. En effet, l'étude des gènes peut-être faite de façon indirecte au travers de l'étude de la séquence d'acides aminés des protéines codées par ces gènes. Il est alors possible de révéler du polytypisme dans la séquence d'acides aminés qui composent la protéine.

Rappel : La synthèse d'une protéine est le résultat de l'**expression génique** qui consiste en la succession de deux étapes, à partir de la molécule d'ADN : l'ADN est d'abord copié en ARN messenger (la **transcription**), puis l'ARN est traduit en une suite d'acides aminés composant la protéine (la **traduction**). L'expression génique ne concerne que les gènes structuraux codant pour des macromolécules (ARN, protéines structurales ou enzymatiques).

Pour cela, il suffit de mettre en évidence une variabilité à partir d'un polypeptide spécifique déterminé, purifié et séquencé chez des espèces distinctes. En comparant les séquences obtenues, il sera ensuite facile d'identifier une espèce à partir d'un échantillon d'origine inconnue. Il existe plusieurs techniques pour explorer la composition des protéines mais la plus utilisée et la plus accessible est l'électrophorèse enzymatique.

Les électrophorèses enzymatiques

En pratique, l'exploration du polytypisme protéique repose sur l'électrophorèse de protéines en gel d'amidon. Soumises à un champ électrique et conduites par une solution tampon, les protéines migrent en fonction de leur charge ionique totale. Selon cette charge les protéines vont exprimer une mobilité hétérogène. Le changement de mobilité est principalement déterminé par le rapport entre le nombre d'acides aminés chargés positivement (notamment : lysine, arginine, histidine) et ceux chargés négativement (essentiellement les acides aspartique et glutamique). De cette analyse on déduit la structure de l'enzyme (monomère ou polymère), le nombre de locus impliqués et pour chaque locus le nombre d'allèles.

La toute première étude utilisant cette méthode date du milieu des années 70, avec le travail de Johnson et Utter (1976) sur le polymorphisme enzymatique de 15 espèces de poissons de la zone intertidale et subtidale. Ensuite Soléa-Cava *et al.* (1983) ont tenté de différencier par électrophorèse deux espèces d'Ange de Mer du sud Brésil (genre *Squatina*), très proches morphologiquement. En 1986, Smith a mis en évidence une faible variabilité enzymatique entre 7 espèces de requins. Naylor (1992) tente de mettre en évidence les relations phylogénétiques entre certains Carcharhiniformes (requins marteaux et requins requiem) mais il obtient des milliers d'arbres « parcimonieux » avec des scores identiques. Il propose alors des critères de sélection pour élaborer un arbre consensus. Cette étude marque déjà les limites de la technique qui manque cruellement d'information. A titre d'exemple on peut citer Lavery (1992) qui emploie la même méthode pour décrire les relations phylogénétiques entre les requins du genre *Carcharhinus* en Australie. Il en résulte de longues heures de manipulations coûteuses, avec pour résultat des associations entre espèces qui aujourd'hui apparaissent comme approximatives et peu probables. L'auteur propose alors de s'orienter vers d'autres méthodes moléculaires plus précises pour éclaircir ces relations interspécifiques. Pourtant, Eitner (1995) insiste et essaye de mettre en évidence les relations phylogénétiques entre les trois espèces de requins renard du genre *Alopias*. Il n'arrive cependant pas à dissocier les espèces *superciliosus* et *pelagicus* ; et pense même avoir mis en évidence une espèce inconnue à partir de ses profils enzymatiques. Découverte douteuse connaissant les limites de la méthode et l'absence d'information morphologique sur des spécimens prélevés par un correspondant. En systématique, la génétique doit forcément être rattachée et associée à la morphologie. Ce sont deux

disciplines complémentaires. La dernière étude en date, est celle de Renon (2001), qui suggère l'identification de carcasses fraîches de deux requins à haute valeur ajoutée (*Mustelus mustelus* et *Mustelus asterias*) sur les marchés italiens et qui font l'objet de nombreuses fraudes. Comparés à d'autres requins éloignés présents sur les marchés mais de valeur inférieure, les profils affichent des bandes spécifiques de chaque espèce. Cette étude semble donc répondre aux objectifs sous réserve de prélever sur les marchés des échantillons suffisamment frais pour analyser des protéines non dénaturées.

En résumé, un des inconvénients majeurs de cette technique est de détecter uniquement les variations majeures des gènes de structure. En effet, si la plus grande part de l'évolution, qui concerne la morphologie, la physiologie et le comportement, repose sur des modifications d'éléments génétiques régulateurs et non codant, alors la variation observée dans les gènes de structure n'apportera aucune information valable. Il est donc probable qu'entre des espèces proches aucune variation protéique ne soit mise en évidence. En outre, pour l'analyse des ailerons, on utilisera comme matière première des produits transformés (séchés, bouillis voire salés) qui ne contiendront que des protéines fortement dénaturées. Le choix des enzymes comme marqueurs du polytypisme n'est donc pas conseillé. Nous orienterons donc notre recherche vers des marqueurs plus informatifs et plus stables.

III.2. Les marqueurs génomiques: étude du polytypisme à l'échelle des nucléotides

Les protéines sont le produit de l'expression génétique, c'est-à-dire la traduction de l'information contenue dans la molécule d'ADN. Pourtant cette information est plus précise et plus importante. En effet, pendant la traduction de l'ADN, une certaine partie des informations sont perdues ou non traduites parce qu'elles incluent des systèmes de régulation. Comme le degré d'information contenu dans les protéines n'est pas suffisant pour différencier des espèces, il paraît logique de remonter à la molécule d'ADN et aux séquences de nucléotides qui la codent. En outre, l'ADN est une molécule très résistante qui se conserve plutôt bien au fil du temps, en témoignent les analyses faites sur des restes organiques datant de plusieurs centaines, voire de milliers d'années. L'analyse de l'ADN recouvre différentes techniques que nous évoquerons en précisant leur implication dans des études axées sur les Chondrichtyens, leur finesse d'analyse, leurs limites et donc leur pertinence dans notre projet.

III.2.a. Etape préliminaire : la réaction de PCR

Pour pouvoir étudier directement la molécule d'ADN il faut d'abord en avoir une grande quantité. Ainsi avant toute opération, il est nécessaire de copier en grand nombre le fragment de la molécule qui nous intéresse en utilisant la réaction de PCR. La PCR (« Polymerase Chain Reaction » ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) permet en effet d'obtenir d'un très grand nombre de copies d'un ADN cible. Le principe de cette technique consiste à utiliser deux amorces, qui s'hybrident à des sites complémentaires situés en orientation inversée sur les deux brins de l'ADN et qui encadrent la région que l'on veut amplifier. L'élongation des brins complémentaires à partir de ces amorces est assurée par une enzyme dite **polymérase**. Alors que le principe de la PCR a été découvert en 1985, en 1988 la PCR devient plus performante avec l'emploi de la *Taq* polymérase dérivée d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, isolées des sources chaudes du parc de Yellowstone et qui présente la propriété d'être stable à la chaleur. La réaction de PCR est une succession en chaîne de trois étapes :

- La dénaturation de l'ADN réalisée à haute température (une minute à 94°C) conduit à la séparation de deux brins d'ADN.
- L'hybridation des amorces spécifiques se réalise à une température notée T_m déterminée en fonction de la composition nucléotidique des amorces (1 minute à 50-60°C).
- L'élongation des brins d'ADN est effectuée à 72°C (une minute).

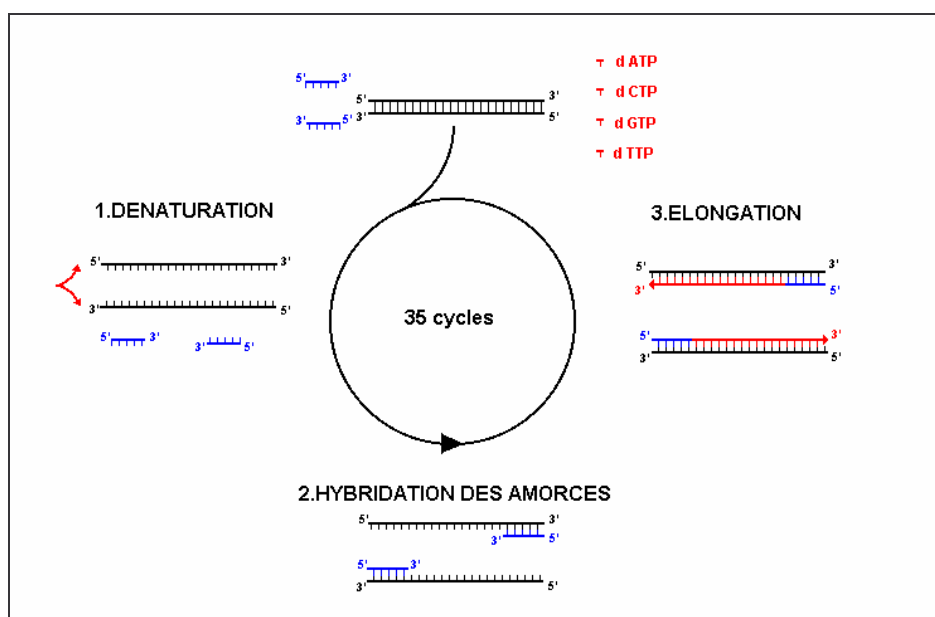


Figure 8. Cycle de PCR

Ce cycle de trois températures est répété 20 à 40 fois. A chaque cycle, la quantité d'ADN est multipliée par deux, puisque chacun des deux brins d'ADN nouvellement synthétisés sert de matrice à la fabrication d'un nouveau brin complémentaire. Une séquence peut être amplifiée par un facteur de 10 millions avec une haute spécificité. Une fois le fragment d'ADN étudié produit en grande quantité, il est ensuite possible d'utiliser plusieurs techniques pour en explorer la variabilité nucléotidique.

III.2.b. La technique du RFLP

La découverte des **enzymes de restriction** a permis les premières analyses du polymorphisme à l'échelle des nucléotides par l'utilisation du **Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction** (PLFR ou RFLP pour Restriction Fragment Length Polymorphism).

Le principe consiste à obtenir plusieurs fragments d'ADN de différentes tailles, résultat de l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction qui coupent le double brin en des points bien précis appelés **sites de restriction** d'une taille de 4 à 6 paires de bases (pbs). Pour cibler l'ADN génomique coupé, on utilise soit des sondes marquées (fragments d'ADN clonés) qui vont s'hybrider sur les fragments de restriction après dénaturation ; soit par électrophorèse sur gel, ce qui permet leur séparation en fonction de leur taille. On retrouve alors des fragments de tailles différentes chez des individus distincts. Dans le protocole de digestion, on peut directement soumettre la molécule d'ADN à l'action des enzymes sans faire d'amplification au préalable. Cependant la lecture et la sensibilité de la technique est bien meilleur après une PCR. La variabilité d'un site de restriction se manifeste par la présence ou l'absence de celui-ci, qui se traduit par un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction. L'absence d'un site est généralement due à une différence portant sur un seul nucléotide, qui se traduit par un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction. On peut donc utiliser les RFLP pour souligner les divergences nucléotidiques entre plusieurs espèces. En conséquence, une mesure du nombre total de différences de RFLP, sous forme d'une matrice de distance, représente alors une mesure de la différence génétique entre chaque espèce analysée. Cette méthode peut être utilisée pour explorer une partie du génome mais aussi révéler rapidement un polymorphisme génétique.

On retrouve dans la littérature plusieurs articles qui se réfèrent la méthode du RFLP : Heist *et al.* (1996a) reprennent cette technique pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les populations de juvéniles du Requin aiguille gussi (*Rhizoprionodon terraenova*) se divisent en deux zones de reproduction géographiquement voisines. L'analyse ne montre pas de différence génétique significative entre les individus, et renvoie à l'hypothèse nulle d'une unique population de juvéniles. Cette même équipe (Heist *et al.*, 1996b), s'est ensuite penchée sur la structure génétique des populations de requins Mako (*Isurus Oxyrinchus*). En analysant les fragments obtenus à partir de cinq sites de capture répartis sur plusieurs océans, Heist *et al.* ont mis en évidence la présence d'un groupe génétiquement isolé en Atlantique Nord. Deux ans plus tard, Heist et Gold (1998) emploie à nouveau cette méthode comme outil de diagnose dans une problématique d'identification génétique des requins pêchés sur la côte Est américaine. Après avoir séquencé 400 paires de bases du Cytochrome b (ADN mitochondrial) de 11 espèces de Carcharhiniformes, ils ont isolé des sites de restriction spécifiques à chacune des espèces étudiées. Avec un pool de sept enzymes, il est alors possible d'identifier le requin à partir d'un simple fragment de tissu. Cependant l'article évoque des problèmes de variabilité intraspécifique des fragments de restriction pour le requin Tisserand (*Carcharhinus brevipinna*), on obtiendrait alors des résultats différents selon la localisation de la capture pour cette espèce. En outre, cette méthode ne s'applique qu'à 11 espèces, ce qui suggère une limite de ce test face à des espèces non étudiées mais pouvant être capturées. Garner et Ward (1998) ont utilisé, une première fois, cette méthode couplée à l'électrophorèse enzymatique et au comptage de vertèbres précaudales pour étudier la structure des populations de l'Emissole gommée (*Mustelus antarcticus*). Triple analyse réutilisée une deuxième fois, en 2002, par les même auteurs pour éclaircir la taxonomie des requins australiens et néo-zélandais du genre *Mustelus*. L'utilisation complémentaire de ces trois disciplines dévoile bien l'incapacité de chaque technique à être employée seule dans la ségrégation d'individus génétiquement proches. En 1999, Heist et Gold étudient la structure génétique de deux populations de requin gris commun (*Carcharhinus plumbeus*). Malheureusement, une fois de plus, les groupes analysés appartiennent au même stock génétique. Enfin, Pardini *et al.* (2001) ont utilisé les enzymes de restriction pour souligner les séparations géographiques des populations de grands requins blancs femelles (*Carcharodon carcharias*) et les migrations reproductrices des mâles. Après analyse de 95 animaux, une nette dichotomie apparaît entre les groupes de femelles qui restent localisés puis des migrations qui sont apparemment exclusivement masculines : cet article marque une étape

importante dans la compréhension du comportement sexuel de ces grands prédateurs.

Essentiellement utilisée dans des études de population, cette technique est un outil rapide et facile d'utilisation qui s'adapte à l'exploration de la variabilité nucléotidique dans des protocoles à grands effectifs. Cependant cette méthode demande souvent une première exploration par séquençage du génome pour déterminer les sites de restrictions. Enfin l'interprétation et le pouvoir discriminant des résultats demandent un gros travail d'analyse et affichent des carences informatives pour la spéciation. Nous préférons écarter cette technique d'analyses pour des méthodes plus précises et faciles à interpréter mais malheureusement moins rapides.

III.2.c. La technique RAPD

Cette technique s'inspire directement de la PCR (pour Polymerase Chain Reaction) et son sigle RAPD signifie **Randomly Amplified Polymorphic DNA**. Dans la méthode RAPD, contrairement à une PCR classique, une seule amorce non spécifique (au lieu des deux spécifiques) est utilisée. Cette amorce présente une séquence nucléotidique aléatoire, standardisée généralement à 10 nucléotides. En raison de sa petite taille, l'amorce a une grande probabilité de s'hybrider à des sites complémentaires proches les uns des autres et en orientation inversée sur l'ADN matrice. L'utilisation d'une amorce de PCR conçue aléatoirement amplifiera par hasard plusieurs régions distinctes du génome. Les produits de l'amplification varient alors en longueur et par la nature de leur séquence. Le résultat de ces amplifications est une série de bandes de taille variable en électrophorèse sur gel. Selon les espèces on peut mettre en évidence une variabilité génotypique à partir des différents amplifiats obtenus. A ce titre, le groupe de fragments d'ADN amplifiés, appelés ADN polymorphes amplifiés de façon aléatoire, est un type d'empreinte ADN que l'on peut utiliser pour caractériser un individu, ce qui peut se révéler utile dans l'étude des espèces. Un des avantages majeurs de cette technique est qu'elle ne nécessite aucune connaissance préalable du génome étudié et repose sur l'emploi de basses températures d'hybridation. L'ADN ciblé par la RAPD est essentiellement de l'ADN nucléaire et notamment des régions répétitives.

A ce jour, aucun article se référant à la génétique des requins ne fait état de l'utilisation de cette technique. Cette mise à l'écart s'explique peut-être par la mise au point de méthodes d'explorations et de marqueurs de variabilité nucléotidique plus spécifiques et moins aléatoires. Nous n'utiliserons donc pas cette technique dans notre étude.

III.2.d. L'utilisation des microsatellites

Plus récemment, le développement des empreintes mini- puis microsatellites de l'ADN nucléaire a permis d'identifier les différences nucléotidiques entre individus. Les microsatellites sont de courtes régions d'ADN présentant un motif répété qui peut porter sur 2 à 5 nucléotides. Par exemple le motif répété peut être dinucléotidique, comme $(CA)_n$, trinucleotidiques comme $(CAT)_n$ ou quadrinucleotidiques comme $(CATG)_n$. Le nombre de répétition est en moyenne de 10 à 30. Ces marqueurs sont aussi nommés STR pour « Short Tandem Repeats » ou SSR pour « Simple Sequence Repeat ». Les microsatellites sont présents dans le génome nucléaire mais également dans le génome mitochondrial. Ils ont été utilisés comme marqueurs du fait de leur haute variabilité. Les taux de mutation mesurés expérimentalement sont de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-6} par kilobase (kb). Ces taux de mutation élevés s'expliquent par des erreurs de réplication, des mécanismes de réparation plus souples et sans contrainte sélective sur ces régions non codantes. La variabilité génétique repose alors sur la taille du microsatellite c'est-à-dire sur le nombre d'unités de répétition. Cette variation est détectée en soumettant à une électrophorèse sur gel les produits obtenus après une amplification réalisée à l'aide d'amorces spécifique du locus microsatellite. L'isolement de locus microsatellites nécessite la constitution d'une banque génomique. Cette étape est longue et complexe et ne sera pas décrite. Une fois le locus identifié et une paire d'amorces encadrant ce locus défini, il est ensuite aisé d'analyser les profils électrophorétiques des différents individus étudiés. Les variants de toutes tailles constituent différents « allèles » qui peuvent ainsi servir de marqueurs.

Aucun article n'a utilisé les profils électrophorétiques des microsatellites pour l'étude génétique des requins. Un séquençage du microsatellite est plus approprié aujourd'hui pour explorer ce marqueur. Ainsi Martin *et al.* (2002b), avec plus ou moins de difficultés, a réussi à reproduire les relations phylogénétiques des Lamniformes à partir de 10 séquences microsatellites d'espèces différentes. Les résultats obtenus concordent avec les études précédentes sur des marqueurs différents, ce qui s'explique par le faible taux de substitution génomique chez les requins. Cependant, l'analyse de ce marqueur, qui suppose un séquençage, nous renvoie vers l'exploration d'autres marqueurs plus informatifs basés sur la variabilité nucléotidique et pas seulement sur un nombre de répétitions.

Dans une publication qui date de 1993(a), Martin reprend les différentes techniques de biologie moléculaire appliquée à la problématique de l'identification génétique des espèces de requins. Dans le tableau ci-dessous, l'auteur résume les particularités et la pertinence de chaque méthode pour répondre à ce problème. Le séquençage automatique n'existant pas à l'époque, nous avons pris la liberté de rajouter une ligne au tableau pour y intégrer cette nouvelle technique.

Méthode	Pouvoir discriminatif	Tissu		Coût	Aisance
		Nature	Qualité		
Alloenzymes	Moyen à élevé	Spécifique	Sensible	Faible	Rapide
RFLP	Moyen à élevé	Peu spécifique	Sensible	Faible	Fastidieux
PCR-RFLP	Moyen à élevé	Peu spécifique	Peu sensible	Faible	Rapide
Séquençage manuel	Elevé	Peu spécifique	Peu sensible	Elevé	Fastidieux
Séquençage automatique	Elevé	Peu spécifique	Peu sensible	Moyen à élevé	Rapide

La méthode de séquençage représente, dans une perspective d'avenir, la meilleure technique d'analyse du polytypisme chez les requins. La séquence de nucléotides contient l'information la plus fine et la plus riche accessible à l'échelle moléculaire. La grande tolérance de la molécule d'ADN, couplée à la méthode d'amplification permet d'envisager des analyses dans des conditions extrêmes. Enfin l'arrivée de l'automatisation du séquençage facilite énormément les manipulations et autorise l'idée d'analyses systématiques.

III.3. Le séquençage direct

Depuis l'étude de la variabilité spécifique via l'étude des protéines en 1966, les avancées technologiques ont permis de déceler la variabilité au niveau de l'ADN. La découverte des enzymes de restriction en 1973 a ouvert la voie aux marqueurs moléculaires. Cependant, l'une des découvertes qui a révolutionné l'analyse de la variabilité est bien la PCR. Grâce à l'amplification de l'ADN cible, il est maintenant possible de procéder au séquençage direct de l'ADN. A l'origine longues et coûteuses, les techniques de séquençage sont aujourd'hui largement développées et faciles d'accès. Le séquençage est maintenant automatisé et utilise des méthodes rapides et bien maîtrisées. Il paraît donc logique que cette étude s'oriente vers une technicité plus moderne, afin de profiter de toutes les informations accessibles à l'échelle

des nucléotides. Certains marqueurs ont déjà été étudiés chez les requins et représentent un intérêt certain pour notre application au contrôle. En annexe, un tableau de synthèse reprend l'ensemble des espèces de requins qui ont été séquencées en précisant pour chacune le marqueur, la taille du fragment et les auteurs. On présentera ici les différents marqueurs étudiés chez les requins en séparant : nucléaires pour ceux qui appartiennent au génome du noyau de la cellule et mitochondriaux pour ceux qui composent le génome des mitochondries de la cellule. Pour chacun des marqueurs nous ferons une présentation générale, un résumé bibliographique puis nous étudierons une éventuelle implication dans l'analyse du polytypisme.

III.3.a. Les marqueurs nucléaires

i. Les ITS 1 et ITS 2

Les régions nommées ITS1 et ITS2 correspondent aux espaces intercalaires transcrits (Internal Transcribed Spacer). En effet, elles sont transcrites en même temps que les gènes des ARNr 18s, 5, 8s et 28S ; cependant, étant donné que les ITS ne possèdent pas de fonction biologique propre, la pression de sélection sur ces séquences est donc faible. Les régions codantes et celles d'espacement diffèrent largement par leur taux d'évolution, c'est ainsi que les groupes de gènes d'ARNr peuvent révéler les relations phylogénétiques existantes depuis le niveau des grands embranchements d'organismes vivants jusqu'à celui des populations.

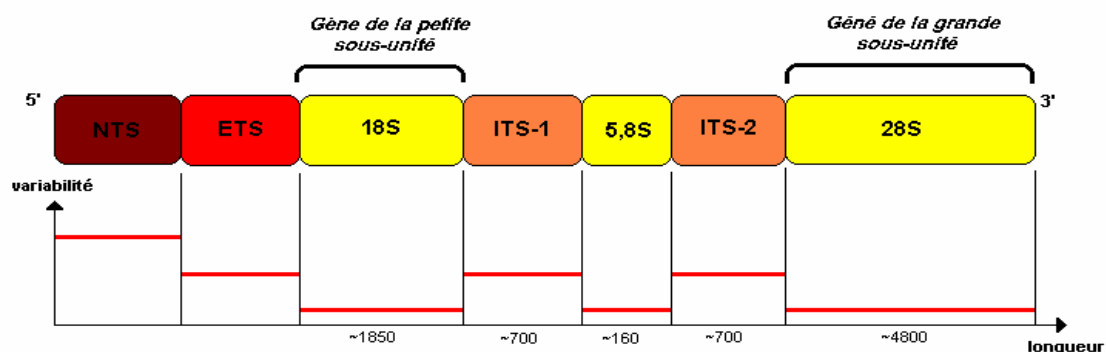


Figure 9. Position relative des gènes codant pour les ARNr 18S, 5,8S, 28S et les ITS dans le génome nucléaire et représentation schématique de leurs variabilités (NTS : non transcribed spacer ; ETS : external transcribed spacer ; ITS : internal transcribed spacer) ; (Iglesias, 2001).

Pank *et al.* (2001) sont les premiers et les seuls à employer les ITSs chez les requins dans une problématique de distinction entre deux espèces proches : *Carcharhinus obscurus* (requin obscur) et *Carcharhinus plumbeus* (requin gris commun). Utilisant le principe de la PCR multiplexe, cette étude se penche sur le problème d'identification des requins sur les marchés nord américains après la découpe. Un an plus tard, la même équipe, Shiyji *et al.* (2002), applique la même technique pour l'identification de requins pélagiques à partir d'un fragment de tissu. Six couples d'amorces spécifiques, chacun à un des six requins ciblés, sont conjuguées pour amplifier un fragment d'ADN de taille différente selon l'espèce analysée. Cette recherche recoupe notre étude mais les objectifs et les réponses données à une problématique pourtant similaire ne sont pas les mêmes. Cette méthode est rapide et théoriquement efficace mais présente cependant plusieurs désavantages. Nous comparerons les deux méthodologies dans notre discussion.

ii. Les RAG 1 et RAG 2 :

Les RAGs, pour « Recombination Activating Gene », sont des gènes qui codent pour des substances capables d'activer par recombinaison les gènes des récepteurs membranaires d'antigènes. Ce mécanisme d'activation est essentiel dans l'expression du système immunitaire chez les vertébrés. La première étude ayant exploré les RAGs chez les requins date de 1996 avec l'article de Bernstein *et al.* sur l'origine évolutive de ces gènes. Les Chondrichthyens, étant les premiers vertébrés encore vivants et ayant un faible taux d'évolution, ont été utilisés comme référence pour déterminer l'origine des RAGs. Sur la base d'une homologie avec les gènes des procaryotes, l'auteur suggère une origine microbienne de RAGs par l'intégration de sites spécifiques du système de recombinaison. Schluter et Marchalonis (2003) réutiliseront ensuite ces marqueurs dans une approche phylogénétique des poissons à partir de la séquence RAG 2 du requin gris commun (*Carcharhinus plumbeus*). Ces gènes font l'objet d'un intérêt croissant de la part de plusieurs équipes.

Pourquoi une telle frontière entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial ? Un premier élément de réponse est rapporté par Martin (1999) dans une analyse des génomes mitochondriaux (cytochrome b) et nucléaires (dlx, hsp 70 et RAG 1) chez les mammifères et les requins pour mettre en évidence une évolution plus lente des chondrichthyens. En outre, la comparaison des deux génomes chez les requins confirmerait de façon significative une covariation du taux de substitution des gènes mitochondriaux et nucléaires. Les deux génomes codant pour des métabolismes proches, on suppose que la pression et le mécanisme de mutation sont communs aux deux ADN. Avec le même degré d'information que le génome nucléaire, le génome mitochondrial présente en plus de nombreuses propriétés qui peuvent faire la différence avec son homologue.

III.3.b. Les marqueurs mitochondriaux

i. Généralité sur le génome mitochondrial

L'ADN mitochondrial a été mis en évidence par Nass et *al.* en 1963 (J.Cell Biol. 13,383). La séquence complète est connue pour beaucoup de vertébrés dont au moins 6 poissons cartilagineux comptant quatre requins, une raie (*Raja radiata*) et une chimère (*Chimaera monstrosa*). Les génomes mitochondriaux de requins qui ont été entièrement séquencés sont ceux de

Rappel : La mitochondrie est un organite intracellulaire que l'on retrouve en nombre variable, plusieurs centaines, dans le cytoplasme de la cellule. Elle possède son propre ADN et occupe une place importante dans le métabolisme cellulaire. En effet, elle abrite dans sa membrane plusieurs séries de protéines constituant la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces chaînes sont responsables de la respiration cellulaire et de la production d'énergie sous forme d'ATP.

l'Emissole étoilée, *Mustelus manazo* (Cao et al, 1998), de la petite Roussette, *Scyliorhinus canicula* (Delarbre et al, 1999), celui de l'Aiguillat commun, *Squalus acanthias* (Rasmussen et Arnasson, 1999) et du requin dormeur cornu, *Heterodontus francisci* (Arnasson, 2001). Ce génome possède plusieurs particularités qui justifient son utilisation dans la spéciation des individus :

>Génome de petite taille

Le contenu en information du génome mitochondrial est non seulement très limité mais aussi très compact. Il ne comprend en effet que 16569 paires de bases et regroupe 37 gènes. C'est une molécule d'ADN circulaire présente en 2 à 10 copies par mitochondrie. La nomenclature des gènes change d'un groupe à l'autre mais le produit de leur traduction est le même : d'abord les gènes codant pour les deux sous-unités de l'ARN ribosomique (12S et 16S), puis pour les 22 ARN de transfert et 13 polypeptides. Ces derniers appartiennent aux grands complexes enzymatiques des phosphorylations oxydatives et de la synthèse de l'ATP : c'est-à-dire 7 sous-unités de la NADH déshydrogénase (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), le Cytochrome b (apocytochrome b), de l'ubiquinone oxydase-cytochrome c réductase, les trois sous-unités de la cytochrome c oxydase (Cox1, 2, 3) et les 2 sous-unités de l'ATP synthétase. Une région non codante appelée D-Loop contient l'essentiel des signaux de régulation de la transcription.

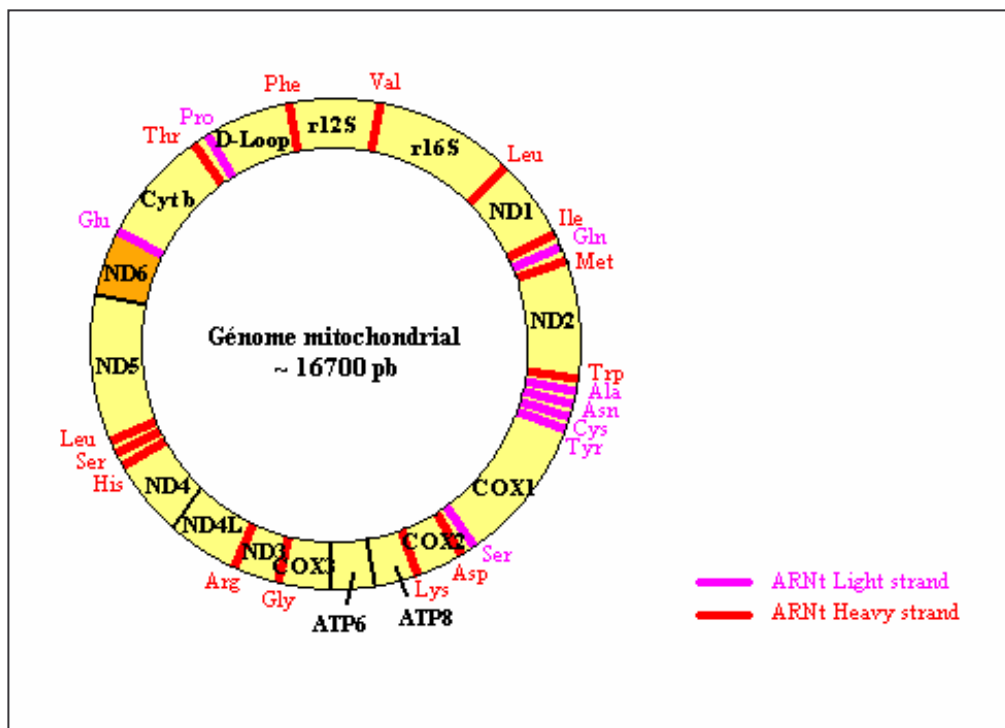


Figure 10. Structure du Génome mitochondrial de *Scyliorhinus canicula*.

Le génome est de petite taille (1700 pbs environ) mais est présent à de nombreux exemplaires au sein de la cellule (de 1000 pour une cellule somatique simple à 100000 pour un ovocyte). Ce grand nombre de répliques est un avantage car il permet un rendement d'amplification pour les marqueurs mitochondriaux supérieur à celui des marqueurs nucléaires.

>Transmission uni-parentale

L'ADN mitochondrial se caractérise aussi par une continuité génétique, en effet il est transmis de cellule à cellule et n'apparaît pas de novo car il provient des organites préexistants. Les mitochondries suivent une hérédité cytoplasmique : seul l'ADN du noyau du spermatozoïde est retenu au cours de la fécondation, le cytoplasme, et donc les mitochondries sont d'origine exclusivement ovocytaire. Le génome mitochondrial est donc transmis par la mère (transmission uniparentale) par l'intermédiaire des mitochondries de l'ovule. Toutefois, chez divers organismes, une contribution paternelle très minoritaire peut exister, l'ADN mitochondrial des descendants pouvant contenir 10^{-3} à 10^{-4} d'ADN paternel. Cette hérédité mitochondriale se traduit par un effectif efficace plus faible que pour les gènes nucléaires et se ramène alors aux nombres de femelles reproductives N_f . Cet effectif génétique est donc, en cas d'égalité numérique des sexes, quatre fois plus faible que pour les gènes nucléaires (qui vaut 2 fois l'effectif total $[N_f + N_m]$). Il y a alors moins de variabilité au sein d'un groupe. A titre d'exemple on peut citer le cas de frères et de sœurs issus d'une même mère et de pères différents : ils auront alors tous le même génome mitochondrial maternel.

>Haploïdie

L'ADN mitochondrial est une molécule bi-caténaire hélicoïdale circulaire présent en plusieurs exemplaires dans la mitochondrie. Contrairement au noyau qui est diploïde, c'est à dire comptant 2 allèles pour un même gène ou locus, on dit que la mitochondrie est haploïde et n'a donc qu'un allèle pour un gène donné. L'avantage de cette structure est d'éviter les problèmes de recombinaison intra-génétique. La structure circulaire de l'ADN mitochondrial a contraint à préciser le brin codant selon sa position à l'intérieur ou à l'extérieur du «virage». Ainsi si le brin codant est à l'extérieur on le désigne par « Heavy Strand » (chaîne lourde) à l'opposé on appellera le brin intérieur Light Strand (Chaîne Légère). Les nombreuses copies du génome mitochondrial dans la cellule sont un atout majeur pour le rendement de l'amplification. Une PCR sur un gène mitochondrial donne souvent des résultats très productifs.

L'ADN mitochondrial présente donc de multiples avantages pour l'identification d'une espèce: petite taille, facilité d'extraction, transmission uni-parentale sans recombinaison, variabilité importante avec une bonne conservation des parties codantes.

ii. La région de contrôle D-loop

La région de contrôle est une séquence non codante de l'ADN mitochondrial, qui est impliquée dans le contrôle de la réplication du génome mitochondrial. Cette origine de réplication constitue la portion la plus variable de la molécule d'ADNmt et est ainsi la région la plus appropriée pour mettre en évidence les différences de séquences nucléotidiques au sein d'une même espèce. Cette région présente un taux de mutation cinq fois supérieur au reste du génome mitochondrial et est appelée D-loop pour « Displacement-loop ». Chez certains vertébrés, il a été démontré que les variations de longueur de cette séquence sont dues à la présence de séquences répétées (microsatellites). Ces répétitions sont responsables de la variation intraspécifique de longueur de l'ADNmt et de l'hétéroplasmie de longueur, c'est à dire de la présence de formes multiples de la séquence au sein d'un même individu. Cette région non codante ne présente que peu de motifs de séquence conservés parmi les différents taxons de vertébrés. Elle est théoriquement constituée d'une région centrale extrêmement conservée (RCC) accompagnée de régions hypervariables (RH-1 et RH-2) contenant des séquences répétées en tandem qui sont le siège de mutations fréquentes de type substitutions ou insertion/délétions.

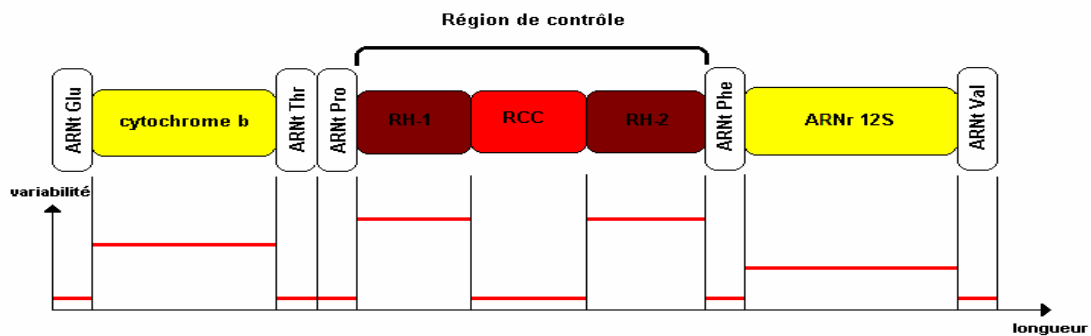


Figure 11. Position relative de la D-loop et du gène codant pour le cytochrome b dans le génome mitochondrial et comparaison schématique de sa variabilité (Iglésias, 2001).

Du fait de cette hypervariabilité, la D-loop constitue un marqueur de choix qui est un des plus utilisés pour l'étude des populations. Ainsi Kitamura *et al.* (1996b) explore la variabilité génétique de la séquence D-loop de 10 requins bouledogue (*Carcharhinus leucas*) provenant de sites différents. Après alignement des 484 paires de bases (pbs), l'auteur identifie 17 sites de variation et met en évidence trois populations distinctes réparties sur l'Australie, la côte pacifique du Mexique et la côte caraïbe de l'Amérique latine. En parallèle, l'équipe a

analysé une séquence de 405 pbs du cytochrome b et n'a observé que 5 variations entre les 10 spécimens. Le cytochrome b montre donc une variabilité intraspécifique bien inférieure à celle de la D-loop. La haute variabilité de la région de contrôle a été largement utilisée pour la détermination des relations et de la structure des populations de poissons. Cependant, cette variabilité ne permettra pas de l'utiliser comme marqueur d'espèce. En revanche, le cytochrome b affiche des propriétés intéressantes pour la spéciation des requins.

iii. Le cytochrome b

Le cytochrome b est une protéine membranaire de la mitochondrie qui intervient dans le transfert d'électrons et le métabolisme respiratoire. Le gène codant pour ce polypeptide est le fragment le plus étudié chez les requins. La première étude consacrée au Cytochrome b remonte à 1992 : elle démontrait que le taux d'évolution du génome mitochondrial était plus lent chez les requins que chez les Mammifères (Martin *et al.*, 1992). Il en résulte alors le premier arbre phylogénétique retraçant l'évolution des Carcharhiniiformes et des Lamniformes. Un an plus tard (1993), la même équipe proposera, dans une problématique évolutive, les 13 premières séquences de cytochrome b de requin qui seront mises à disposition dans GenBank. La même année (1993b) Martin publie seul une analyse phylogénétique sur l'origine et l'évolution des requins marteaux. En 1995, Martin, devenu le maître de la phylogénie des requins, propose une discussion sur la relation évolutive des Chondrichthyens. Le même auteur reprend ensuite, en 1996, la systématique des Lamnidae en la comparant aux différentes analyses possibles du cytochrome b. Ce sera le dernier article de Martin sur le Cytochrome b : il s'orientera ensuite vers d'autres marqueurs moléculaires. L'utilisation du Cytochrome b est reprise par Kitamura *et al.* (1996) dans deux études séparées. La première (1996a) traite de la phylogénie du superordre de Squalia pour compléter les recherches précédentes de Martin. La seconde (1996b) est un comparatif entre le Cytochrome b et la D-Loop pour identifier le meilleur marqueur de population chez *Carcharhinus leucas*. Cette étude finit par écarter le Cytochrome b en raison d'une variabilité intraspécifique trop faible. Enfin Heist (1998) utilisera 11 séquences de requins pour définir les sites de restrictions nécessaires à la discrimination de plusieurs espèces de l'Atlantique Nord-ouest. Il travaille alors uniquement sur des fragments de 400 nucléotides du cytochrome b. Grâce à Martin, le cytochrome est le marqueur le plus connu chez les requins et il présente de nombreux intérêts pour notre étude. Il a déjà été exploré à de nombreuses reprises et les méthodes d'analyse sont au point avec les séquences de plusieurs amorces

disponibles. En outre, plus de trente séquences de requin sont accessibles sur Genbank, ce qui évite de recommencer les mêmes manipulations. Toutes les séquences ne concernant pas les espèces cibles du commerce des ailerons, il restera quand même à réaliser un certain nombre de séquences.

iv. *L'ARN ribosome 16S*

Molécule structurale de la grande sous-unité du ribosome mitochondrial, le 16S est un gène reconnu pour être un bon marqueur d'espèce chez les procaryotes. Jusqu'à récemment le laboratoire de Concarneau était le seul à explorer cette partie du génome mitochondrial. La seule autre équipe à s'être intéressée au 16S est celle de Douady *et al.* (2003) dans l'évolution des raies comme un groupe frère des requins et non comme un groupe dérivé directement des squales. Ce marqueur montre d'excellents résultats dans l'étude de la phylogénie des requins de fond et sa manipulation est parfaitement maîtrisée dans le laboratoire de l'étude.

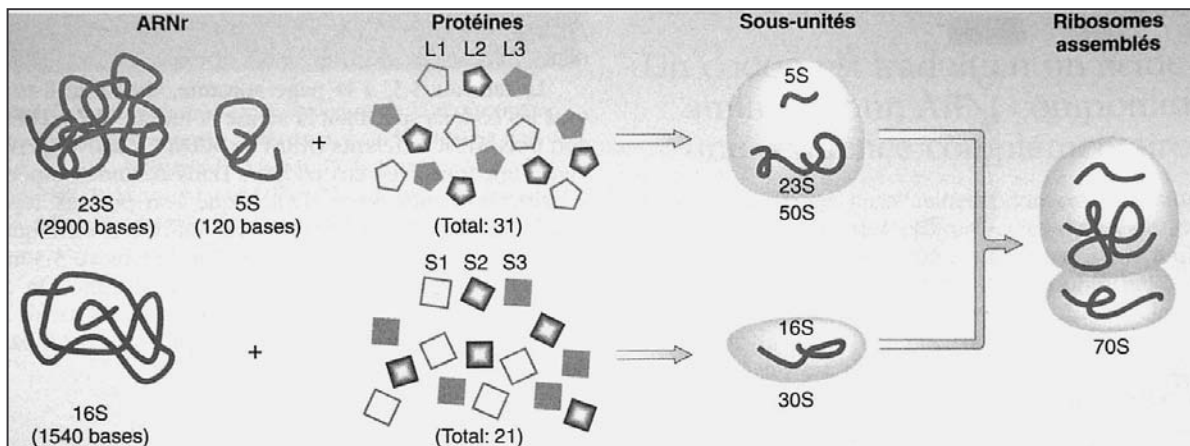


Figure 12: Structure des ribosomes mitochondriaux : Les ribosomes contiennent une grande et une petite sous-unité. Chaque sous-unité comporte à la fois des ARNr de différentes longueurs et un ensemble de protéines de nombre variable. Dans la petite sous unité, il y a une molécule principale : l'ARNr 16S. Les protéines de la petite sous unité (Large) sont appelés L1,L2,... et celles de la petite (Small) S1,S2,...(Griffiths, 2001).

Nous utiliserons donc le ribosome 16S en séquençage direct sur les espèces ciblées par le commerce des ailerons des requins. Nous tenterons ensuite de comparer la variabilité intraspécifique du cytochrome b et du 16S pour différencier le meilleur des deux marqueurs.

2^{ème} partie :

ETUDE EXPERIMENTALE

A partir de la synthèse bibliographique et des enseignements tirés des précédant travaux sur la génétique des requins menés à la Station de Biologie Marine, nous avons choisi comme marqueur d'espèce le gène mitochondrial codant pour l'ARN ribosomal 16S. Une fois le gène cible défini, il faut, dans un premier temps, vérifier la faisabilité technique de l'étude par un contrôle de la qualité et de la quantité d'ADN après le traitement subit par l'aïeron. Ensuite, il est nécessaire de collecter un maximum de prélèvements de requin clairement identifiés afin de sélectionner les échantillons qui serviront de référence dans la banque de séquences. Il faudra ensuite séquencer l'ensemble des espèces cibles et définir un système de comparaison entre la séquence analysée et les séquences de référence. Enfin nous validerons la méthode en simulant un contrôle en aveugle sur quelques ailerons trouvés sur le marché.

I. Matériel et Méthodes

1. Constitution de la banque de tissus

Un des principaux objectifs de notre étude est de créer une banque de référence de tissus de requins directement ciblés par le marché des ailerons. Pour cela, nous avons reparti nos efforts d'échantillonnage sur trois campagnes de prélèvement en deux ans.

Tout d'abord en France métropolitaine, où les espèces présentes en Atlantique Nord-est sont relativement faciles d'accès grâce à la collaboration des professionnels de la pêche. Ainsi, les pêcheurs thoniers capturent accessoirement plusieurs espèces pélagiques comme le Peau Bleu ou le requin Taupe. Ensuite, auprès des grossistes, comme sur le marché aux poissons de Rungis, où l'on retrouve parfois des espèces exotiques. Enfin, il est possible de trouver du requin chez le poissonnier de quartier mais le poisson est déjà découpé et les informations sur la capture sont pauvres. Une autre source intéressante de tissu sont les aquariums publics qui disposent pour la plupart d'espèces exotiques tel que le requin taureau ou le requin zèbre. Lorsqu'un animal meurt, les soigneurs conserve le cadavre de l'animal dans un congélateur en attendant le passage de l'équarisseur. Il est alors possible de récupérer un morceau de chair sur le requin congelé.

La deuxième campagne s'est déroulée sur l'île de Taïwan. Située aux portes du pacifique, elle possède une des flottes les plus importantes et les plus diversifiées orientée vers la capture de requins. Sur les nombreux marchés aux poissons, il est possible de récupérer quelques grammes de chair sur des animaux de belle taille fraîchement débarqués. Selon la saison, on ne trouve pas toujours les mêmes espèces. Cette campagne ayant eu lieu en septembre 2002, la majorité des espèces prélevées étaient pélagiques ou semi-pélagiques.

Enfin la dernière campagne a été organisée en Nouvelle-Calédonie (Mars 2003), territoire français d'outre-mer qui a la particularité d'abriter le plus grand lagon du monde. Cette île a été choisie pour des facilités logistiques et pour une grande diversité d'espèces côtières et récifales. Le travail sur place a été généreusement facilité par l'expérience et le savoir faire de plusieurs plongeurs et chercheurs en biologie marine.

La mise en place de ces trois campagnes s'est fondée sur le choix d'un type d'espèce de requin bien défini, en l'occurrence des requins de moyenne à grande taille, pélagiques, semi pélagiques et côtiers. Les objectifs de prélèvement regroupaient alors l'ensemble des Lamniformes, la majorité des Carcharhinidae (Carcharhiniformes), les Sphyrnidae (Carcharhiniformes) et quelques Orectolobiformes. Au total, environ 55 espèces de requins sont ciblées dans cette étude. Nous avons fixé le nombre de prélèvements à effectuer sur un même site à trois individus pour une même espèce. En effet, si lors du séquençage sur deux poissons on trouve une variation sur un nucléotide, la troisième analyse permettra de donner une orientation favorable au choix de ce nucléotide. En outre, toutes les espèces de requin présentes sur un site seront prélevées, les espèces non concernées par l'étude comprises, afin de créer la banque de tissus de Chondrichthyens la plus large possible. Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche descriptive, d'une série de photos numériques, du prélèvement, et si possible, d'une dent de la mâchoire supérieure et une de la mâchoire inférieure. Sur la fiche figure la date, le lieu de prélèvement et de capture, le nom latin supposé du requin, la taille, le sexe, le poids et le numéro de référence de l'échantillon. Les clichés numériques incluent pour chaque individu : un profil droit de l'animal entier, une face ventrale de la tête et tout indice morphologique déterminant pour l'identification finale du spécimen. Les photos ainsi que les dents représentent des outils précieux pour l'identification a posteriori de certaines espèces. Chaque prélèvement de chair de requin est conservé dans de l'alcool puis subdivisé en deux pour prévenir tout accident de perte ou de casse. Une fois regroupés les tubes sont stockés dans un congélateur (-18°C) à la Station de Biologie Marine de Concarneau.

2. Techniques de prélèvement

Dans son principe la technique de prélèvement est simple, elle consiste à faire une biopsie de 1 à 2 cm³ de chair à un requin dont l'espèce est clairement identifiée. Pour cela, le requin peut être mort ou vivant. Sur les marchés aux poissons où les criées, il est relativement aisé d'effectuer le prélèvement de chair sur place avec l'accord du pêcheur ou du mareyeur. Attention toutefois à bien identifier le spécimen et à récupérer les informations sur sa capture, ce qui n'est pas toujours facile. En effet, parfois le poisson méconnaissable, est déjà découpé et les marins dévoilent difficilement leurs sites de pêche. Les inconvénients de ce système sont que le chercheur participe à la demande en requins sur le marché et que les espèces proposées sont limitées aux espèces d'intérêt commercial.

Une autre stratégie est de capturer directement les spécimens par des campagnes organisées. L'avantage de cette méthode est de travailler sur l'animal entier dans de bonnes conditions et de profiter de spécimens en excellent état. Il est cependant parfois possible de garder le spécimen vivant avec une organisation et un savoir faire particuliers des manipulateurs. En effet, la biopsie d'un animal sauvage de plusieurs dizaines de kilos demande beaucoup de précaution et d'agilité. Néanmoins, les expéditions sont souvent coûteuses pour des résultats maigres. Le matériel de capture demande un entretien soigné et un renouvellement très fréquent. On peut rarement sauver le requin qui finit par s'asphyxier au bout de la ligne. Enfin les engins de pêches utilisés ne sont pas sélectifs et remontent souvent les mêmes espèces.

Les dernières stratégies de prélèvement sont effectuées en plongée sous-marine. Plusieurs chasseurs sous-marins recréent les conditions d'une frénésie alimentaire en attirant les requins à l'aide de poissons blessés. A partir de ce moment deux méthodes sont envisageables. La plus barbare consiste à s'approcher relativement près d'un spécimen pour décocher une flèche à tête explosive qui assommera puis finira par tuer le requin. L'animal sera ensuite hissé à bord de l'embarcation pour subir tous les examens nécessaires. Cette approche n'étant pas très écologique, un autre système a été mis au point. Toujours dans une action de pêche, un des chasseurs équipé d'un emporte pièce amovible à l'extrémité de son arbalète va prélever une carotte de chair en décochant une flèche dans le haut du flanc du requin. L'animal surpris prend la fuite. L'emporte pièce, ne s'enfonçant qu'à 5 cm grâce à un butoir, ne peut atteindre aucun des organes vitaux. Le pouvoir cicatriciel des requins étant surprenant d'efficacité, l'animal prélevé s'en tirera avec une légère cicatrice. Cette stratégie paraît être le meilleur compromis pour cette étude. En effet elle est peu invasive et sélective. En revanche, elle

demande une excellente organisation et coordination entre les plongeurs mais aussi une grande expérience pour reconnaître l'espèce, le sexe et évaluer la taille du poisson.

A l'issue de deux ans de prospection, près de 200 tissus ont été récoltés pour une trentaine d'espèces différentes de requins. L'ensemble des prélèvements ont rejoint la banque de tissus de poissons cartilagineux, déjà très fournie, de la Station de Biologie Marine de Concarneau.

3. Extraction de l'ADN génomique par la méthode CTAB

I.3.a. Principe

L'extraction de l'ADN par la méthode CTAB (CéthylTriméthylAmino Bromide) nous permet d'obtenir rapidement la totalité du génome cellulaire sous la forme de différents fragments. Cette méthode d'extraction après un broyage du tissu musculaire, comprend 5 étapes.

Désintégration des membranes

Celle-ci est assurée par le CTAB et par l'action d'une protéase à large spectre. Le CTAB, solvant anionique à chaîne flexible (Cf. formule) s'associe aux lipides et protéines par liaison de Van-Der-Waals. Ces associations, comme l'ADN, comportent alors une charge globale négative ; de ce fait toutes les molécules se repoussent. L'action de la protéase, la protéinase K, permet alors une destruction partielle des protéines.

Formule du CTAB :



Elimination des lipides et des protéines

Cette opération est assurée par le Chloroforme en présence d'alcool isoamylique. Le chloroforme solubilise les lipides tandis que l'alcool isoamylique empêche la formation de mousse lors de l'agitation. Après centrifugation nous obtenons deux phases : une phase aqueuse contenant l'ADN et une phase chloroformique contenant les lipides. Les protéines se trouvant précipitées à l'interface de deux phases.

Précipitation

Ensuite afin de récupérer l'ADN après séparation des deux phases, on réalise une précipitation de l'ADN contenu dans la phase aqueuse en augmentant la force ionique et en ajoutant de l'alcool (éthanol), hydrosoluble.

Lavage à l'éthanol 70%

Ce lavage permet l'élimination des sels ayant précipité lors de l'opération précédente.

Redissolution de l'ADN dans le TE.

A l'aide de TE 1X, on suspend alors les molécules d'ADN obtenues.

I.3.b. Mode opératoire

Extraction de l'ADN

1. Broyer environ 150 mg de tissu dans un mélange de 600 μ L de tampon CTAB et 1.2 μ L de Mercapto-éthanol (agent antioxydant permettant de maintenir la protéase sous une forme active).

Remarque : pour des fragments d'ailerons séchés, laisser le morceau se réhydrater dans l'eau pendant une nuit entière.

2. Ajouter 20 μ L de protéinase K (10mg/mL), agiter manuellement et incubé 30 min à 60°C.

Remarque : pour des extraits d'ailerons, laisser incubé pendant plus d'une heure.

Élimination des protides et des lipides

3. Ajouter 600 μ L de chloroforme/Isoamylol (24/1)

Agiter manuellement pendant 2 min.

Centrifuger 10 min à 14000 rotation par minute (rpm).

Prélever la phase aqueuse contenant l'ADN et l'introduire dans un microtube.

4. Répéter l'opération une seconde fois et répartir le surnageant (2 fois 300 μ L) dans deux microtubes.

Précipitation de l'ADN

5. Précipiter l'ADN contenu dans le volume V1 de chacun de deux microtubes (~ 300 μ L) avec V1/10 de NaOAc(~30 μ L) et 2 (V1+V1/10) d'éthanol 100°(~660 μ L).
6. Après avoir agité manuellement pendant 1 à 2 minutes, centrifuger les deux microtubes 10 min à 15000g.

Lavage à l'alcool

7. Vider le surnageant, ajouter 600 μ L d'éthanol 70° puis centrifuger 15 min à 15000g.

Redissolution de l'ADN

8. Vider le surnageant et sécher le culot au speed Vac,
Ajouter 100 μ L de TE 1x et solubiliser l'ADN à l'aide de la pipette.
Réunir le contenu des deux microtubes en un seul microtube (200 μ L).

I.3.c. Vérification de la pureté de l'ADN et calcul de la quantité d'ADN

L'extraction d'ADN étant réalisée à partir d'un échantillon initial de cartilage séché, malgré la participation d'une protéinase, il est possible de ne pas obtenir finalement un échantillon parfaitement pur, qui serait alors contaminé par la présence de protéines résiduelles. Afin d'éviter tout risque de contamination, une vérification de la pureté de chaque extrait se fait par spectrométrie. Sachant que le maximum d'absorption est enregistré à 257 nm pour l'ADN et à 280 nm pour les protéines, on trace le spectre d'absorption de nos extraits entre 200 et 300 nm. On dresse ensuite le rapport $DO\ 257/DO\ 280$ (DO : densité optique), qui doit être supérieur à **1.8** pour un échantillon considéré comme pur. Connaissant les facteurs de dilution et les DO, une quantification de l'ADN contenu par tube peut-être également évalué. Pour cela, il faut savoir qu'une absorbance de 20 DO à 257 nm correspond à une concentration de 1 mg/mL d'ADN double brin. Ainsi la concentration d'ADN dans notre échantillon est donnée par le calcul théorique :

$$(Do\ 260nm \times 50\ (\text{facteur de dilution}))/20 = \text{concentration d'ADN en mg/mL}$$

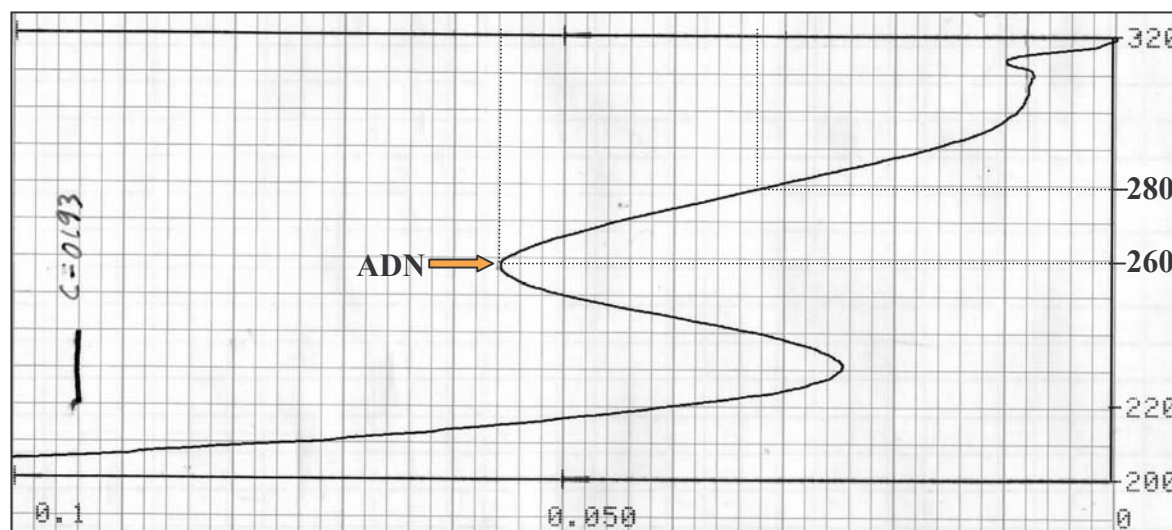


Figure 13. Spectre d'absorbance d'un extrait d'ADN total. La courbe obtenue est sigmoïde avec les deux pics inversés caractéristiques. Le pic d'absorbance à 260 nm est proportionnel à la quantité d'ADN.

Protocole : dans deux cuves en quartz, mettre 1 ml de TE pour la cuve témoin et 980 ml avec 20 mL de notre ADN extrait dissous dans l'autre cuve. Puis on réalise un spectre de cette solution entre 300 et 200nm.

4. Amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

I.4.a.Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode d'amplification directe et spécifique d'une séquence d'ADN comprise entre deux zones s'hybridant chacune avec une des amorces choisies. L'amplification de cet ADN est assurée par la répétition d'un cycle comprenant la **dénaturation** de l'ADN, l'**hybridation des amorces** et l'**élongation** à partir des amorces par l'ADN polymérase thermorésistante. Cette réaction nous permet d'obtenir une grande quantité du fragment d'ADN dont les extrémités sont délimitées par les deux amorces.

I.4.b.Mode opératoire

Pour nos PCR nous utilisons un kit à « microbilles » (« Ready to go », Amershan Pharmacia Biotech). Ce kit est composé de tube à PCR contenant une microbille. Cette microbille contient pour un volume final de 25 μL : 1.5 U de Taq DNA Polymérase, 10mM de Tris HCl pH9, 50mM de MgCl_2 et de 200 $\mu\text{mol/L}$ de dNTP. Ainsi avec ce kit le mode opératoire pour la PCR est particulièrement simplifié.

Prendre un tube à PCR avec microbille et y ajouter :

ADN	2 μL
Amorce 1	2 μL
Amorce 2	2 μL
Eau ultra pure	19 μL

	25 μL

Une fois le mélange réalisé on effectue une centrifugation rapide afin que tout le contenu du tube se trouve bien au fond de ce dernier. Ensuite on place les tubes sur le thermocycleur et on lance le programme. Le programme d'amplification utilisé pour amplifier l'ADN mitochondrial 16S (16S604C) est le suivant :

1 cycles : 3 min à 94°C, 1 min à 60°C, 3 min à 72°C
10 cycles : 1 min à 94°C, 1 min à 60°C, 3 min à 72°C
10 cycles : 1 min à 94°C, 1 min à 60°C, 4 min à 72°C
20 cycles : 1 min à 94°C, 1 min à 60°C, 5 min à 72°C
1 cycle : 10 min à 72°C, 24 heures à 4°C

Le programme d'amplification utilisé pour amplifier l'ADN mitochondrial Cytochrome B (CYTB5240C) est exactement le même, sauf que la Tm est de 52°C au lieu de 60°C.

Remarque : L'augmentation du temps d'élongation permet de tenir compte de l'augmentation de nombre de fragment d'ADN à amplifier, ainsi que de la diminution de l'activité de la Taq polymérase. Les 24 dernières heures à 4°C permettent de conserver les produits de la PCR jusqu'au retour du laborantin.

I.4.c. Amorces utilisées

Les amorces utilisées pour amplifier le fragment 16S ont été mises au point par Daniel SELLOS et Samuel IGLESIAS pour une étude phylogénétique consacrée aux requins de profondeur. Elles ont été choisies à partir de l'alignement de séquences de poissons cartilagineux accessibles sur GenBank. Ce sont des amorces universelles qui fonctionnent jusqu'à maintenant sur tous les requins analysés. L'intérêt de réutiliser ces amorces était de mettre en évidence leur universalité pour tout le groupe des Carcarhiniformes, voire des Lamniformes. En outre, l'utilisation de ces amorces est bien maîtrisée au sein de l'équipe de recherche. Nous avons donc utilisé les amorces suivantes :

Sha 5 (sens): 5' AGG CAA GTC GTA ACA TGG TAAG 3'

Sharuni (reverse): 5' ATC CAA CAT CGA GGT CGT AAA CC 3'

En revanche les amorces utilisées, pour amplifier le fragment Cytochrome b, sont à la fois le résultat de l'alignement de la vingtaine de séquences Cytochrome b de requin sur GenBank et d'une synthèse bibliographique. Elles sont, elles aussi, universelles et peuvent être utilisées sur l'ensemble des requins. Nous avons donc utilisé :

CytB1 (sens): 5' TGA TGA AAY TTY GGY TCA CTY YT 3'

CB6H (reverse): 5' CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAY TT 3'

Une fois la PCR terminée, afin de vérifier que notre ADN a été amplifié, on réalise une électrophorèse en gel d'agarose de 1,2%. La présence d'un marqueur de taille nous permettra également de vérifier la taille du fragment amplifié.

5. Migration sur gel : électrophorèse

I.5.a.Principe

L'électrophorèse sur gel est une technique d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées, sous l'action d'un champ électrique (entre anode et cathode). Les molécules d'ADN, chargées négativement à pH neutre, migrent alors vers l'anode et leur vitesse est inversement proportionnelle à leur taille. Pour un temps donné, les plus petits fragments ont tendance à migrer plus vite et donc plus loin. Les molécules d'ADN plus petites migrent plus facilement à travers le gel.

On utilisera cette technique pour plusieurs applications. Elle nous permettra d'abord de vérifier l'efficacité de l'amplification par PCR, de déterminer la taille du fragment amplifié puis de le quantifier et enfin d'isoler ce fragment d'ADN. Dans toute électrophorèse, des marqueurs de poids moléculaire sont déposés et migrent parallèlement à l'ADN étudié. L'ADN est repéré par fluorescence aux UV après avoir été mis en contact avec du bromure d'éthidium (BET). En comparant l'emplacement de l'ADN avec celui des marqueurs, le poids moléculaire de l'ADN étudié peut être estimé. De même, connaissant la quantité de marqueur utilisé, on peut approximativement évaluer la quantité d'ADN. On dit alors que c'est une méthode semi-quantitative.

I.5.b.Mode opératoire

Préparation du gel d'agarose à 1,2%

1. Mélanger dans un Erlenmeyer : 1,2g d'agarose
2 mL de TAE 50X
QSP 100mL d'eau pure
2. Faire fondre l'agarose au micro-onde jusqu'à la transpiration du milieu
3. Refroidir le mélange jusqu'à environ 50°C(préhensible à main nue)
4. Ajouter 3 µL de Bromure d'Ethidium à 10 mg/mL.

Remarque : le BET a la propriété de s'intercaler entre les bases azotées de l'ADN et d'émettre une fluorescence dans l'ultraviolet. C'est un produit sensible à la chaleur mais très cancérigène.

5. Après avoir préparé le moule et placé les peignes, couler le gel.
6. Laisser le gel durcir et enlever les peignes.
7. Puis submerger le gel avec le tampon d'électrophorèse (TAE 1X)

Préparation et réalisation des dépôts

1. Déposer une goutte de 5 μ L de colorant bleu sur un film de paraffine posé à plat sur la paillasse
2. Pipeter 15 μ L de produit de PCR et mélanger le de manière homogène avec le colorant bleu.
3. Introduire ensuite du mélange dans un des puits du gel et 15 μ L du marqueur dans un autre puit.
4. Brancher le circuit, régler le voltage sur 110 Volts et laisser migrer en surveillant la marge de migration pendant 1h30 à 2h.
5. Après migration le gel est observé et photographié sous ultraviolet.

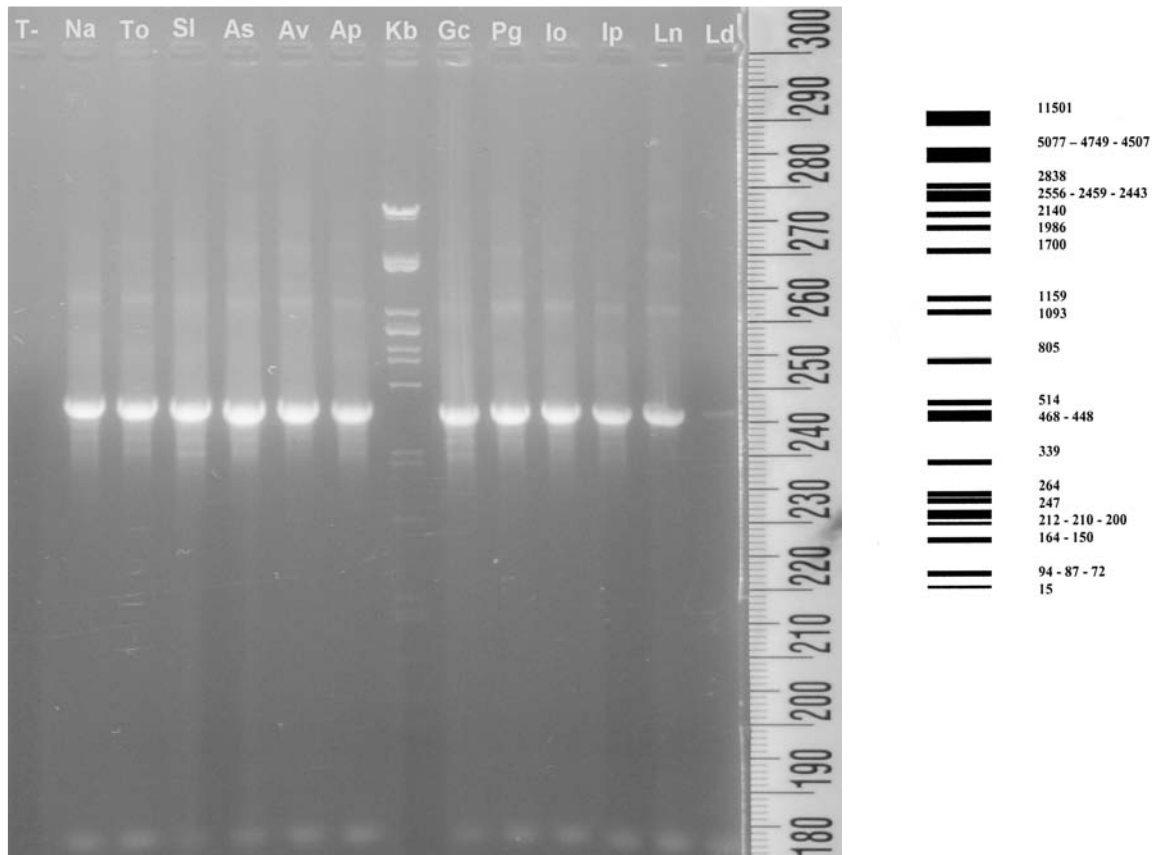


Figure 14. Sur ce gel d'agarose, on a fait migrer des fragments de PCR obtenus après amplification spécifique de 1500 pbs du gène codant pour l'ARNr 16S. L'ADN matrice est celui de différents requins ; Na : Negaprion acutidens, To : Triaenodon obesus, Sl : Sphyrna lewini, As : Alopias superciliosus, Av : Alopias vulpinus, Ap : Alopias pelagicus, Gc : Galeocerdo cuvier, Pg : Prionace glauca, Io :Isurus oxyrinchus, Ip : Isurus paucus, Ln : Lamna nasus, Ld : Lamna ditropis. La colonne T- correspond au témoin négatif et Kb au marqueur de taille dont la taille de chaque bande est indiquée sur le schéma ci-contre.

6. Extraction de l'ADN du gel d'électrophorèse (Kit QIAquick)

I.6.a.Principe

Le principe de ce kit QIAquick commercialisé par Qiagen est que dans un milieu de forces ioniques élevées et à un pH optimum (pH=7.5), l'ADN se fixe à une membrane composée de fibres de silice par liaison hydrogène. Après plusieurs lavages, l'élution de l'ADN est provoquée par une diminution de la force ionique et une modification du pH (pH=8). L'ADN est alors récupéré dans un ultime microtube.

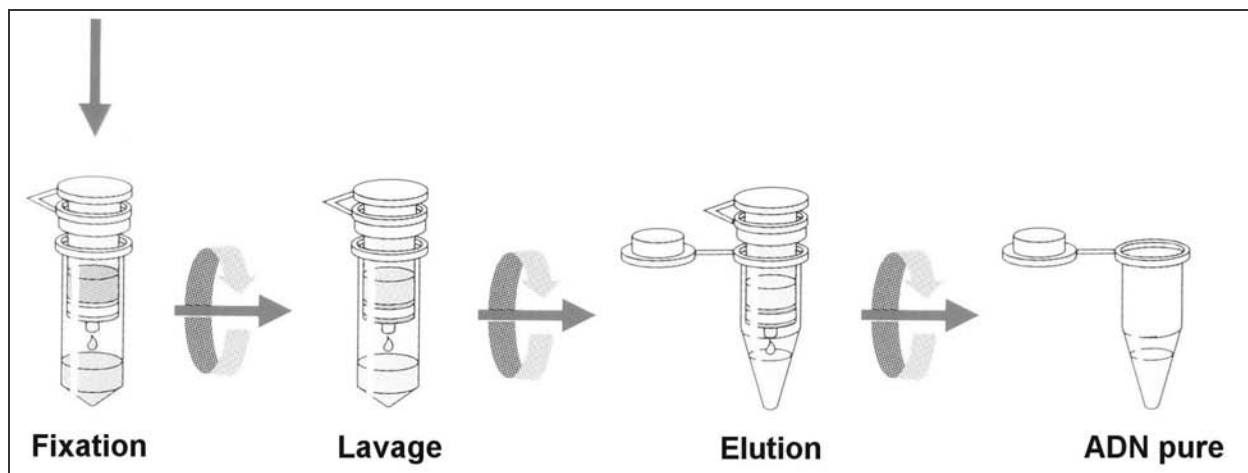


Figure 15. Schéma protocolaire du kit QIAquick

I.6.b.Mode opératoire

Découpage et dissolution du gel

- 1 Découper avec une lame de scalpel propre le fragment de gel (150 à 200 mg) contenant la bande d'ADN obtenue après migration, puis la placer dans un microtube.
- 2 Ajouter 600µL de tampon QG.
- 3 Laisser 10min à 50°C, jusqu'à dissolution complète du fragment de gel.

Fixation de l'ADN

- 4 Vérifier le pH de la solution grâce à l'indicateur coloré, jaune pour un pH optimum s'il y a un problème ajuster le pH en additionnant 10 µL d'acétate de sodium 3M à pH=5.
- 5 Ajouter 200 µL d'Isopropanol et mélanger.
- 6 Placer une mini colonne dans son tube-support de 2 mL et y introduire 400 µL du mélange précédant dans la mini colonne puis centrifuger pendant 25 secondes. Vider le culot dans l'évier puis recommencer avec les 400 µL restant.

Lavage

- 7 Introduire 660 μL de tampon PE dans la mini colonne pour la laver, centrifuger pendant 25 secondes, vider le culot et le centrifuger à vide pendant 25 secondes.

Elution de l'ADN

- 8 Placer la mini colonne dans un tube Eppendorf propre
- 9 Ajouter goutte à goutte et bien au milieu du filtre, 40 μL de EB 1/10 pour éluer l'ADN et centrifuger 25 secondes, (reproduire cette étape une deuxième fois.)

7. Le séquençage

I.7.a.Principe

Le principe de la réaction de séquençage est la même que celle de la PCR sauf que l'on ajoute aux dNTP des didésoxynucléotides triphosphate (ddNTP). L'incorporation de ddNTP dépourvus de groupements 3' hydroxyle, lors d'une réaction d'élongation à partir de l'ADN simple brin, bloque la synthèse d'ADN en empêchant la liaison avec le triphosphate suivant. Lors de la réaction de séquençage, la polymérase peut incorporer soit un nucléotide « normal », dans ce cas la réaction continue, soit un nucléotide modifié auquel cas la réaction est arrêtée. La probabilité d'incorporer un nucléotide modifié fait qu'en fin de réaction, en complémentarité de chaque nucléotide spécifique du brin de matrice, on aura eu l'incorporation d'un ddNTP. Chaque ddNTP est coloré par fluorescence selon sa nature. Ainsi les guanines sont jaunes, les thymines sont rouges, les cytosines sont bleues et les arginines sont vertes.

I.7.b.Mode opératoire

Pour nos réactions de séquences nous utilisons un kit « ABI Prism Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Kit » commercialisé par Applied Biosystems® et qui incorpore la Taq polymérase, les dNTP, les ddNTP et le tampon. Nous préparons soigneusement nos réactions dans des microtubes en y ajoutant :

ADN	5 μL
Amorce (1%)	3,2 μL
Mixe	2 μL
Eau ultra pure	3,8 μL
Tampon	6 μL

	25 μL

Les séquences obtenues ont une taille moyenne de 500 à 550 paires de bases. Pour séquencer, un fragment en entier on utilise trois amorces pour le 16S et deux amorces pour le Cytochrome b. La place et la nature des amorces utilisées sont résumées dans la figure 15.

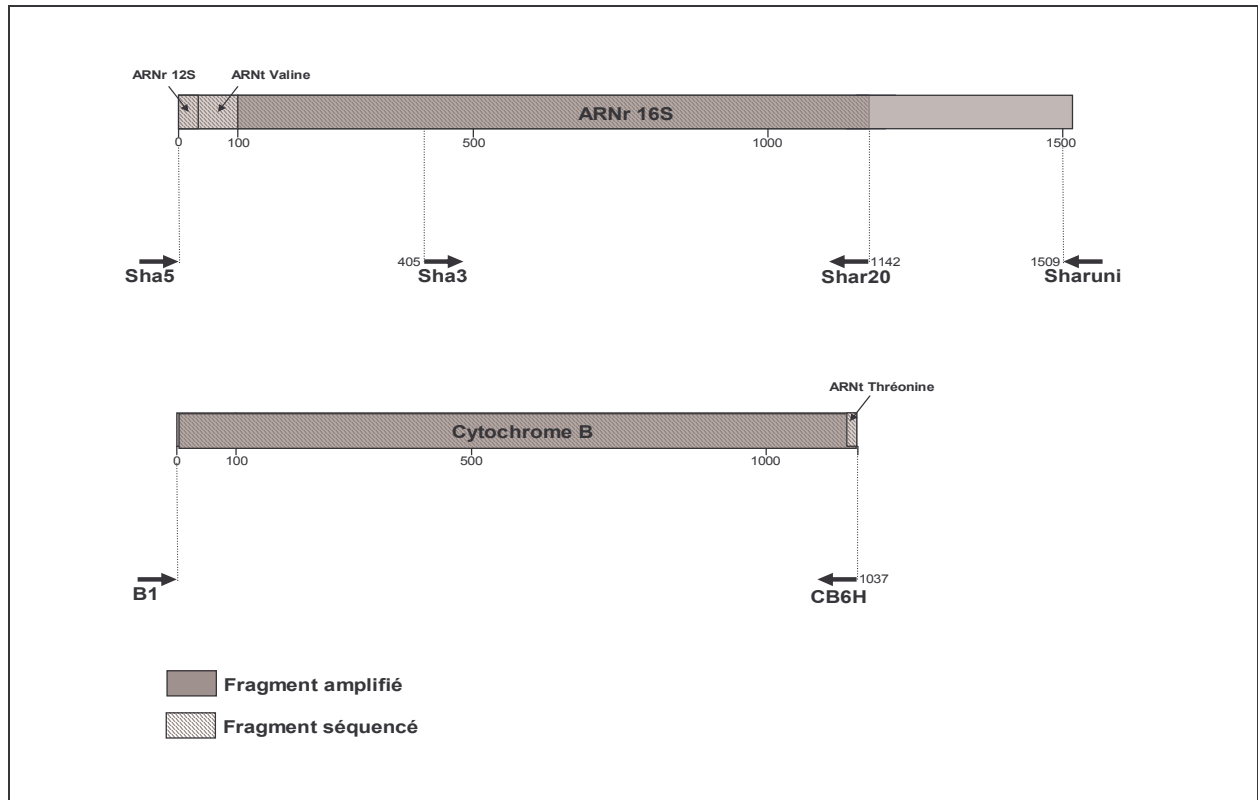


Figure 16. Emplacement des amorces utilisées pour le séquençage à partir des fragments amplifiés. Pour le 16S, les trois amorces utilisées sont Sha5, Sha3, Shar20. Pour le Cytochrome b on utilisera que deux amorces : B1 et CB6H.

Les séquences des amorces Sha3 et Shar20 sont les suivantes :

Sha3 (sens): 5' TCT CTG TGG CAA AAG AGT GG 3'

Shar20 (reverse): 5' TAG AGA CAG TTA AAC TCT CGT 3'

Une fois le mélange réalisé on effectue une centrifugation rapide afin que tout le contenu du tube se trouve bien au fond. Ensuite on place les tubes dans le thermocycleur et on lance le programme suivant (SEQ 40C) :

40 cycles : 30sec à 96°C, 30 sec à 50°C, 4 min à 60°C

I.7.c.Précipitation

Une étape préliminaire est à respecter avant de lire les résultats de la réaction avec le séquenceur automatique : c'est la précipitation de l'ADN. Elle se compose de 3 étapes :

Précipitation de l'ADN

1. Précipiter l'ADN contenu dans le microtube avec 62 μL d'éthanol absolu et 20 μL d'eau pure.
2. Après agiter manuellement et centrifuger pendant 45 min à 40000 tours/min.

Lavage à l'alcool

3. Vider le surnageant, ajouter 200 μL d'éthanol 70° puis centrifuger 30 min à 40000 tours/min.
4. Répéter la même opération.

Redissolution de l'ADN

5. Vider le surnageant et sécher le culot au speed Vac,
Ajouter 15 μL de Formamide et solubiliser l'ADN à l'aide de la pipette.

I.7.d.Electrophorèse et lecture

L'électrophorèse et sa lecture sont faites automatiquement sur un séquenceur automatique monocapillaire 310 de chez Applied Biosystems®. Un courant est appliqué à travers un microcapillaire, rempli de gel polyacrylamide, qui trempe directement dans la solution de 15 μL d'ADN. Les fragments de toutes tailles migrent dans le capillaire en fonction de leur charge et de leur poids. Une fois l'électrophorèse terminée, on obtient un gradient croissant de fragments dans le microcapillaire. Le capillaire est ensuite progressivement vidé et les fragments passent une fenêtre translucide où ils émettent, en fonction de leur taille, une couleur fluorescente. Chaque couleur et intensité de couleur sont lues par un laser placé en face de la fenêtre qui retransmet en temps réel le chromatogramme obtenu. A la fin de la lecture, le séquenceur est connecté à un PC qui interprète directement le chromatogramme en une séquence nucléotidique. Au bout de 3 heures de traitement de l'échantillon, le manipulateur repart avec un fichier informatique contenant le chromatogramme et la séquence correspondante.

II. Résultats

1. Vérification de la conservation de la molécule d'ADN suite au traitement

Dans un premier temps, il a fallu prouver la faisabilité de notre étude en vérifiant que l'ADN contenu dans un aileron transformé n'avait pas subi de dénaturation et pouvait toujours être exploité. Pour cela, nous avons récupéré un aileron en vente dans le commerce chez les frères TANG à Paris. D'un poids total de 35g, cet aileron est d'origine thaïlandaise et se situe dans la moyenne gamme en ce qui concerne la qualité et son prix. Le produit se présente sous la forme d'un trapèze constitué de fibres translucides et de couleur jaune clair. Cet aspect en « choucroute séchée » nous permet d'en déduire que l'aileron a subi un cycle complet de transformation pour ne garder que les rayons fibreux de l'aileron. Pour maximiser les chances de trouver de l'ADN, nous avons séparé deux prélèvements sur le produit : d'un côté, des petites fibres translucides et de l'autre une formation croûteuse jaune orangé. Les deux prélèvements ont été traités en même temps mais séparément. Suivant le protocole classique, nous avons extrait l'ADN, amplifié puis fait migrer le produit de la PCR sur gel d'agarose.

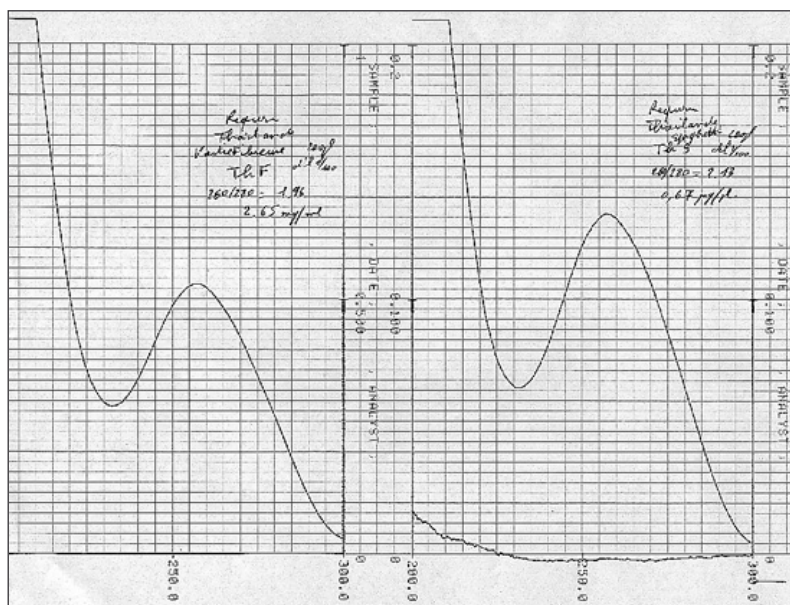


Figure 18. Spectres d'absorbance des deux échantillons suite à l'extraction des tissus : croûtes jaunes (Cj) à gauche et fibres translucides (Ft) à droite. Selon le mode de calcul défini dans le matériel et méthode l'échantillon Cj est à une concentration de 2,65 mg/mL et Ct à 0,67 mg/mL.

A l'image des deux spectres présentés ci-dessus (Figure 17), l'ADN est présent en quantité suffisante dans l'aïeron. En outre, le profil sigmoïde du tracé exclu la présence de produits « polluants » ou néfastes à l'exploitation de l'ADN. La qualité et l'exploitabilité du matériel génétique ont été confirmées sur gel suite à l'amplification par PCR du fragment 16S en utilisant les amorces Sha5 et Sha runi. On obtient alors des fragments d'environ 1500 pbs pour les deux prélèvements.

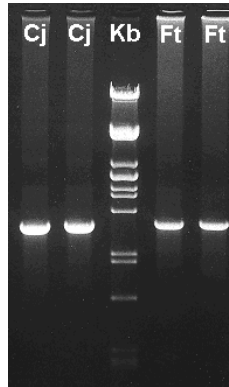


Figure 19. Photo du gel d'agarose suite à la migration des fragments amplifiés du 16S de 1500 pbs (Cj : croûte jaune, Ft : fibres translucides, Kb : marqueur de tailles).

En conclusion, même après de multiples étapes de transformation (cuisson, séchage...), l'ADN contenu dans un aïeron n'est pas détérioré et peut être encore utilisé pour analyse. C'est une étape importante de l'expérimentation car dans le cas contraire l'utilisation de l'ADN comme traceur d'espèce n'aurait pu être envisagé.

2. Conception de la banque de référence

La banque de référence regroupe l'ensemble des séquences 16S des requins choisis comme références. Elle servira à identifier, par analyse comparative, l'espèce d'un aïeron d'origine inconnue. Pour créer une telle banque, il a d'abord été nécessaire de choisir les tissus qui serviront de référence pour chaque espèce dans la banque de tissus obtenue à la suite des trois campagnes de prospection. Plusieurs critères ont été pris en compte pour choisir les fragments de chair parmi environ 200 tissus collectés. Nous avons d'abord préféré, en priorité, les individus prélevés, fixés et conservés entiers en collection officielle comme, par exemple, au Muséum national d'Histoire Naturelle. Comme il a été vu précédemment, la notion d'espèce est ambiguë et peut évoluer.

Tableau 1. Banque de référence : groupe de 28 espèces de requins concernées par le commerce des ailerons associés à deux requins bleus supplémentaires pour l'analyse de la variabilité intraspécifique (II.4.). Chaque espèce est associée aux informations principales de prélèvement, de séquençage, de numérotation et de taxonomie.

	Nom commun	N° de collection	N° banque	Code manipulation	Sexe	Taille(cm)	Localité	Collecteur	Longueur séquence (pbs) 16S
Orectolobiformes									
Rhincodontidae									
<i>Rhincodon typus</i>	Requin baleine	non catalogué	Ba1	Rt	?	?	Taiwan	P. Lee	1142
Lamniformes									
Odontaspidae									
<i>Odontaspis ferox</i>	Requin féroce	MNHN 2003-1991	NC38	Of	M	315	Nouvelle-Calédonie	S. Iglésias	1134
<i>Carcharias taurus</i>	Requin taureau	non catalogué	O9	Ct	F	?	Océanopolis, France	C.Caraguel	1138
Alopiidae									
<i>Alopias pelagicus</i>	Requin renard pélagique	non catalogué	T034	Ap	F	?	Taiwan	C.Caraguel	1138
<i>Alopias superciliosus</i>	Requin renard à gros yeux	non catalogué	T021	As	F	?	Taiwan	C.Caraguel	1136
<i>Alopias vulpinus</i>	Requin renard	MNHN 2003-2008	BPS0138	Av1	F	156	Sud Bretagne	C.Caraguel	1143
Cetorhinidae									
<i>Cetorhinus maximus</i>	Requin Pélerin	non catalogué		Cm			France	S. Iglésias	1133
Lamnidae									
<i>Isurus oxyrinchus</i>	Requin mako	non catalogué	S473	lo	F	175	Atlantique Nord	S. Iglésias	1138
<i>Isurus paucus</i>	Requin petit taupe	HUMZ 133183	7Jp	lp	F	121	Hawaï	S. Iglésias	1143
<i>Lamna nasus</i>	Requin taupe commun	non catalogué	S462	Ln	F	265	Atlantique Nord	S. Iglésias	1140
Carcharhiniformes									
Sphyrnidae									
<i>Sphyrma lewini</i>	Requin marteau halicorne	non catalogué	T033	Sl	M	?	Taiwan	C.Caraguel	1138
<i>Sphyrma zygaena</i>	Requin marteau commun	non catalogué	T007	Sz	M	?	Taiwan	C.Caraguel	1140
Carcharhinidae									
Carcharhinus									
<i>Carcharhinus albimarginatus</i>	Requin pointes blanches de récifs	non catalogué	NCC038	C1			Nouvelle-Calédonie	C.Caraguel	1138
<i>Carcharhinus amblyrhynchos</i>	Requin gris de récif	MNHN 2002-1183	NC 012	C2	M	87	Nouvelle-Calédonie	S. Iglésias	1139
<i>Carcharhinus brevipinna</i>	Requin tisserand	MNHN	NC 130	C3	F	84	Nouvelle-Calédonie	S. Iglésias	1139
<i>Carcharhinus falciformis</i>	Requin soyeux	HUMZ 133174	8Jp	C4	M	131	Hawaï	S. Iglésias	1140
<i>Carcharhinus leucas</i>	Requin bouledogue	non catalogué	Al2	C5	?	?	Hong Kong	S. Clarke	1139
<i>Carcharhinus limbatus</i>	Requin bordé	non catalogué	NCC001	C6	M	80	Nouvelle-Calédonie	C.Caraguel	1138
<i>Carcharhinus longimanus</i>	Requin pointes blanches du large	non catalogué	ncc050	C7			Nouvelle-Calédonie	G.Bertrand	1138
<i>Carcharhinus melanopterus</i>	Requin pointes noires	MNHN 2002-1203	NC 036	C8	M	64,6	Nouvelle-Calédonie	S. Iglésias	1138
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Requin gris	MNHN 2002-1175	NC 002	C9	M	170,8	Nouvelle-Calédonie	S. Iglésias	1142
<i>Carcharhinus sorrah</i>	Requin tacheté	non catalogué	NCC008	C10			Nouvelle-Calédonie	C.Caraguel	1139
<i>Carcharhinus obscurus</i>	Requin sombre	HUMZ 185257		C11			Japon	S. Isuke	1139
<i>Carcharhinus galapensis</i>	Requin des Galapagos	non catalogué		C12	F	90	Nouvelle-Zélande	B.Sérét	1139
Galeocerdo									
<i>Galeocerdo cuvier</i>	Requin tigre	non catalogué	T006	Gc	?	?	Taiwan	C.Caraguel	1136
Negaprion									
<i>Negaprion acutidens</i>	Requin limon faucille	MNHN 2002-1201	NC	Na	F	70,4	Nouvelle-Calédonie	S. Iglésias	1138
Triaenodon									
<i>Triaenodon obesus</i>	Requin corail	non catalogué	NCC013	To	F	120	Nouvelle-Calédonie	C.Caraguel	1138
Prionace									
<i>Prionace glauca</i>	Requin bleu	non catalogué	S464	Pg1	M	175	Sud Bretagne, France	S. Iglésias	1140
<i>Prionace glauca</i>	Requin bleu	non catalogué	T011	Pg2	M	?	Taiwan	C.Caraguel	1140
<i>Prionace glauca</i>	Requin bleu	non catalogué	NCC003	Pg3	F	193	Nouvelle-Calédonie	G.Bertrand	1140

La description d'une espèce peut changer et il arrive souvent qu'il y ait de nouvelles nomenclatures ou des mises en synonymie de deux espèces. Ainsi en cas de doute sur l'identité d'un individu, une vérification peut être réalisée sur le matériel de départ à savoir l'animal entier. Ensuite, nous avons choisi les prélèvements dont l'identification est certaine, c'est-à-dire les prélèvements effectués par notre équipe, puis en dernier recours nous nous sommes procurés des échantillons par l'intermédiaire d'un réseau de connaissances scientifiques. On a ainsi pu sélectionner, à partir de notre banque de tissu, 28 espèces parmi les 55 espèces exploitées pour leurs ailerons. Sont incluses dans ces 28 références, les espèces les plus exploitées et les plus fréquentes. En outre, cette banque n'est pas exhaustive et peut être complétée et alimentée par les campagnes à venir pour atteindre les 55 espèces cibles. La liste complète des espèces de référence séquencées figure dans le tableau 1 et les séquences complètes pour chaque espèce sont présentées en annexes.

L'obtention des séquences de référence a été faite selon le protocole classique décrit en détail dans le matériel et méthode. Pour chaque espèce, une extraction de tissu suivi d'un spectre d'absorbance a été réalisée. A partir de l'ADN obtenu, on a amplifié un fragment 16S de 1500 pbs par PCR en utilisant les amorces Sha5 et Sharuni. On a extrait ensuite l'ADN amplifié après migration sur le gel d'agarose et on a procédé à la réaction de séquençage en utilisant comme amorce soit Sha5, soit Shar20, soit Sha3. Le produit de la réaction, après précipitation, a été analysé par le séquenceur automatique. On obtient alors un chromatogramme interprétable sur 500 à 550 pbs en moyenne.

Chaque chromatogramme a été corrigé et une séquence de 1168 pbs (gaps compris) a été synthétisée pour chaque requin. Les 28 requins ont correctement été séquencés et chaque séquence a été vérifiée. La banque de séquences de référence est alors en place.

3. Analyse de la variabilité inter-spécifique

Après avoir constitué la banque de référence avec une séquence pour chaque espèce définie, la première analyse à mettre en œuvre est de vérifier le pouvoir discriminatif de notre marqueur d'espèce : le ribosome 16S. Cela revient à étudier la variabilité interspécifique c'est-à-dire les différences nucléotidiques entre nos espèces. Il faut en effet que les variations génétiques entre les espèces soient suffisamment importantes pour pouvoir les différencier. Suite à un alignement des 28 séquences sur le logiciel BioEdit®, nous avons reconstitué un diagramme illustrant la variabilité nucléotidique le long du fragment séquencé.

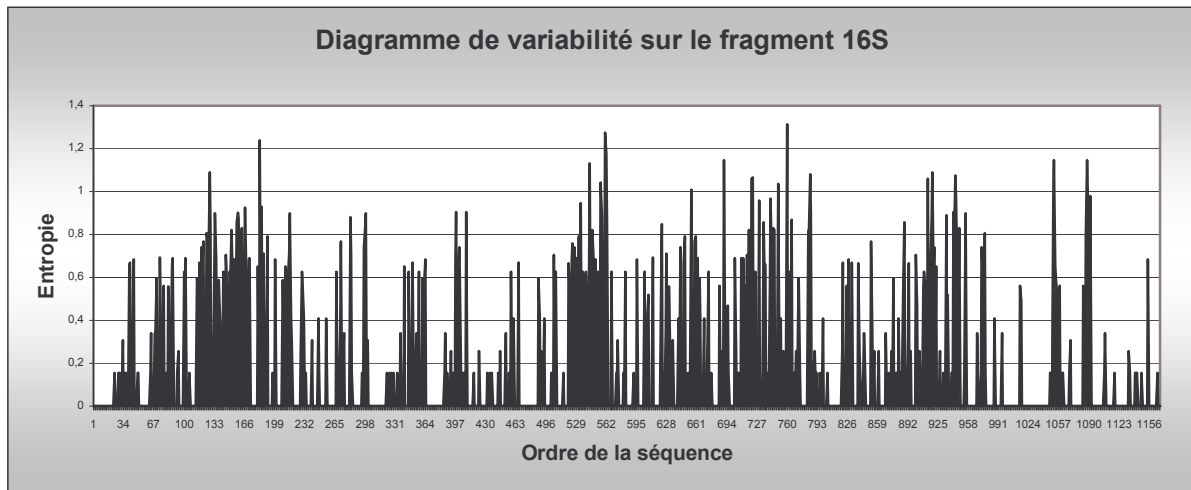


Figure 20. Diagramme de variabilité du fragment 16S. A partir de l'alignement des 28 séquences de la banque, le logiciel a estimé la valeur de l'entropie pour chaque site.

Pour chaque emplacement sur la séquence, le logiciel a défini une valeur de l'entropie. L'entropie exprime le désordre, elle permet de mettre en évidence le ou les changements d'une base mais aussi d'exprimer la proportion de changements sur un nucléotide donné. A titre d'exemple, si sur l'ensemble des séquences, une seule présente une variation sur un site donné alors la valeur de l'entropie sera faible car il y aura peu de désordre. A l'opposé, si sur une position, 12 séquences possèdent un A, 8 un T, 4 un C, 3 un G et la dernière un gap (absence de nucléotide); alors la valeur de l'entropie sera importante. Sur l'ensemble du diagramme, on remarque que ce désordre et donc la variabilité sont relativement homogènes sur les mille premières bases avec quelques régions bien conservées où l'entropie est à zéro. Les 200 dernières paires de bases sont beaucoup plus conservées avec cependant deux pics de variabilité. Le ribosome 16S présente donc une bonne répartition de la variabilité entre les 28 espèces de requins séquencés. Cette première approche de la variabilité de notre marqueur est d'ordre qualitatif.

Il est ensuite possible de chiffrer cette variabilité à l'aide d'une matrice d'identité. Toujours à partir du même alignement et du même logiciel, on peut créer une matrice de valeurs avec au croisement de deux espèces la proportion de nucléotides homologues entre les deux séquences correspondantes. A titre d'exemple, il y a 94,3% d'identité entre le requin marteau halicorne (*Sphyrna lewini*) et le requin marteau commun (*Sphyrna zygaena*).

Si l'on veut connaître le nombre de bases homologues entre deux séquences il suffit de multiplier le chiffre obtenu par 1168 qui est la taille des séquences alignées. Il y a ainsi 1102 paires de bases homologues ou 66 paires de bases différentes entre les deux requins marteaux de la banque. On observe en parcourant la matrice que les espèces éloignées ont un pourcentage d'identité plus faible que les espèces proches. Ainsi on remarque que le requin Baleine (*Rhynchodon typus*) membre des Orectolobiformes est le plus éloigné des autres requins et plus particulièrement de Petit taupe (*Isurus paucus*) puisqu'ils n'affichent que 80,3% d'identité.

A l'inverse, on s'étonne de voir 99,9% de nucléotides identiques entre le requin sombre (*Carcharhinus obscurus*) et le requin des Galapagos (*Carcharhinus galapensis*). Ce taux d'identité très élevé ne permet pas de distinguer génétiquement ces deux espèces qui ne diffèrent alors que sur un nucléotide. Pourtant ce sont deux espèces, décrites séparément par Le Sueur (1818) pour *Carcharhinus obscurus* et par Snodgrass & Heller (1905) pour *Carcharhinus galapensis*, et qui ont de fortes similitudes morphologiques mais qui se distinguent par un caractère majeur : la forme de la première nageoire dorsale (Garrick, 1982). Légèrement arrondie et basse chez *obscurus*, elle est de forme triangulaire, haute et bien dressé chez *galapensis*. L'identification de ces deux spécimens a été faite par des spécialistes mondiaux des requins et ne fait aucun doute. Néanmoins les deux requins ont été fixés et conservés en collection et pourront donc faire l'objet d'un contrôle quant à leur identité. Les séries et les dates d'analyses des tissus sont différentes et une vérification méthodique n'a pas permis d'envisager une erreur de manipulation. En outre, le nucléotide qui diverge a été réanalysé et exclu toute possibilité d'interchangement entre les prélèvements. Ces deux espèces, déjà très proches morphologiquement, sont homologues génétiquement sur le fragment 16S. Ne pouvant les différencier, nous considérons ces deux espèces comme un complexe d'espèces unique. Nous n'utiliserons donc pas les données de la matrice concernant *Carcharhinus galapensis* et nous grouperons les deux espèces sous la double nomination *Carcharhinus obscurus-galapensis* associée aux valeurs de *Carcharhinus obscurus*. En effet, la conservation d'une série de valeurs très proche d'une autre ne ferait que gonfler les indices d'identité.

Une fois ce rectificatif fait, il est possible de calculer des moyennes d'identité à l'intérieur d'un genre, d'une famille, d'un ordre ou sur l'ensemble de la banque. Cette moyenne correspond à la somme des valeurs à l'intérieur d'un groupe rapportée au nombre de valeurs additionnées. La valeur calculée pour le genre *Carcharhinus* est de 95,61% entre les 11 espèces de requins requiem présents dans la banque. C'est une valeur élevée, justifiée par la proximité de ces espèces dans la classification. En comparaison, les requins renard du genre *Alopias* ont une identité moyenne de 92,93%, ce qui paraît peu vu la ressemblance morphologique de ces trois espèces. L'ensemble des Carcharhiniformes de notre banque affiche une moyenne d'identité de 93,72%. Les individus considérés dans cette moyenne sont très proches phylogénétiquement et ne sont pas représentatifs de la globalité de cet ordre qui regroupe plus d'un tiers des espèces mondiales de requin. Cette moyenne n'a donc pas de réelle valeur. En revanche, la moyenne se rapportant aux Lamniformes est importante puisqu'elle comprend les pourcentages d'identité entre 9 des 15 espèces comprises dans l'ordre. Avec une valeur de 91,46%, la diversité sur le fragment 16S des Lamniformes permet une discrimination aisée des espèces considérées.

Enfin, la moyenne la plus importante, reflet de la diversité entre les espèces référencées, est la moyenne interspécifique totale à 88,81% d'identité. Le calcul de l'écart type n'est pas envisageable pour ces moyennes car nous n'avons pas une répartition normale des données. En outre, pour l'identification d'une séquence génétique, l'ordre et la place des variations sont des informations capitales et déterminantes. Deux espèces peuvent avoir le même taux de variation avec une troisième, cela ne veut pas dire qu'elles ont les mêmes séquences. Malheureusement cette notion d'ordre ne peut pas être chiffrée mais elle ne ferait que confirmer le pouvoir de discrimination du marqueur.

Les taux d'identité permettent de confirmer l'existence d'une variabilité génétique suffisamment importante entre les espèces de la banque pour les différencier. Le gène mitochondrial codant pour le ribosome 16S paraît, dans une première analyse, être un bon marqueur du polytypisme. Reste maintenant à vérifier si au sein d'une même espèce on ne trouve pas de différences génétiques plus importante qu'entre deux espèces proches. C'est ce qu'on appelle l'analyse de la variabilité intraspécifique.

Tableau 2: Matrice d'identité inter-spécifique : synthèse des analyses comparatives de séquences entre espèce. C alb : *Carcharhinus albimarginatus*, C am : *Carcharhinus amblyrhynchos*, C bre : *Carcharhinus brevipinna*, C fal : *Carcharhinus falciiformis*, C leu : *Carcharhinus leucas*, C lim : *Carcharhinus limbatus*, C lon : *Carcharhinus longimanus*, C mel : *Carcharhinus melanopterus*, C plu : *Carcharhinus plumbeus*, C sor : *Carcharhinus sorrah*, C gal : *Carcharhinus galapensis*, N acu : *Negaprion acutidens*, T obe : *Triaenodon obsesus*, S lew : *Sphyrna lewini*, S zyg : *Sphyrna zygaena*, P gla : *Prionace glauca*, G cu : *Galeocerdo cuvier*, A pel : *Alopias pelagicus*, A sup : *Alopias superciliosus*, A vul : *Alopias vulpinus*, I oxy : *Isurus oxyrinchus*, I pau : *Isurus paucus*, L nas : *Lamna nasus*, O fer : *Odontaspis ferox*, C tau : *Carcharias taurus*, C max : *Cetorhinus maximus*, R typ : *Rhincodon typus*.

	C alb	C am	C bre	C fal	C leu	C lim	C lon	C mel	C plu	C sor	C ob	C gal	N acu	T obe	S lew	S zyg	P gla	G cu	A pel	A sup	A vul	I oxy	I pau	L nas	O fer	C tau	C max	R typ
C alb	1	0,966	0,964	0,969	0,947	0,94	0,954	0,933	0,956	0,94	0,957	0,938	0,929	0,944	0,903	0,911	0,953	0,911	0,836	0,839	0,843	0,837	0,825	0,837	0,841	0,849	0,837	0,817
C am		1	0,971	0,974	0,955	0,949	0,97	0,942	0,96	0,952	0,971	0,972	0,935	0,945	0,91	0,917	0,96	0,919	0,839	0,844	0,843	0,842	0,83	0,838	0,847	0,844	0,842	0,825
C bre			1	0,973	0,964	0,963	0,977	0,948	0,965	0,957	0,98	0,981	0,935	0,956	0,913	0,917	0,961	0,921	0,841	0,848	0,852	0,846	0,834	0,842	0,851	0,852	0,848	0,82
C fal				1	0,954	0,95	0,967	0,941	0,964	0,95	0,969	0,97	0,931	0,946	0,907	0,912	0,961	0,914	0,839	0,846	0,848	0,844	0,831	0,842	0,85	0,85	0,845	0,82
C leu					1	0,946	0,962	0,93	0,956	0,945	0,964	0,964	0,925	0,943	0,892	0,9	0,944	0,9	0,832	0,838	0,839	0,834	0,822	0,834	0,847	0,844	0,838	0,81
C lim						1	0,954	0,95	0,944	0,941	0,958	0,958	0,919	0,945	0,906	0,904	0,939	0,914	0,836	0,851	0,847	0,847	0,839	0,847	0,851	0,847	0,847	0,817
C lon							1	0,942	0,965	0,961	0,985	0,986	0,942	0,952	0,907	0,915	0,921	0,921	0,84	0,848	0,851	0,846	0,834	0,842	0,847	0,85	0,847	0,823
C mel								1	0,943	0,929	0,945	0,946	0,92	0,936	0,903	0,902	0,934	0,905	0,835	0,842	0,851	0,849	0,838	0,845	0,841	0,852	0,851	0,815
C plu									1	0,954	0,96	0,961	0,934	0,95	0,905	0,909	0,949	0,915	0,841	0,851	0,856	0,843	0,831	0,844	0,849	0,847	0,848	0,815
C sor										1	0,96	0,961	0,928	0,941	0,9	0,9	0,943	0,913	0,831	0,845	0,845	0,842	0,83	0,841	0,844	0,841	0,84	0,815
C obs											1	0,969	0,938	0,956	0,911	0,922	0,968	0,922	0,841	0,849	0,848	0,849	0,834	0,843	0,849	0,852	0,847	0,82
C gal												1	0,939	0,956	0,912	0,923	0,939	0,923	0,842	0,846	0,848	0,85	0,834	0,842	0,85	0,853	0,848	0,821
N acu													1	0,922	0,901	0,913	0,928	0,914	0,84	0,847	0,848	0,845	0,835	0,849	0,841	0,847	0,84	0,818
T obe														1	0,916	0,91	0,939	0,907	0,85	0,856	0,857	0,847	0,837	0,847	0,856	0,857	0,857	0,822
S lew															1	0,943*	0,902	0,913	0,834	0,844	0,84	0,841	0,832	0,838	0,836	0,845	0,843	0,814
S zyg																1	0,917	0,922	0,842	0,849	0,849	0,84	0,835	0,843	0,847	0,854	0,845	0,815
P gla																	1	0,914	0,84	0,846	0,847	0,843	0,829	0,841	0,85	0,848	0,845	0,815
G cuv																		1	0,845	0,85	0,854	0,849	0,841	0,848	0,848	0,852	0,843	0,819
A pel																			1	0,927	0,929	0,895	0,891	0,897	0,922	0,91	0,912	0,813
A sup																				1	0,932	0,905	0,906	0,915	0,938	0,919	0,916	0,825
A vul																					1	0,891	0,896	0,902	0,932	0,906	0,907	0,826
I oxy																						1	0,961	0,942	0,9	0,915	0,922	0,809
I pau																							1	0,939	0,895	0,911	0,914	0,803
L nas																								1	0,913	0,915	0,918	0,818
O fer																									1	0,907	0,904	0,822
C tau																										1	0,923	0,821
C ma																											1	0,823
R typ																												1

Moyenne *Carcharhinus* = 95,61%

Moyenne *Carcharhinidae* = 93,72%

Moyenne *Alopias* = 92,93%

Moyenne *Lamniformes* = 91,46%

Moyenne interspécifique totale = 88,81%

4. Analyse de la variabilité intra-spécifique : comparaison de 2 marqueurs

Indissociable de l'analyse de la variabilité interspécifique, l'analyse de la variabilité intraspécifique est fondamentale pour valider l'utilisation du ribosome 16S comme marqueur d'espèce. Si la variabilité génétique au sein d'une espèce est trop importante il sera très difficile voire impossible d'identifier génétiquement une espèce. Cette étude ayant peu de moyens, nous avons focalisé cet examen sur une seule espèce cosmopolite : le Peau Bleu (*Prionace glauca*). C'est un requin pélagique commun, largement répandu sur l'ensemble des océans et dont l'identification ne laisse aucun doute. On admettra alors que les résultats obtenus pour cette espèce sont applicables aux autres. Nous avons sélectionné, dans notre banque de tissus, 3 requins provenant de zones distinctes pour mettre en évidence d'éventuelles différences entre populations. Le premier requin bleu (Pg1) a été capturé par un fileyeur près des côtes bretonnes pendant l'été 2000. Le second (Pg2) a été prélevé sur le port de pêche de Taitung à Taïwan en septembre 2002. Enfin le dernier Peau Bleu (Pg3) a été capturé par un palangrier au Nord Est de la Nouvelle Calédonie. Selon le protocole habituel, les trois requins ont été séquencés sur le fragment 16S d'une taille de 1140 paires de bases. Puis les séquences ont été alignées en utilisant le logiciel BioEdit®. On observe deux positions variables au niveau des nucléotides n°159 et n°988. Si on utilise Pg1 comme référence, la variabilité s'exprime par un nucléotide à la fois puis pour les deux entre Pg2 et Pg3, ce qui nous donne un pourcentage d'identité moyen chez *Prionace glauca* de 99,85%. Ce qui revient à dire que l'on observera une variation tous les 680 nucléotides. Il y a donc une variabilité intraspécifique très faible et acceptable entre les populations de requins bleus sur le marqueur 16S.

Tableau 3. Synthèse de la variabilité nucléotidique entre les séquences des trois requins Peau Bleu (*Prionace glauca*) sur le ribosome 16S et le Cytochrome b.

	Site de capture	Ribosome 16S (1140pbs)		Cytochrome b (1005pbs)
		N° 159	N°988	N°613
Pg1-S464	Atlantique Nord-est	T	C	C
Pg2-T011	Pacifique centre Ouest	C	C	T
Pg3-NC003	Pacifique Sud-ouest	T	T	C

Dans un deuxième temps, nous avons comparé le 16S avec le marqueur mitochondrial codant pour le Cytochrome b. En effet, le Cytochrome b est le gène le plus séquencé chez les requins et de nombreuses séquences sont accessibles sur internet. L'intérêt de cette

comparaison est de définir si le 16S est un meilleur ou un moins bon marqueur d'espèce que le Cytochrome b. A partir des mêmes extraits de tissus, nous avons amplifié puis séquencé un fragment de 1005 paires de bases à l'aide des amorces B1 et CB6H. L'alignement des trois séquences a révélé une variation sur le nucléotide n° 613. Au vu de ces résultats il est maintenant difficile de conclure. En effet, l'alignement des séquences Cytochrome b ne permet pas de dire si il y a une autre variation 680 nucléotides plus haut ou 680 nucléotides plus bas. On ne peut donc pas comparer ces deux marqueurs à partir de ces données. Nous sommes alors contraints de conclure par l'hypothèse nulle : le 16S et le Cytochrome b sont des marqueurs d'espèce de même qualité. Même si cette première étude annonce le ribosome 16S comme un excellent marqueur d'espèce, l'analyse de la variabilité intra-spécifique se confirmera à chaque identification d'aïlerson puisque nous comparerons la séquence de l'aïlerson avec sa séquence homologue en banque. Ainsi plus on analysera d'aïlersons plus on aura de données sur cette variabilité et ceci pour toutes les espèces.

5. Identification de la séquence d'un aïlerson inconnu

Une fois que l'on a séquencé le fragment 16S d'un aïlerson d'origine inconnue, il faut pour l'identifier le comparer aux séquences de la banque de référence. Afin de faciliter cette étape nous utiliserons l'algorithme **BLAST** disponible sur le logiciel BioEdit® ou sur internet. Le BLAST, pour « Basic Local Alignment Search Tool », est un mode de recherche comparative basée sur l'alignement des séquences.

Nous utilisons la version 2 élaborée par Altschul et al. (1997), qui prend en considération les gaps. Ce programme effectue une recherche rapide dans les banques de séquences nucléiques et protéiques combinée avec une estimation rigoureuse des statistiques pour apprécier la signification des similitudes. Dans notre étude, on utilisera le modèle **blastn** qui compare une séquence nucléique à notre banque de séquences nucléiques de référence. Les séquences extraites d'une recherche par Blast2 sont alignées et un

Query= 16S-Cj-Sha5 (665 letters)		Score	E
		(bits)	Value
Sphyrna zygaena	1168 bp	1203	0.0
Sphyrna lewini	1168 bp	872	0.0
Car galapensis	1168 bp	856	0.0
Car obscurus	1168 bp	848	0.0
Car amblyrhynchos	1168 bp	825	0.0
Negaprion acutidens	1168 bp	817	0.0
Car brevipinna	1168 bp	817	0.0
Prionace glauca	1168 bp	809	0.0
Galeocerdo cuvier	1168 bp	785	0.0
Car longimanus	1168 bp	779	0.0
Car falciformis	1168 bp	755	0.0
Car limbatus	1168 bp	753	0.0
Trienodon obesus	1168 bp	747	0.0
Car albimarginatus	1168 bp	745	0.0
Car plumbeus	1168 bp	735	0.0
Car sorrah	1168 bp	726	0.0
Car leucas	1168 bp	708	0.0
Car melanopterus	1168 bp	668	0.0
Alopias superciliosus	1168 bp	424	e-121
Carcharias taurus	1168 bp	420	e-120
Alopias vulpinus-DPS0138-16S	1168 bp	396	e-113
Odontaspis ferox	1168 bp	396	e-113
Rhincodon typus	1168 bp	381	e-108
Cetorhinus maximus	1168 bp	381	e-108
Lamna nasus	1168 bp	373	e-106
Isurus oxyrinchus	1168 bp	373	e-106
Isurus paucus	1168 bp	371	e-105
Alopias delagicus	1168 bp	369	e-104

profil statistique est construit. Le profil statistique rend compte du classement du comparatif avec des résultats chiffrés. Ainsi chaque espèce de banque y figure dans l'ordre décroissant des scores. Le score de chaque séquence, aussi appelé **MSP** (Maximal Segment Pair), est la traduction du degré maximal de similitude entre la séquence analysée et la séquence en banque. A chaque score d'une MSP est associé une valeur E (E value) qui est la probabilité d'obtenir au moins un score supérieur ou égal au MSP, par hasard ; autrement dit, la valeur E est la probabilité qu'il existe au moins un MSP, obtenu lors de la comparaison de deux séquences aléatoires (de même taille et composition que les séquences d'intérêt), dont le score soit supérieur ou égal au MSP obtenu avec les séquences réelles. Donc plus le score est faible moins il est dû au hasard.

```

>Sphyrna zygaena 1168 bp
  Length = 1140
Score = 1203 bits (607), Expect = 0.0
Identities = 628/631 (99%), Positives = 628/631 (99%), Gaps = 3/631 (0%)

aaacacctcccttacaccgaggagatacccggtgcaactcgggtcattttgaacctcaaag 93
|||||
aaacacctcccttacaccgaggagatacccggtgcaactcgggtcattttgaacctcaaag 105

ctagcctacacaccaactttaaccaaacctaaataatctaattaacattataatttcaa 153
|||||
ctagcctacacaccaactttaaccaaacctaaataatctaattaacattataatttcaa 165

ccaaaacattctcaaccttttagttagtggtgacagacaataaactccagcgcaatagctt 213
|||||
ccaaaacattctcaaccttttagttagtggtgacagacaataaactccagcgcaatagctt 225

atgtaccgcaagggaagctgaaaaagaaatgaaataaacattaaagtactaaaaagca 273
|||||
atgtaccgcaagggaagctgaaaaagaaatgaaataaacattaaagtactaaaaagca 285

gagattatactcgtaccttttgcatcatgatgtaactagaaaaattaggcaaaaagact 333
|||||
gagattatactcgtaccttttgcatcatgatgtaactagaaaaattaggcaaaaagact 345

ttaagtctacctccccgaaactaaacgagctactccgaagcagcattatagagctaacc 393
|||||
ttaagtctacctccccgaaactaaacgagctactccgaagcagcattatagagctaacc 405

gtctctgtggcaaaagagtgggaagacttccgagtagtggtgaaaagcctaccgagtta 453
|||||
gtctctgtggcaaaagagtgggaagacttccgagtagtggtgaaaagcctaccgagtta 465

gtgatagctggttaccacaaaaaagaacttcaattctgcattaattttaactacctaaa 513
|||||
gtgatagctggttaccacaaaaaagaacttcaattctgcattaattttaactacctaaa 525

caagacttcttagtcaaaggaactcataagaattaatagttatttagaagaggtacagcc 573
|||||
caagacttcttagtcaaaggaactcataagaattaatagttatttagaagaggtacagcc 585

cttctaacaagatacaactttttaagaatgggaaatgatcacaattatcaagggttac 633
|||||
cttctaacaagatacaactttttaagaatgggaaatgatcacaattatcaagggttac 643

tccctcagtgggcctnaaaagcagccacctg 664
|||||
tccctcagtgggcctnaaaagcagccacctg 673

```

Pour illustrer ce programme nous l'avons utilisé sur la séquence du fragment « croûte jaune » de l'aileron analysé au départ. Séquencé sur 665 nucléotides du fragment 16S avec Sha 5, le fragment a été comparé aux 28 espèces de la banque. Le meilleur score du comparatif (1203) est attribué à *Sphyrna zygaena*, le requin marteau commun, avec une valeur E de 0. Le deuxième score loin derrière à 872 (*Sphyrna lewini*), ne laisse que peu de doute sur l'identité de l'espèce analysée. L'aileron analysé provient bien d'un requin marteau commun. La deuxième partie des résultats de BLAST est l'ensemble des alignements deux

par deux entre la séquence analysée et les séquences de la banque. On peut alors noter le nombre de bases identiques et différentes ainsi que le nombre de gaps inclus par l'alignement. On remarque donc que, sur les 631 nucléotides alignés, 628 sont identiques ce qui nous donne 99% d'identité sur ce fragment.

Les trois nucléotides qui diffèrent sont des gaps résultant d'une mauvaise interprétation informatique du chromatogramme. Une fois corrigés, on obtient donc 100% d'identité entre l'aileron et *Sphyrna zygaena*. Cet alignement permet de vérifier à chaque fois les différences entre séquences et de valider ensuite une identification. En ce qui concerne la variabilité intraspécifique, on ne remarque aucune différence entre les deux séquences d'une même espèce. Cela peut vouloir dire deux choses : les deux requins faisaient partie d'une même population et/ou la variabilité intraspécifique pour cette espèce est très faible sur le 16S. Dans les deux cas, cette analyse confirme un peu plus les qualités du 16S comme marqueur d'espèce. Cette méthode est facile, rapide et efficace quand la séquence est référencée dans la banque, mais que faire lorsque l'espèce analysée a un score faible et qu'elle n'est donc pas répertoriée.

6. Cas d'une séquence inconnue en banque

Même si le BLAST est une technique élaborée et très efficace il arrive parfois qu'elle n'identifie pas distinctement l'espèce impliquée. C'est notamment le cas lorsque l'espèce testée ne figure pas dans la banque de référence. Dans ce cas, il est possible d'orienter notre analyse en replaçant la séquence obtenue dans un arbre phylogénétique. Un arbre phylogénétique est une figure arborescente qui retrace l'évolution des lignées. On peut alors schématiser un organigramme évolutif entre les espèces de notre banque et y replacer la séquence inconnue pour en identifier l'ordre, la famille voir le genre auquel elle appartient. Nous utiliserons la phylogénie comme un outil de classement rationnel entre les séquences nucléotidiques de la banque.

Ils existent trois grandes méthodes pour construire un arbre phylogénétique : **cladistique**, **phénétique** et **probabiliste** (ou maximum de vraisemblance). On optera pour la cladistique qui repose sur des relations de parenté en s'intéressant aux caractères dérivés partagés par les taxons ; plutôt que pour la phénétique qui étudie la parenté entre taxons en s'intéressant à leur degré de similarité.

Nous n'envisagerons pas dans cette étude la méthode du maximum de vraisemblance qui repose sur des théories probabilistes complexes. Pour retracer l'arbre phylogénétique cladistique ou cladogramme, on cherche à minimiser les homoplasies (similarités non héritées d'un ancêtre commun) en prenant l'hypothèse de reconstruction la plus simple, la plus parcimonieuse. C'est-à-dire que l'arbre que l'on construit doit comporter le plus petit nombre de changements évolutifs pour expliquer les différences observées entre les taxons étudiés. On

dit que l'arbre est élaboré sur le principe d'un **maximum de parcimonie**. Cette méthode admet deux notions : les caractères ou les sites étudiés évoluent indépendamment les uns des autres, la vitesse d'évolution est constante au cours du temps dans les lignées évolutives. Toutes les données ne sont pas forcément utilisées pour construire un arbre. On distingue alors les **sites variables** et les **sites informatifs**. Un site variable est par exemple un nucléotide qui présente au moins deux états dans l'alignement, il peut être informatif ou non. Un site variable devient informatif si au moins deux taxons ont la même base. Seuls les sites informatifs sont utilisés pour la reconstruction. On distingue plusieurs techniques pour construire un cladogramme. Lorsque le nombre de taxons est supérieur à 20, on utilise une recherche dite **heuristique**. Dans cette méthode un arbre initial est construit par la méthode de « Neighbor Joining » puis tous les arbres ayant une typologie similaire à cet arbre seront examinés. Parmi les arbres similaires, le plus court est recherché. Pour mettre en œuvre cette méthode, nous avons utilisé le logiciel WinClada® qui a d'abord transformé notre alignement de 28 séquences en une matrice puis a ensuite exécuté la recherche heuristique. A l'issue de l'analyse, six arbres dits fondamentaux de même longueur sont retenus. Pour résumer l'ensemble des informations contenues dans ce jeu d'arbres, un seul arbre dit arbre consensus est alors établi. Dans cet arbre consensus, les nœuds non résolus, c'est-à-dire pour lesquels il y a une contraction entre les différents arbres, donnent lieu à une représentation « en râteau ». Pour notre analyse, l'arbre consensus a donc neutralisé 4 nœuds non résolus.

Lorsqu'un arbre a été établi, quelle que soit la méthode utilisée, il faut tester sa validité. La procédure dite du « Bootstrap » est la plus utilisée. On établit alors un nouveau jeu de données à partir des données d'origines en réalisant un tirage aléatoire avec remise des sites, un même site pouvant être tiré plusieurs fois, jusqu'à ce que l'on obtienne la même nombre de site que dans le jeu initial. Ce rééchantillonnage est répété de 100 à 1000 fois, puis à partir de chaque jeu on établit un sous arbre. On compare ensuite la topologie de tous les sous arbre avec l'arbre consensus. L'arbre consensus sert alors de support aux valeurs du Bootstrap. A chacun de ses nœuds, la valeur du Bootstrap correspond alors au nombre de fois où l'on a retrouvé parmi les différents sous arbres ce même branchement. Les valeurs de Bootstrap sont exprimées en pourcentage. Si par exemple la valeur est de 95, cela signifie que 95% des arbres examinés comportaient ce nœud. Dans 5% des cas on avait un autre type de regroupement. Plus la valeur du Bootstrap est élevée plus la validité du nœud est grande. On dit alors que le nœud est robuste. L'ensemble des valeurs Bootstrap ont été retranscrites sur les nœuds de l'arbre consensus et quantifient la validité de ceux-ci.

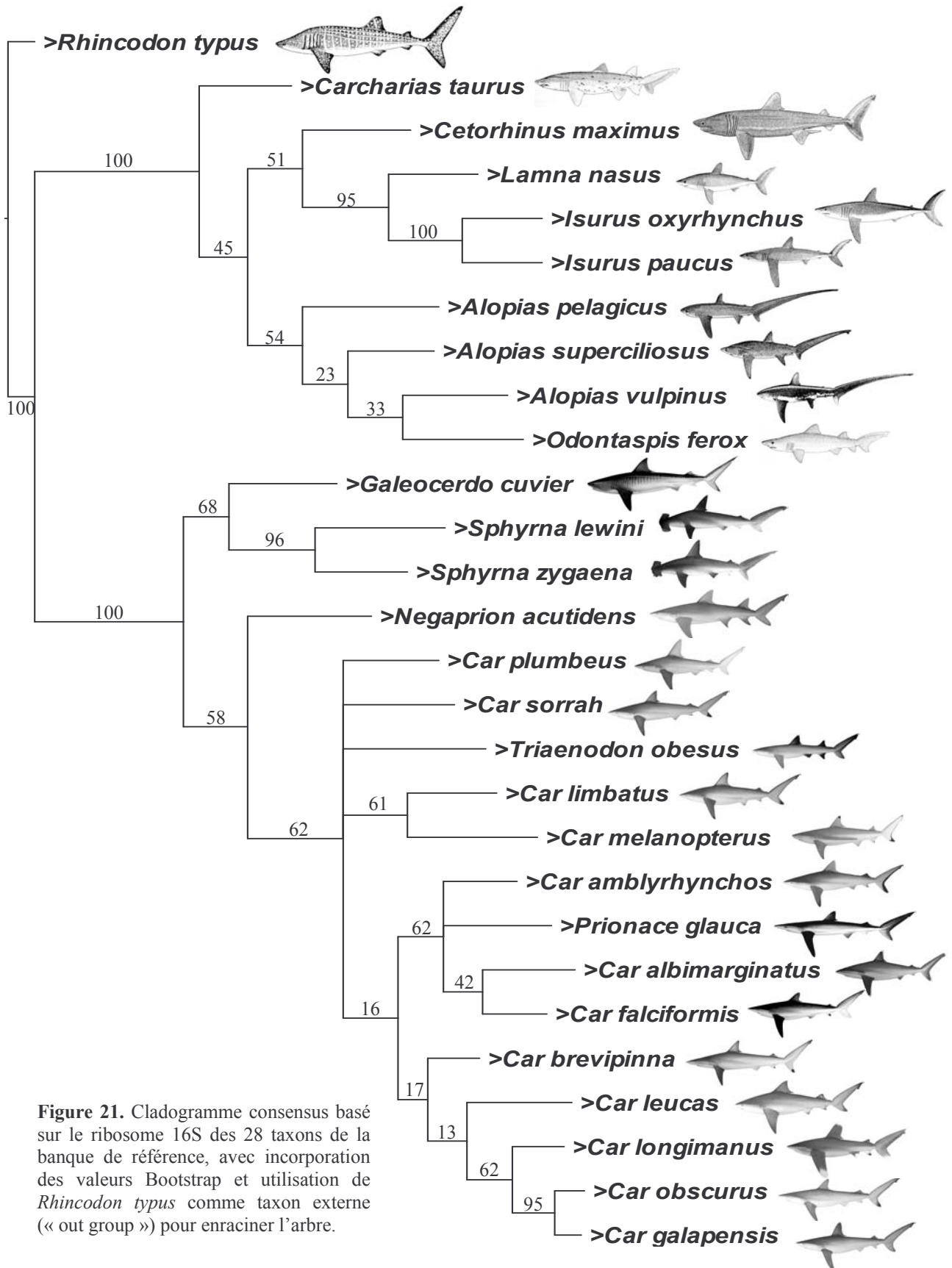
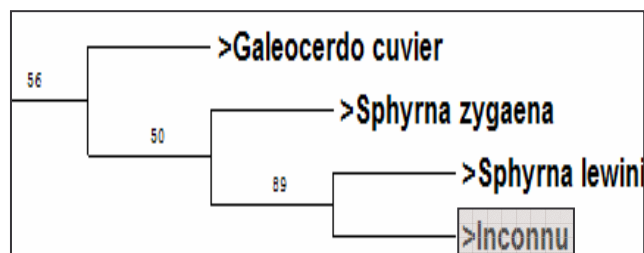


Figure 21. Cladogramme consensus basé sur le ribosome 16S des 28 taxons de la banque de référence, avec incorporation des valeurs Bootstrap et utilisation de *Rhincodon typus* comme taxon externe (« out group ») pour enraciner l'arbre.

Toutefois, la place du requin féroce (*Odontaspis ferox*) nous paraît illogique. Pourtant très éloigné morphologiquement des requins renards (Alopiidae), il arrive cependant que certains auteurs (Naylor *et al.* 1997, Martin et Burg 2002) placent ce requin à la base des renards. Cependant la place d'espèce sœur avec *vulpinus* nous paraît surprenante et incorrecte. Il est possible que le fragment 16S ne regroupe pas assez de sites informatifs et ne puisse donc pas retracer correctement la phylogénie de cette branche. Néanmoins, nous ne cherchons pas dans cette étude à obtenir un arbre phylogénétique vrai mais à utiliser une méthode de classement des espèces qui soit répétitive quitte à contenir un biais constant et invariable.

Toujours en nous appuyant sur l'exemple de l'aile transformé analysé au départ de l'étude, nous avons aussi séquencé le tissu correspondant à la « fibre translucide ». A notre grande surprise, nous n'avons pas obtenu la même séquence qu'avec l'autre prélèvement provenant du même aileron transformé (« croûte jaune »). De plus, nous avons soumis cette séquence à l'analyse BLAST qui n'a pas donné de résultat certain sur son identification. Nous avons alors construit un arbre à l'aide de



notre banque en y incorporant la séquence inconnue. En suivant la construction heuristique, nous avons obtenu 12 arbres fondamentaux à partir desquels nous avons élaborés un arbre consensus. Cet arbre affichant seulement les nœuds résolus, nous localisons notre inconnue placée de façon certaine en espèce sœur de *Sphyrna lewini*. L'analyse Bootstrap confirme la robustesse du nœud en affichant une valeur de 89%. La séquence inconnue appartient donc à l'ordre des Carcharhiniformes, à la famille de Sphyrnidae et au genre des *Sphyrna*. En outre, ce genre compte 7 espèces dont deux sont déjà présentes en banque. Reste donc 5 espèces possibles parmi lesquelles 4 sont localisées sur les côtes sud-américaines. La dernière, à distribution plus large, est le Grand requin marteau (*Sphyrna mokarran*) très apprécié pour ses larges ailerons. En nous appuyant sur le succès de cette espèce et sur la phylogénie des requins marteaux publiée par Martin (1993), on peut émettre l'hypothèse favorable que la séquence trouvée appartient donc au Grand requin marteau. Evidemment cette hypothèse ne pourra être vérifiée à 100% que lorsque *Sphyrna mokarran* sera référencé dans notre banque. On peut donc conclure sur deux résultats importants vis-à-vis de ce prélèvement : tout d'abord qu'il s'agit certainement d'un extrait de Grand requin marteau, et deuxièmement que l'aile achetée a été confectionnée à partir d'aile transformé d'au moins deux requins. Cette information est précieuse car non seulement elle témoigne de la grande sensibilité de notre analyse mais en plus elle nous informe sur

les pratiques de production et de traitement de certains ailerons. Après information, il arrive relativement souvent que les marchands asiatiques utilisent plusieurs ailerons de petites tailles pour en constituer un grand. Cet aileron étant vendu sous la forme de rayons séchés, il est alors impossible pour l'acheteur de voir la différence.

7. Validation de la méthode : test sur neufs ailerons

Pour vérifier et valider notre méthode d'identification génétique nous avons simulé une série d'analyse sur neuf ailerons. Les échantillons utilisés sont des morceaux séchés d'ailerons prélevés par Shelley Clarke sur les marchés de Hong Kong et expédiés par la poste. Ainsi près de 50 échantillons, regroupant neuf espèces différentes, ont été identifiés, étiquetés et envoyés à la Station de Biologie Marine de Concarneau où les analyses sont effectuées. A la réception, un pool de neuf prélèvements, un pour chaque espèce, est tiré au hasard puis numéroté de façon à ce que le manipulateur ne puisse plus en connaître l'espèce. Reste au manipulateur à travailler **en aveugle** sur ces neufs prélèvements. Nous avons séquencé ces échantillons uniquement avec Sha 5, estimant que 500 nucléotides du 16S étaient suffisants à une bonne identification. Une fois les neufs tissus extraits, amplifiés et séquencés, nous avons soumis les séquences correspondantes à l'analyse BLAST. Tous les résultats correspondent avec une espèce de la banque et sont en accord avec l'identification d'origine.

Tableau 4. Synthèse du test de validité. Ce tableau reprend par numéro de manipulation les résultats du séquençage, de l'analyse BLAST et la conclusion finale de l'identification de chaque aileron.

Numéro	Taille de la séquence obtenue (pbs)	BLAST			Conclusion
		Score (bits)	E value	Taux d'identité	
1	Sha 5: 471 pbs	918	0	470/471 (99,8%)	<i>Car albimarginatus</i>
2	Sha 5: 395 pbs	783	0	394/395 (99,7%)	<i>Car leucas</i>
3	Sha 5: 311 pbs	583	e-169	307/311 (98,7%)	<i>Car plumbeus</i>
4	Sha 5: 508 pbs	1007	0	508/508 (100%)	<i>Car obscurus-galapensis</i>
5	Sha 5: 208 pbs	357	e-101	204/208 (98,0%)	<i>Car falciformis</i>
6	Sha 5: 511 pbs	981	0	508/511 (99,4%)	<i>Isurus oxyrinchus</i>
7	Sha 5: 512 pbs	971	0	512/512 (100%)	<i>Prionace glauca</i>
8	Sha 5: 700 pbs	1263	0	605/605 (100%)	<i>Car longimanus</i>
9	Sha 5: 601 pbs	1183	0	600/601 (99,8%)	<i>Galeocerdo cuvier</i>

Le premier échantillon provient d'un requin pointes blanches de récifs (*Carcharhinus albimarginatus*). Le taux d'identité est très élevé et l'unique nucléotide qui diffère est dû à une erreur d'interprétation du chromatogramme par le logiciel. Il n'y a donc pas de doute possible. En outre, cette nouvelle séquence n'apporte pas d'information supplémentaire sur la

variabilité génétique intraspécifique de cette espèce. Le prélèvement numéro 2 a été identifié, avec un fort taux d'identité, comme un requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*). Les différences sont dues à un chromatogramme de moyenne qualité et des interprétations du logiciel erronées. Il n'y a pas d'information supplémentaire sur la variabilité génétique au sein de cette espèce.

L'aileron suivant est celui d'un requin gris commun (*Carcharhinus plumbeus*), la petite taille de la séquence et la mauvaise qualité du chromatogramme obtenu baisse le score et le taux d'identité. Il n'y a cependant pas de doute et aucune variation intra-espèce est à noter. Le quatrième tissu appartient à notre complexe d'espèce *Carcharhinus obscurus-galapensis*, ces deux espèces sont identiques et ne peuvent se différencier que par un nucléotide à la position 612. Il n'est pas donc possible de les différencier. Un séquençage avec l'amorce Sha3 nous permettrait certainement de conclure. Aucune variation nouvelle n'est apparue. La séquence obtenue à partir de l'échantillon 5 est la plus mauvaise, elle ne fait qu'une taille de 208 nucléotides. La finesse de l'analyse permet quand même d'identifier *Carcharhinus falciformis*. Les variations sont dues à la qualité médiocre du chromatogramme ; aucune variabilité intraspécifique n'est observée. L'aileron 6 est un requin mako (*Isurus oxyrinchus*), le score est élevé et le taux d'identité important. Cependant on isole trois variations qui se révèlent être de la variabilité intra-espèce. Ce taux de variation est supérieur à celui trouvé chez le requin bleu. Rapporté à la séquence 16S entière (1138 pbs), on évalue à six les variations. C'est la plus grande variabilité intraspécifique observée dans notre étude, mais elle ne modifie pas le pouvoir discriminatif de notre marqueur. Le septième prélèvement est celui d'un Peau bleu (*Prionace glauca*) avec 100% d'identité avec le spécimen de référence Pg1. On dit alors que ces deux spécimens sont homologues. Nous avons ensuite séquencé entièrement le 16S puis le Cytochrome b. La séquence 16S de 1140 nucléotides est identique à Pg1 et la séquence Cytochrome b de 1005 nucléotides affiche une variation avec Pg1 et aucune avec Pg2. Rappelons que le 16S de Pg1 et Pg2 différaient d'une variation. Cette variabilité intraspécifique complexe ne nous permet pas de dissocier des populations sur les variations observées. Néanmoins les taux de variation chez le Peau bleu, sur le 16S et le Cytochrome b, restent très faibles. L'aileron 8 est sans aucun doute celui de *Carcharhinus longimanus*, puisqu'elle est homologue avec la séquence de référence. Aucune analyse intraspécifique n'est alors possible. La dernière analyse identifie le requin tigre (*Galeocerdo cuvier*) comme le propriétaire de l'aileron avec un score sans appel. L'analyse de la variabilité intra espèce n'isole qu'une seule variation avec la séquence de référence, ce qui est tout à fait acceptable.

La méthode d'analyse génétique des ailerons de requin proposée dans cette étude affiche des premiers résultats encourageants. Mais c'est avec le recul d'applications répétées sur « le terrain » que la méthode sera éprouvée et pourra être validée.

III. Discussion

Le système d'analyse de séquences d'ailerons, proposé dans cette étude, est un modèle qui semble fonctionner et donner de bons résultats. Mais qu'apporte-t-il de plus que la technique proposée par Shivji *et al.* (2002) et appliquée au même domaine ? Et surtout pourquoi avoir reconstitué une banque avec le 16S alors qu'une vingtaine de séquences Cytochrome b de requins étaient déjà accessibles sur GenBank ?

Tout d'abord, le séquençage direct a été préféré à la PCR multiplexe pour des questions fondamentales puis pour plusieurs raisons techniques. En effet, l'équipe de Shivji, limitant les nombres d'espèces identifiables aux six espèces les plus communément capturées, ne répond pas à la problématique suivante: à quelle espèce appartient cet aileron ? Mais plutôt : est-ce que cet aileron appartient à une des six espèces ? Si ce n'est pas le cas, le système n'est alors plus capable de déterminer l'espèce analysée. Ensuite, la PCR multiplexe est une méthode plus rapide et plus accessible que le séquençage. Le choix de Shivji s'explique par le fait qu'il aborde le problème de la traçabilité par un aspect quantitatif et non qualitative comme nous le suggérons. Il espère utiliser sa méthode pour évaluer les quantités et les proportions des espèces de requins commercialisés. Néanmoins la méthode utilisée pourrait rencontrer des problèmes de faux positifs dus à la spécificité des amorces d'amplification. Le pool d'amorces utilisé n'a pas été testé sur toutes les espèces ciblées par le marché, ce qui n'exclut donc pas l'amplification d'une autre espèce que les six prévues. En outre, la technologie de pointe utilisée pour le séquençage peut paraître coûteuse et inaccessible aujourd'hui, pourtant les progrès technologiques évoluant rapidement, on peut envisager une vulgarisation de la méthode et une baisse des prix de l'analyse très prochainement, ce qui est déjà le cas dans plusieurs pays. Le choix du séquençage direct, qui nous permet d'accéder à la séquence au bout de deux jours et demi d'analyse, se justifie par la qualité et le degré de précision des informations fournies.

Nous avons préféré le 16S au Cytochrome b pour deux raisons fondamentales. Premièrement, les données bibliographiques permettaient de penser que le gène mitochondrial codant pour le Cytochrome b était chez les requins d'avantage un marqueur de population qu'un marqueur d'espèce. En effet, Kitamura et al. (1996) décrivent la variabilité intraspécifique du Cytochrome b chez le requin bouledogue (*Carcharhinus leucas*) avec un alignement de dix spécimens. On remarque au total 5 variations sur les 405 nucléotides séquencés. De même, Heist et Gold (1999) ont rapporté des variations intra-espèce sur le Cytochrome b chez *Carcharhinus brevipinna* (2 bases différentes sur 396) et chez *Carcharhinus plumbeus* (3 bases sur 396). Le Cytochrome b étant déjà reconnu comme un marqueur de population chez d'autres vertébrés, il paraissait alors logique qu'il le soit aussi chez les requins. En outre, au début de notre étude, pour l'analyse de la variabilité intraspécifique chez *Prionace glauca* du Cytochrome b, nous avons utilisé comme référence la séquence L08040 (Martin et Palumbi, 1993) disponible sur GenBank. A notre grande surprise, nous avons compté près de 46 nucléotides différents entre nos séquences et celles publiées. Cette variabilité ne pouvant pas être due à une variabilité entre populations, nous avons émis des doutes sur la validité de la séquence en banque. Nous avons ensuite séquencé *Carcharhinus plumbeus* sur un fragment de 650 paires de bases du Cytochrome b. Puis nous l'avons aligné avec la séquence correspondante L08032, des mêmes auteurs. Les deux séquences ont de nouveau affiché une variabilité, sur 25 nucléotides. Après une relecture de la littérature, l'article de Heist et Gold (1999) mentionne déjà un problème de validité de la séquence L08034 du requin tigre (*Galeocerdo cuvier*). Les 13 séquences publiées par Martin et Palumbi sont très probablement incorrectes et inutilisables. Les séquences disponibles sur GenBank ne sont donc pas forcément fiables. Dans le doute, nous avons choisi de ne pas utiliser les séquences accessibles dans GenBank. En outre, les séquences 16S de requins publiées ne concernent aucune des espèces qui nous intéressent, nous avons donc créé notre propre banque de référence 16S. L'identification des 28 spécimens est sûre et vérifiable pour certains. Toutes les séquences ont été corrigées à deux reprises et ont été vérifiées à chaque alignement. Sans discriminer le Cytochrome b, le fragment 16S représente un marqueur d'espèce efficace et son exploration apporte des informations nouvelles.

Pourtant deux espèces distinctes morphologiquement ont des séquences quasiment identiques. Pour conclure sur cette forte identité, il faudrait d'abord approfondir l'étude sur ces deux *Carcharhinus* pour connaître leur variabilité intraspécifique et voir si l'unique variation qui les sépare est présente à chaque fois. Auquel cas, on pourra quand même les différencier à partir de cette variation. Couplée à un protocole morphologique, nous devons aussi explorer la piste d'une possible mise en synonymie d'*obscurus* et *galapensis*. En outre, une analyse sur le Cytochrome b serait intéressante à mettre en place pour juger de sa variabilité chez ces deux requins. Toutefois, cette observation marque les limites du marqueur 16S sur des espèces très proches. Notre banque est constituée d'espèces éloignées et très proches. Or notre marqueur doit afficher une variabilité suffisamment importante pour différencier les espèces mais pas trop pour ne pas différencier des individus d'une même espèce. Dans le cas des *Carcharhinus*, la variabilité doit être plus faible et nécessite peut être l'utilisation d'un autre marqueur plus variable.

Le Domaine d'application de nos recherches est d'ordre qualitatif. Nous envisageons l'utilisation de notre méthode dans des contrôles ponctuels organisés par des équipes de scientifiques indépendants comme c'est le cas pour les baleines et autres mammifères marins. Chaque année une équipe de biologistes de l'université d'Auckland, en Nouvelle Zélande, part en expédition sur les marchés aux poissons japonais pour faire des prélèvements sur les baleines en vente. Ils amplifient alors les ADN recueillis sur place pour respecter les conventions de la CITES concernant ces espèces et emportent l'extraction du gel dans leurs bagages. L'analyse est ensuite terminée chez les kiwis et un rapport annuel est publié dans la presse internationale pour informer la communauté de la vente d'espèces de baleines protégées. Ce type d'action a un impact important en exerçant une pression médiatique sur les autorités du pays concerné.

IV. Conclusion-Perspectives

Sachant que près d'un cinquième de la population mondiale consomme de la soupe d'ailerons de requins, les récentes législations portant sur deux espèces paraissent indispensables. On suppose facilement que d'autres requins vont allonger cette liste dans un futur proche. Cependant, les ailerons du marché étant transformés, aucun indice morpho-anatomique ne permet d'en identifier l'espèce. Cette thèse propose donc une technique moléculaire basée sur l'analyse des séquences d'ADN pour déterminer l'espèce d'origine des ailerons. A partir d'une analyse informatique de la séquence du gène ribosomal 16S, nous sommes en mesure d'identifier 28 des espèces ciblées par le marché. L'utilisation systématique de ce protocole n'est pas envisageable pour l'instant, mais une approche qualitative correspond mieux aux objectifs de contrôle fixé par les organismes de protection. Cependant cette technique de spéciation demande encore d'être validée par l'application sur le terrain. Plusieurs prolongements à cette étude peuvent être envisagés :

- A court terme, compléter notre banque de tissus pour obtenir l'ensemble des espèces ciblées par le commerce des ailerons.
- Ensuite, remplacer progressivement les tissus non référencés, par des échantillons provenant de spécimens mis en collection.
- Enfin, à moyen ou à long terme, il sera nécessaire d'étendre ces recherches en définissant un ou plusieurs marqueurs, plus variables, capable de résoudre les cas de litige entre deux espèces très proches, mais aussi pour définir la population de l'espèce analysée et ainsi localiser le lieu de capture.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Coupe longitudinale de la nageoire dorsale.....	12
Figure 2 : Coupe transversale de la nageoire dorsale.....	12
Figure 3 : Structure squelettique de la nageoire pectorale.....	12
Figure 4 : Production d'ailerons frais de requin à Hong Kong.....	19
Figure 5 : Evolution des importations d'ailerons secs ou salés de requin à Hong Kong.....	19
Figure 6 : Evolution des exportations d'ailerons secs ou salés de requin depuis Hong Kong.....	19
Figure 7 : Evolution des captures mondiales de poissons cartilagineux de 1985 à 2000.....	23
Figure 8 : Cycle de la PCR.....	31
Figure 9 : Position relative des gènes codant pour les ARNr 18S, 5,8S, 28S et les ITS.....	37
Figure 10 : Structure du Génome mitochondrial de <i>Scyliorhinus canicula</i>	40
Figure 11 : Position relative de la D-loop et du gène codant pour le Cytochrome b.....	42
Figure 12 : Structure des ribosomes mitochondriaux.....	44
Figure 13 : Spectre d'absorbance d'un extrait d'ADN total.....	52
Figure 14 : Photo du gel d'agarose après migration des fragments amplifiés.....	56
Figure 15 : Schéma protocolaire du kit QIAquick.....	57
Figure 16 : Emplacement des amorces utilisées à partir des fragments amplifiés.....	59
Figure 17 : Chromatogramme d'une séquence de requin obtenue avec Sha5.....	61
Figure 18 : Spectre d'absorbance suite à l'extraction des tissus.....	62
Figure 19 : Photo du gel d'agarose des fragments 16S.....	63
Figure 20 : Diagramme de variabilité du fragment 16S.....	66
Figure 21 : Cladogramme consensus.....	75
Tableau 1 : Banque de référence.....	64
Tableau 2 : Matrice d'identité.....	69
Tableau 3 : Synthèse de la variabilité nucléotidique entre trois requins Peau Bleu.....	70
Tableau 4 : Synthèse du test de validité.....	77

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Anderson, R.C., Ahmed, H. (1993) The shark fisheries of the Maldives. Ministry of Fisheries and Agriculture, Republic of Maldives; Food and Agriculture organisation of the United Nations, Madras.
- Baum, J.K., Myers, R.A., Kehler, D. G., Worm, B., Harley, S.J., Doherty, P.A. (2003) Collapse and conservation of shark population in the Northwest Atlantic. *Science*, **299**, 389-392.
- Bernstein, R.M., Schuler, S.F., Bernstein, H., Marchalonis, J. (1996) Primordial emergence of the recombination activating gene 1 (RAG1): sequence of the complete shark gene indicates homology to microbial integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 9454-9459.
- Cao, Y., Waddell, P.J., Norihiro, O. & Hasegawa, M. (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the Shark *Mustelus manazo*: evaluating rooting contradictions to living bony vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 1637-1646.
- Chen, C.T.G., Liu K-M., Joung S-J., Phipps M.J. (1996) TRAFFIC report on shark fisheries and trade in Taiwan. In: The World Trade in Sharks: A compendium of TRAFFIC's regional studies. TRAFFIC Network Report. TRAFFIC International, Cambridge UK, 1:275-322.
- Compagno, L.J.V. (1984) FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the World. FAO Fisheries Synopsis No. 125, Vol.4., Part 1 and Part 2.
- Compagno, L.J.V. (1988). Sharks of the order Carcharhiniformes. (Princeton University Press:Princeton, New Jersey.)
- Cunningham-Day, R. (2002) Sharks in danger. *Biologist*, **49**(3), 118-122.
- Delarbre, C., Spruyt, N., Delmarre, C., Gallut, C., Barriol, V., Janvier, P., Laudet, V. & Gachelin, G. (1998) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Genetics*, **150**, 331-344.
- Douady, C.J., Dosay, M., Shivji, M.S. & Stanhope, M.J. (2003) Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **26**, 215-221.
- Dunn, K.A., McEachran, J.D., Honeycutt R.L. (2003) Molecular phylogeny of myliobatiformes fishes (Chondrichthyes: Myliobatiformes), with comments on the effect of missing data on parsimony and likelihood. *Molecular phylogenetics and evolution*, **27**, 259-270.
- Dunn, K.A., Morrissey, J.F. (1995) Molecular phylogeny of Elasmobranchs. *Copeia*, **1995**, 526-531.
- Eitner, B.J. (1995) Systematics of the genus *Alopias* (Lamniformes: Alopiidae) with evidence for the existence of an unrecognized species. *Copeia*, **1995**, 562-571.
- Gardner, M.G. and Ward, R.D. (2002) Taxonomic affinities within Australian and New Zealand *Mustelus* sharks (Chondrichthyes: Triakidae) inferred from allozymes, mitochondrial DNA and precaudal vertebrae counts. *Copeia*, **2002**, 356-363.
- Gardner, M.G. and Ward, R.D. (1998) Population structure of the Australian gummy shark (*Mustelus antarcticus* Günther) inferred from allozymes, mitochondrial DNA and vertebrae counts. *Marine and Freshwater Research*, **49**, 733-745.
- Garrick, J.A.F. (1982) Sharks of the genus *Carcharhinus*. (US) National Oceanic and

- Atmospheric Administration Technical Report. National Marine and Fisheries Service Circular 445.
- Garrick, J.A.F. (1985) Additions to a revision of the shark genus *Carcharhinus*: Synonymy of *Aprionodon* and *Hypoprion*, and description of a new species of *Carcharhinus*. (US) National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Report. National Marine and Fisheries Service(34). 26pp.
- Grace, M. (2001) Field Guide to Requiem Sharks (Elasmobranchimorphii: Carcharhinidae) of the Western North Atlantic. (US) National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Report. National Marine and Fisheries Service Circular 153, Fishery Bulletin.
- Grassé, P. P. (1958) Agnathes et Poissons: anatomie, éthologie, systématique. *Traité de Zoologie: anatomie, systématique, biologie*. Edition Masson & Cie, XIII, 1: 710-747.
- Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C. (2001) Analyse génétique moderne. De-Boeck Université.
- Harry, M. (2001) Génétique moléculaire et évolutive. Collection Sciences Fondamentales. Edition Maloine.
- Heist, E.J. and Gold, J.R. (1999) Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-atlantic bight. *Copeia*, **1999**, 182-186.
- Heist, E.J. and Gold, J.R. (1998) Genetic identification of sharks in the U.S. Atlantic large coastal shark fishery. *Fishery Bulletin*, **97**, 53-61.
- Heist, E.J., Musick, J.A. and Graves, J.E. (1996a) Mitochondrial DNA diversity and divergence among sharpnose sharks, *Rhizoprionodon terraenovae*, from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Fishery Bulletin*, **94**, 664-668.
- Heist, E.J., Musick, J.A. and Graves, J.E. (1996b) Genetic population structure of the shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*) inferred from restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **53**, 583-588.
- Hoelzel, A.R. (2001) Sharks fishing in fin soup. *Conservation Genetics*, **2**, 69-72.
- Iglésias, S. (2001) Systématique, Phylogénie moléculaire, Evolution et Adaptation des Scyliorhinidae: Recherche d'un marqueur de population chez deux Squaliformes de l'Atlantique Nord-est. *Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes*, Science de la Vie et de la Terre.
- Johnson, A.G., Utter, F.M. (1976) Electrophoretic variation in intertidal and subtidal organism in Puget Sound, Washington. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, **7**, 3-14.
- Kitamura, T., Takemura, A., Watabe, S., Taniuchi, T. & Shimizu, M. (1996b) Mitochondrial DNA analysis for the cytochrome *b* gene and D-loop region from the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Fisheries Science*, **62**, 21-27.
- Kitamura, T., Takemura, A., Watabe, S., Taniuchi, T. & Shimizu, M. (1996a) Molecular phylogeny of the sharks and rays of superorder Squalia based on mitochondrial cytochrome *b* gene. *Fisheries Science*, **62**, 340-343.
- Kreuzer, R., Ahmed, R. (1978) Shark Utilization and Marketing. FAO, Rome.
- Last, P. R., Stevens, J.D. (1994) "Sharks and Rays of Australia." (AU) National Library of Australia Cataloguing.
- Lavery, S. (1992) Electrophoretic analysis of phylogenetic relationships among Australian Carcharhinid sharks. *1992*, **43**, 97-108.
- Martin, A.P., Burg, T.M. (2002) Perils of paralogy: using HSP70 genes for inferring organismal phylogenies. *Syst. Biol.*, **51(4)**, 570-587.
- Martin, A.P., Pardini, A.T., Noble, L.R. & Jones, C.S. (2002b) Conservation of a dinucleotide simple sequence repeat locus in sharks. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **23**, 205-213.

- Martin, A.P. (2001) The phylogenetic placement of Chondrichthyes: inferences from analysis of multiple genes and implications for comparative studies. *Genetica*, **111**, 349-357.
- Martin, A.P. (1999) Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks : Implicating metabolic rate (again). *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 996-1002.
- Martin, A.P. (1996) Systematics of the Lamnidae and the origination time of *Carcharodon carcharias* inferred from the comparative analysis of mitochondrial DNA sequences. In Klimley, A.P.A., D.G. (ed.), *Great white sharks. The biology of Carcharodon carcharias*, pp. 49-53.
- Martin, A.P. (1995) Mitochondrial DNA sequence evolution in sharks: rates, patterns, and phylogenetic inferences. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 1114-1123.
- Martin, A.P. (1993b) Hammerhead shark origins. *Nature*, **364**, 494.
- Martin, A.P. (1993a) Application of mitochondrial DNA sequence analysis to the problem of species identification of sharks. *NOAA Technical Report NMFS*, **115**, 53-59.
- Martin, A.P., Palumbi, S.R. (1993) Protein evolution in different cellular environments: cytochrome *b* in sharks and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 873-891.
- Martin, A.P., Naylor, G.J.P. & Palumbi, S.R. (1992) Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature*, **357**, 153-155.
- Nair, K.G.R., Madhavan, P. (1974) Shark fin rays- technology of extraction. *Fisheries technology*, **XI(1)**, pp. 60-63.
- Naylor, G.J.P., Martin, A.P., Mattison, E.G. & Brown, W.M. (1997) Interrelationships of Lamniform sharks: testing phylogenetic hypotheses with sequence data. In *Molecular systematics of fishes*, pp. 199-218.
- Naylor, G.J.P. (1992) The phylogenetic relationships among requiem and hammerhead sharks: inferring phylogeny when thousands of equally most parsimonious trees result. *Cladistics*, **8**, 295-318.
- Pank, M., Stanhope, M., Natanson, L., Kohler, N. and Shivji, M. (2001) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. *Marine Biotechnology*, **3**, 231-240.
- Pardini, A.T., Jones, C.S., Noble, L.R., Kreiser, B., Malcolm, H., Bruce, B.D., Stevens, J.D., Cliff, G., Scholl, M.C., Francis, M., Duffy, C.A.J. & Martin, A.P. (2001) Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature*, **412**, 139-140.
- Parry-Jones, R. (1996a) TRAFFIC report on shark fisheries and trade in the People's Republic of China. In: The World Trade in Sharks: A compendium of TRAFFIC's regional studies. TRAFFIC Network Report. TRAFFIC International, Cambridge UK, 1:23-86.
- Parry-Jones, R. (1996b) TRAFFIC report on shark fisheries and trade in Hong-Kong. In: The World Trade in Sharks: A compendium of TRAFFIC's regional studies. TRAFFIC Network Report. TRAFFIC International, Cambridge UK, 1:87-146.
- Rasmussen, A.-S., Arnason, U. (1999a) Phylogenetic studies of complete mitochondrial DNA molecules place cartilaginous fishes within the tree of bony fishes. *Journal of Molecular Evolution*, **48**, 118-123.
- Rasmussen, A.-S.A.U. (1999b) Molecular studies suggest that cartilaginous fishes have a terminal position in the piscine tree. *Evolution*, **96**, 2177-2182.
- Renon, P., Colombo, M.M., Colombo, F., Malandra, R. & Biondi, P.A. (2001) Computer-assisted evaluation of isoelectric focusing patterns in electrophoretic gels: identification of smoothhounds (*Mustelus mustelus*, *Mustelus asterias*) and comparison with lower value shark species. *Electrophoresis*, **22**, 1534-1538.
- Rose, D.A. (1996) An overview of world trade in sharks, and other cartilaginous fishes. TRAFFIC Network Report. TRAFFIC International, ISBN 1-85850-114-8, 106p.
- Schluter, S.F., & Marchalonis, J.J. (2003) Cloning of shark RAG2 and characterization of the RAG1/RAG2 gene locus. *The FASEB Journal*, **17**, 470-472.

- Shivji, M., Clarke, S., Pank, M., Natanson, L., Kohler, N. & Stanhope, M. (2002) Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology*, **16**, 1036-1047.
- Smith, P.J. (1986) Low genetic variation in sharks (Chondrichthyes). *Copeia*, 1986, 202-207.
- Solé-Cava, A.M., Vooren, C.M., Levy, A.M. (1983) Isozomic differentiation of two sibling species of *Squatina* (Chondrichthyes) in South Brazil. *Comp. Biochem. Physiol.*, **75B**, 355-358.
- Stevens, J.D., Bonfil, R., Dulvy N.K. & Walker, P.A. (2000) The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES J. Mar. Sci.*, **57**, 476-494.
- Van Grevelinghe, G., Diringer, A. & Séret, B. (1999) Tous les requins du monde. Les Encyclopédies du Naturaliste. Delachaux et Niestlé.
- Vannini, E. (1982) *Zoologia dei vertebrati*. Utet, Torino, p133.
- Winshell, C.J., Martin, A.P., Mallatt, J. (2003) Phylogeny of elasmobranch based on LSU and SSU ribosomal RNA genes. *Molecular phylogenetics and evolution*, unpublished.

Sites Internet:

- Galisson Frédéric, « Les programmes FASTA et BLAST », cours du 27 Octobre 2000, Université de Washington, USA :
http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/blast/blast_fasta-fr.pdf

ANNEXES

Tableau de synthèse : récapitulatif par espèces des séquences de requin disponibles sur GenBank. Pour chaque séquence est précisé la taille, l'origine du fragment (nucléaire ou mitochondriale), la référence Genbank et l'auteur de l'étude.

Ordre	Familie	Gènes	longueur		Référence	
			Nucl.	Mitoc.	GenBank	Auteurs
Carcharhiniformes						
Carcharhinidae						
	Carcharhinus falciformis	ARNr 5,8S/ITS2/ARNr 28S	1291		AF513986	Shivji et al. 2002
	Carcharhinus leucas	RAG1	3446		U62645	Bernstein et al. 1996
		Cyt. b			-	Kitamura et al. 1996
		D-loop			-	Kitamura et al. 1996
	Carcharhinus limbatus	Microsat.	200		AY264268-82	Heist & Keeney (soumis 2003)
		D-loop		1067	AY208861-73	Heist & Keeney (soumis 2003)
	Carcharhinus obscurus	ARNr 5,8S/ITS2/ARNr 28S	1301		AY033819	Pank et al., 2001
	Carcharhinus plumbeus	RAG1/RAG2	11101		AY172838	Bernstein et al., 1996
		ARNr 5,8S/ITS2/ARNr 28S	1298		AY033820	Pank et al., 2001
		RAG1	592		U15612	Bernstein & al., 1994
		Cyt. b		1146	L08032	Martin & Palumbi, 1993
		NADH2		1041	U91421	Naylor & al. 1997
		Microsat.	429		AF067410-12	Heist & Gold 1998
			610		AF069503	Heist & Gold 1998
	Carcharhinus porosus	NADH2		1041	U91420	Naylor et al, 1997
		Cyt. b		1146	L08033	Martin & Palumbi, 1993
		ARNr 12S/ARNr/ARNr 16S		x	AY147897	Douady & al, 2003
	Galeocerdo cuvier	Cyt. b		1146	AF004288	Heist & Gold, 1997
		Cyt. b		1146	L08034	Martin & Palumbi, 1993
		ARNr 18S	1780		AY049833	Winchell et al. (non publié)
		ITS2/ARNr 28S	3987		AY049832	Winchell et al. (non publié)
		ARNr 5,8S/ITS2	599		AY049831	Winchell et al. (non publié)
		NADH2		1041	U91417	Naylor & al. 1997
	Negaprion brevirostris	Cyt. b		1146	L08039	Martin & Palumbi, 1993
		NADH2		1041	U91418	Naylor et al, 1997
		Microsat.	383		AF457153-86	Feldheim et al. 2002
	Prionace glauca	Cyt. b		1146	L08040	Martin & Palumbi, 1993
		NADH2		1041	U91419	Naylor et al, 1997
		ARNr 5,8S/ITS2/ARNr 28S	1264		AF515441	Shivji et al, 2002
	Scoliodon laticaudus	ARNr 12S	411		AF521939	Shukla et al. (soumis 2002)
Scyliorhinidae						
	Apristurus profundorum	ARNr 18S	1777		AY049810	Winchell et al, non publié
		ITS2/ARNr 28S	3523		AY049809	Winchell et al. non publié
		ARNr 5,8S/ITS2	504		AY049808	Winchell et al. non publié
	Scyliorhinus canicula	ADNmt total		16697	NC 001950	Delarbre et al. 1998
		NADH1/NADH2/COX1		2676	Y09526	Delarbre et al, 1997
		ARNr 28S (D8)	73		Z18748	Le et al, (non publié)
		ARNr 28S (D2)	150		Z18722	Le et al, (non publié)
		ARNr 28S (C1/ D1/C2)	370		Z18770	Le et al, (non publié)
	Scyliorhinus torazame	ARNr 18S	1776		AY049855	Winchell et al, non publié
		ITS2/ARNr 28S	4027		AY049854	Winchell et al., non publié
		ARNr 5,8S/ITS2	550		AY049853	Winchell et al., non publié
Sphyrnidae						
	Sphyrna lewini	Cyt. b		1146	L08041	Martin & Palumbi, 1993
		NADH2		1041	U91422	Naylor et al., 1997
	Sphyrna tiburo tiburo	Cyt. b		1146	L08042	Martin & Palumbi, 1993
	Sphyrna tiburo vespertina	Cyt. b		1146	L08043	Martin & Palumbi, 1993
Triakidae						
	Mustelus asterias	Cyt. b		405	AF183925	Tagliavini et al, 1999 (publié?)
		ARNr 12S	280		AF183928	Tagliavini et al, 1999 (publié?)
	Mustelus manazo	ADNmt total	16707		NC 000890	Cao et al, 1998
	Mustelus mustelus	ARNr 12S	280		AF183927	Tagliavini et al, 1999 (publié?)
		Cyt. b		405	AF183924	Tagliavini et al, 1999 (publié?)
		ARNr 28S	230		AF183930	Tagliavini et al, 1999 (publié?)

Ordre	Famille	Gènes	longueur		Référence	Auteurs
			Nucl.	Mitoc.		
Espèce				GenBank		
	Mustelus punctulatus	Cyt. b		405	AF183926	Tagliavini et al., 1999
		ARNr 12S		280	AF183929	Tagliavini et al., 1999
	Triakis semifasciata	ARNr 18S		1777	AF212180	Winchell et al., non publié
		ITS2/ARNr 28S		4398	AF212182	Winchell et al., non publié
		ARNr 5,8S/ITS2		658	AF212181	Winchell et al., non publié
	Triakis sp.	RAG1		111	AF137184	Venkatesh et al., 1999
	Triakis sp. IMCB-2001	RAG2		1263	AF369080	Venkatesh et al., 2001
Heterodontiformes						
Heterodontidae						
	Heterodontus francisci	ADNmt total		16708	NC 003137	Amason (soumis?)
		Cyt. b		1146	L08035	Martin & Palumbi, 1993
		ARNr 5,8S/ITS2		257	AY049836	Winchell et al., non publié
		ITS2/ARNr 28S		3624	AY049837	Winchell et al., non publié
		ARNr 12S/ARNr/ARNr 16S	x	AY147889	Douady & al., 2003	
Hexanchiformes						
Chlamydoselachidae						
	Chlamydoselachus anguineus	Cyt. b		732	D50022	Kitamura et al., 1995
		ARNr 5,8S/ITS2		608	AY049823	Winchell et al., non publié
		ARNr 28S		3469	AY049824	Winchell et al., non publié
		ARNr 28S (C1/ D1/C2)		384	Z18675	Le et al., 1993
		ARNr 28S (D2)		134	Z18700	Le et al., 1993
		ARNr 28S (D8)		73	Z18729	Le et al., 1993
Hexanchidae						
	Heptranchias perlo	ARNr 12S/ARNr/ARNr 16S		x	AY147888	Douady & al., 2003
	Hexanchus griseus	ARNr 12S/ARNr/ARNr 16S		x	AY147887	Douady & al., 2003
	Notorynchus cepedianus	Cyt. b		307	M91186	Bernardi & Power, 1992
		ARNr 18S		1771	M91183	Bernardi & Power, 1992
Lamniformes						
Alopiidae						
	Alopias pelagicus	Cyt. b		1083	U91441	Naylor et al., 1997
		RAG1		1491	AF135473	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91431	Naylor et al., 1997
		ARNr 16S		1778	AY049807	Winchell et al. 2001
		ARNr 5,8S/ ITS 2		4015	AY049806	Winchell et al. 2001
		ITS2/ 28S		427	AY049805	Winchell et al. 2001
		Hsp70		1386	AF502445-50	Martin & Burg 2002
				366	AF502558	Martin & Burg 2002
	Alopias superciliosus	Cyt. b		1083	U91443	Naylor et al., 1997
		RAG1		1488	AF135481	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91433	Naylor et al., 1997
		Hsp 70		1386	AF503451-56	Martin & Burg 2002
				381	AF502556-57	Martin & Burg 2002
	Alopias vulpinus	Cyt. b		1071	U91442	Naylor et al., 1997
		NADH2		1038	U91432	Naylor et al., 1997
		ARNr 12S/ARNr/ARNr 16S		x	AY147892	Douady & al., 2003
		Microsat.		631	AF423067	Martin et al. 2002
		Hsp70		1386	AF502457-61	Martin & burg 2002
				378	AF502547-51	Martin & Burg 2002
Cetorhinidae						
	Cetorhinus maximus	Cyt. b		1065	U91439	Naylor et al., 1997
		RAG1		1008	AF135476	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91429	Naylor et al., 1997
		Microsat.		631	AF423062	Martin et al. 2002
		Hsp70		1386	AF502489-95	Martin & burg 2002
				378	AF502547-51	Martin & burg 2002
Lamnidae						
	Carcharodon carcharias	Cyt. b		1146	L08031	Martin & Palumbi, 1993
		RAG1		1497	AF135482	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91426	Naylor et al., 1997
		ARNr 12S/ARNr/ARNr 16S		x	AY147893	Douady & al., 2003
		D-loop		1146	AY026196-224	Martin et al. 2000 (non publié)
		Microsat.		249	AF216864-66	Pardini et al. 1999
					AF184085-89	Pardini et al. 1999
		Hsp70		1386	AF502496-99	Martin & burg 2002
				683	AF502500-30	Martin & burg 2002

Ordre	Famille	Gènes	longueur		Référence	Auteurs
			Nucl.	Mitoc.		
Espèce				GenBank		
	Isurus oxyrinchus	Cyt. b		1146	L08036	Martin & Palumbi, 1993
		RAG1	1494		AF135480	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91424	Naylor et al., 1997
		Microsat.	842		AF426734-38	Heist & Schrey 2001 (non publié)
		Hsp70	683		AF502504-13	Martin & Burg 2002
	Isurus paucus	ARNr 12S/ARNt/ARNr 16S			AY147894	Douady & al., 2003
		Cyt. b		1146	L08037	Martin & Palumbi, 1993
		NADH2		1038	U91425	Naylor et al., 1997
		ARNr 12S/ARNt/ARNr 16S			AY147895	Douady & al., 2003
		Cyt. b		1071	U91438	Naylor et al., 1997
	Lamna distropis	RAG1	1488		AF135478	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91428	Naylor et al., 1997
		Microsat.	667		AF423068	Martin et al. 2002
		Hsp70	1386		AF502462-69	Martin & Burg 2002
			683		AF502514-33	Martin & Burg 2002
	Lamna nasus	ARNr 12S/ARNt/ARNr 16S		x	AY147896	Douady & al., 2003
		NADH2		1038	U91427	Naylor et al., 1997
		ITS2/ ARNr 28S	x		AF315444	Shivji et al. 2002
Megachasmidae						
	Megachasma pelagios	Cyt. b		1073	U91440	Naylor et al., 1997
		RAG1	1491		AF135483	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91430	Naylor et al., 1997
Mitsukurinidae						
	Mitsukurina owstoni	Cyt. b		1137	U91444	Naylor et al., 1997
		RAG1	1497		AF135477	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91434	Naylor et al., 1997
Odontaspidae						
	Carcharias taurus	Cyt. b		1119	U91447	Naylor et al., 1997
		RAG1	1485		AF135475	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91437	Naylor et al., 1997
		ARNr 18S	1777		AY049816	Winchell et al., non publié
		ARNr 12S/ARNt/ARNr 16S			AY147891	Douady & al., 2003
	Odontaspis ferox	Cyt. b		1110	U91445	Naylor et al., 1997
		RAG1	1008		AF423066	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91435	Naylor et al., 1997
Pseudocarchariidae						
	Pseudocarcharias kamoharai	Cyt. b		1119	U91446	Naylor et al., 1997
		RAG1	1497		AF135479	Martin, 1999
		NADH2		1038	U91436	Naylor et al., 1997
Orectolobiformes						
Ginglymostomatidae						
	Ginglymostoma cirratum	RAG1	318		U13982	Greenhalgh & Steiner, 1995
		ARNr 12S/ARNt/ARNr 16S		x	AY147890	Douady & al., 2003
		Chiloscyllium punctatum	RAG1	186		AY029507
		RAG2	1458		AF369082	Venkatesh et al., 2001
Hemiscylliidae						
	Hemiscyllium ocellatum	ARNr 18S	1775		AY049835	Winchell et al., non publié
		ARNr 28S	3723		AY049834	Winchell et al., non publié
Orectolobidae						
	orectolobus ornatus	ARNr 18S	1776		AY049843	Winchell et al., non publié
		ITS2/ARNr 28S	3778		AY049842	Winchell et al., non publié
Pristiformes						
Pristidae						
	Pristis perollieti	Cyt. b		732	D50024	Kitamura et al., 1995
Pristiophoriformes						
Pristiophoridae						
	Pristiophorus cirratus	ARNr 18S	1775		AY049849	Winchell et al., non publié
		ITS2/ARNr 28S	3929		AY049848	Winchell et al., non publié
		ARNr 5,8S/ITS2	242		AY049847	Winchell et al., non publié
		ARNr 12S/ARNt/ARNr 16S		x	AY147885	Douady & al., 2003
Squaliformes						
Centrophoridae						
	Deania sp. JM-2001	ARNr 18S	1776		AY049830	Winchell et al., non publié
		ARNr 5,8S/ITS2	179		AY049828	Winchell et al., non publié
		ITS2/ARNr 28S	3811		AY049829	Winchell et al., non publié
Dalatiidae						
	Dalatias licha	ARNr 18S	1776		AY049827	Winchell et al., non publié
		ARNr 5,8S/ITS2	381		AY049825	Winchell et al., non publié
		ITS2/ARNr 28S	3830		AY049826	Winchell et al., non publié

Ordre			longueur	Référence	
Famille	Gènes		(pb)	GenBank	Auteurs
Espèce		Nucl.			
Echinorhinidae					
Echinorhinus cookei	Cyt. b		307	M91185	Bernardi & Powers, 1992
	ARNr 18S		1772	M91181	Bernardi & Powers, 1992
Etmopteridae					
Centroscyllium fabricii	ARNr 18S		1777	AY049819	Winchell et al., non publié
	ARNr 5,8S/ITS2		597	AY049817	Winchell et al., non publié
	ITS2/ARNr 28S		3782	AY049818	Winchell et al., non publié
Somnositidae					
Centroscymnus owstonii	ARNr 18S		1777	AY049822	Winchell et al., non publié
	ARNr 5,8S/ITS2		593	AY049820	AY049820
	ARNr 28S		3470	AY049821	Winchell et al., non publié
Squalidae					
Centrophorus granulosus	ARNr 12S/ARNr/ARNr 16S		x	AY147884	Douady & al., 2003
Squalus acanthias	ADNmt total			16738	Y18134
	Cyt. b		307	M91184	Bernardi & Power, 1992
	ARNr 18S		1771	M91179	Bernardi et al., 1992
	ITS2/ARNr 28S		3650	AF061800	Mallat & Sullivan, 1998
Squalus cubensis	ARNr 16S		547	AF288199	Spolsky & Didier (soumis?)
	Cyt. b		732	D50026	Kitamura et al., 1995
Squalus mitsukurii	ARNr 16S		547	AF288198	Spolsky & Didier (soumis?)
Squatiniiformes					
Squatinaidae					
Squatina californica	ARNr 18S		1775	AY049858	Winchell et al., non publié
	ITS2/ARNr 28S		3970	AY049857	Winchell et al., non publié
	ARNr 5,8S/ITS2		592	AY049856	Winchell et al., non publié
	ARNr 12S/ARNr/ARNr 16S			AY147886	Douady & al., 2003

Carcharhinus albimarginatus-NCC038-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT TAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATCCGCGCA ATTCGGGTCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATATTA ATTCAACTAG ATCTTATAAA TCCAATCCAT GTTACAATTT TTAACCAAAA CATTCTTAAC CTTTCAGTAT GGGCGACAGA
0201 ACATTAACCC CAGCGCAATA ACTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAAA GAAATGAAAC AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATT ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTCAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTAGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTATCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTCACTATC TAGACAAGAC TTGCTCGTCA AAGAAATFCA TAAAAATFCA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AACCTTCTA AACCAAGACA
0601 CAACTTTTTA AGGTGGGAAA TGATCATAAT TATTAAGGTT ACCATCCCAG TGGGCCTAAA AGCAGCCACC TGTAAAGTAA GCGTCGCAGC TCTAATCCAA
0701 TAACTAAACC TTTAATTCAG ACATTCATTC ACAACCCCTT TTATCTTATT GGGTTATTTT ATATCTATAT AAAAGAAGTT ATGCTAAAAAT GAGTAATAAA
0801 GAGAATAAAT CTCTCCCGAC ACAAGTGTAT GTCAGAAAAG ATTAATACAC TGATAATFCA ACGACTCCAA ACTGAGGCCA TTATATCATT TAATCATCAA
0901 CTAGAAAATC CTATTCCTCT ACTCGTTATC CCTACACAGG AGTGTCAATC GAAAGATTA AAAGAAAATA AAGGAACTCG GCAAAACATA ACTCCGCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGACAAAAC ATAAGAGGTC CCGCTGCCC TGTGACAACG TTCAACGGCC GCGGTATTTT GACCGTGCAA GGTAGCGTAA
1101 TCACTTGCTC TTTAAATGAA GACCTGTATG AAAGGCAT

Carcharhinus amblyrhynchos-MNHN2002-1183-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT TAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATCCGCGCA ATTCGGATCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATATCA ATTCAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCCAT ATTACAATTT TCAATCAAAA CATTCTCAAC CTTTCAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAACCC TAGCGCAATA GCCTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAAA GAAATGAAAT AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATC ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTCACTATC TAGACAAGAC TTACTCGTCA AAGAAACTTA TAAGAATFCA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AACCTTCTA AACCAAGACA
0601 CAACTTTTTA AGGTGGGAAA TGATCATAAT TATCAAGGTT ACCATCTCAG TGGGCCTAAA AGCAGCCACC TGTCAAGCAA GCGTCGCAGC TCTAATCTAA
0701 TAACTAAACC TTTAATCCAG ATATTCATTC ACAACCCCTT TTATCTTATT GGGTTATTTT ATATTTATAT AAAAGAAGTT ATGCTAAAAAT GAGTAATAAA
0801 GAGAACAAAT CTCTCCCGAC ACAAGTGTAC GTCAGAAAAG ATTAATACAC TGATAATFCA ACGACCCCAA ACTGAGGTCA TTATATCACT TAATCATCAA
0901 CTAGAAAATC CTATTCCTCT ACTCGTTATC CCTACACAGG AGTGTACCA GAAAGATTA AAAGAAAATA AAGGAACTCG GCAAAACATA ACTCCGCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGACAAAAC ATAAGAGGTC CCGCTGCCC TGTGACAACG TTCAACGGCC GCGGTATTTT GACCGTGCAA AGGTAGCGTA
1101 ATCACTTGTC TTTAAATGA AGACCTGTAT GAAAGGCAT

Carcharhinus brevipinna-MNHN-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT CAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATCCGTGCA ATTCGGATCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATATTA ATTCAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAT ATTACAATTT TTAATCAAAA CATTCTTAAC CTTCTAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAACCC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAAA GAAATGAAAT AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATT ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTCACTATC TAGACAAGAC TTACTCGTCA AAGAACTTA TAAGAATFCA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AGCCCTTCTA AACTAAGACA
0601 CAACTTTTTA AGGTGGGAAA TGATCATAAT TATTAAGGTT ACCATCTCAG TGGGCCTAAA AGCAGCCACC TGTAAAGTAA GCGTCGCAGC TCTAATCTAA
0701 TAATTAACC TCTAATTCAG ATATCCATTC ACAACCCCTT TCATCTTATT GGGTTATTTT ATATTTATAT AAAAGAAGTT ATGCTAAAAAT GAGTAATAAA
0801 GAGAATAAAT CTCTCCCGAC ACAAGTGTAC GTCAGAAAAG ATTAATACAC TGATAATFCA ACGACCCCAA ACTGAGGTCA TTATATCACT TAAACATCAA
0901 CTAGAAAACC CTATTCCTCT ACTCGTTATC CCTACACAGG AGTGTCAATC GAAAGATTA AAAGAAAATA AAGGAACTCG GCAAAACATA ACTCCGCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGATAAACC ATAAGAGGTC CCGCTGCCC TGTGACAATG TTCAACGGCC GCGGTATTTT GACCGTGCAA AGGTAGCGTA
1101 ATCACTTGTC TTTAAATGA AGACCTGTAT GAAAGGCAT

Carcharhinus falciformis-HUMZ133174-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT TAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TACCCGCGCA ATTCGGGTCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATATTA ATTCAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAT ATTACAATTT TCAATTAAAA CATTCTTAGC CTTTCAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAACCC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAC AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATC ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTAGCAAAAG AGTGGGGAGA CTTCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTTCACCGT CTAGACAAGA CTTACTCGTC AAAGAAATCT ATAAGAATTA ATAGTTATTT AGAAGAGGTA CAACCCCTCT AAACCAAGAC
0601 ACAACTTTTT AAGGTGGGAA ATGATCATAA TTATTAAGGT TACAATCTCA GTGGCCTAA AAGCAGCCAC CTGTTAAGTA AGCGTCGCAG CTCTAATCTA
0701 ATAATAAAC CTTTAATTC A GATATTCATT CACAACCCCT TTTATCTTAT TGGGTATTTT TATATTTATA TAAAAGAACT TATGCTAAAA TGAGTAATAA
0801 AGAGAATAAA TCTCTCCCGA CACAAGTGTA CGTCAGAAA AATTAATCA CTGATAATTA AACGACCCCA AACTGAGGTC ATTATATCAT TTAATCATCA
0901 ACTAGAAAAC CCTATTCCCT TACTCGTTAT CCCTACACAG GAGTGTCTAT AGGAAAGATT AAAAGAAAAT AAAGGAACCT GGCAACACA AACTCCGCCT
1001 GTTTACCAAA AACATCGCCT CTTGACAAAC CATAAGAGGT CCCGCTGCC CTGTGACAAC GTTCAACGGC CGCGTATTTT TGACCGTGCA AAGGTAGCGT
1101 AATCACTTGT CTTTTAAATG AAGACCTGTA TGAAAGGCAT

Carcharhinus leucas-HK2-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATCTGTGCA ATTCAGATCA TTTTGAACCT
0101 TAAAGCTAGC CTATATATTA ATTCAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAT ATTATAGTTT TTAATCAAAA CATTCTCAAC CTCTCAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAACCC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAT AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATG ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACATC GAAGCAGCAT TATAGGGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCAAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTTCACTAT CTAGACAAGA CTTACTCGTC AAAGAATCT ATAAGAATTA ATAGTTATTT AGAAGAGGTA CAACCCCTCT AAATCAAGAC
0601 ACAACTTTTT AAGGTGGGAA ATGATCATAA TTATTAAGGT TACCATCTCA GTGGCCTAA AAGCAGCCAC CTATTAAGTA AGCGTCGCAG CTCTAATCTA
0701 ACAATTAAC CTTTAATCCA GATATTCATT CACAACCCCT TTCATTCTAT TGGGTATTTT TATATTTATA TAAAAGAACT TATGCTAAAA TGAGTAATAA
0801 AGAGAATAAA TCTCTCCCGA CACAAGTGTA TGTCAGAAA AATTAATCA CTGATAATTA AACGACCCCA AACTGAGGTC ATTATATCAC AATCAATCAA
0901 CTAGAAAACC CTATTTTCTT ACTCGTTACC CCTACACAGG AGTGTCTATCA GGAAAGATTA AAAGAAAATA AAGGAACCTG GCAACATAA ACTCCGCCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGATAAACT ATAAGAGGTC CCGCTGCC TGTGATAATG TTCAACGGCC GCGGTATTTT GACCGTGCAA AGGTAGCGTA
1101 ATCACTTGTC TTTTAAATGA AGACCTGTAT GAAAGGCAT

Carcharhinus limbatus-NCC001-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTCGCTAAAT TAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATTCGTGCA ATTCGAATCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATACTA ATTCAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAC ATTACAATTT TTAATCAAAA CATTCTTAC CTTTITAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAACCC CAGCGCAATA GCTCATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAC AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATT ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATTTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAC TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTTACCAT CTAACAAGA TTTACTTGTT AAAGAAACCTA TAAGAATTA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AGCCCTTCTA AATCAAGATA
0601 CAACTTTCTA AGGTGGGAA ATGATCATAA TTTACTAAGT CACCATCTCAG TGGGCCTAAA AGCAGCCATC TGTTAAGTAA GCGTCGCAGC TCTAATCTAA
0701 TAATAACCTT TAATCCAGA TATTCATTCA CAACCCCTT CATTCTATTGG GTTATTTTAT ATTTATATAA AAGAACTTAT GCTAAAATGA GTAATAAAGA
0801 GAATAAATCT CTCCCGACA CAAGTGATG TCAGAAAGAA TTAATCGCTG ATAATTAAC GACCCCAAC TGAGGTCATT ATATCACTTA ACCATTAACT
0901 AGAAAACCTT ATTCTACA ATCGTTAACC CTACACAGGA GTGTCTCAGG AAAGATTAAG AGAAAATAA GGAACCTGGC AAACACAAC TCCGCCTGTT
1001 TACCAAAAAC ATCGCCTCT TGATAAACCA TAAGAGGTCC TGCCTGCCCTG TGACAATGTT CAACGGCCGC GGTATTTTGA CCGTGCAAAAG GTAGCGTAAT
1101 CACTTGCTCT TTAATGAA GACCCGTATG AAAGGCAT

Carcharhinus longimanus-NCC050-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT CAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATCCGTGCA ATTCGAATCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATATCA ATTCAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAT ATTATAACTT TTAATCAAAA CATTCTCAAC CTTTCAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAACCC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAC AAATCATCAA AGTACTAAAA AGCAGAGATC ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGAGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTTCACTAT CTAGACAAGA CTTACTCGTC AAAGAAATCT ATAAGAATTA ATAGTTATTT AGAAGAGGTA CAACCCCTTCT AAACCAAGAC
0601 ACAACTTTTT AAGGTGGGAA ATGATCATAA TTATTAAGGT TACCATCTCA GTGGGCCTAA AAGCAGCCAC CTGTCAAGTA AGCGTCGCAG CTCTAATCTA
0701 ATAATTA AAC CTTTAATCCA GATATCTACT CACAACCCCT TTTATCTTAT TGGGTTATTT TATATATAT AAAAGA ACTT ATGCTAAAA GAGTAATAAA
0801 GAGAACAAAT CTCTCCGAC ACAAGGTGAC GTCAGAAAGA ATTAATCAC TGATAATTAA ACGACCCCA ACTGAGGTCA TTATATCACT TAACCATTAA
0901 CTAGAAAACC CTATTCCTCT ACTCGTTATC CCTACACAGG AGTGTCACTA GGAAGATTA AAAGAAAATA AAGGAACTCG GCAACACAAA ACTCCGCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGATAAACC ATAAGAGGTC CCGCTGCC TGTGATAATA TTCAACGGCC GCGGTATTTT GACCGTGCAA AGGTAGCGTA
1101 ATCACTTGTC TTTTAAATGA AGACCTGTAT GAAAGGCAT

Carcharhinus melanopterus-MNHN2002-1203-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT CAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGAAGA TATCCGCGCA ATTCGGATCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATACACTA ACCCAACTAG ACTTTATAAA TTTAATCTAC ACTACAAACC CTAACAAAA CATTCTCAAC CTTTCAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAAATC CAGCGCAATA GCTCATGTAC CGTAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAC AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATT ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTTCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAC TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTAAAA GCCTATCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTCAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTCAACCATC TAAACAAGAC TTACTTGTTA AAGAAGCCTA TAAGAATTAA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AGCCCTTCTA AACCAAGATA
0601 CAACTTTCTA AAGGTGGGAA TGATCATAAT TACTAAGGTT ACCATCTTAG TGGGCCTAAA AGCAGCCATC TGTTAAGTAA GCGTCGCAGC TCTAATCTAA
0701 TAACCAAACC TTTAATCCAG ATATCCATTC ACAGCCCTCT TATCTATTG GGTATTTTTA TACTTATATA AAAGAACTTA TGCTAAAAATG AGTAATAAAG
0801 AGAACAAATC TCTCCGACA CAAGTGTATG TCAGAAAGAA TTAATCACT GATAATTA AA CGATCCCAA CTGAGGTCA TATATCACTT AACTATCAAC
0901 TAGAAAACC TATTCCCTCA ACCGTTATCC CTACACAGGA GTGTTATCAG GAAAGATTAA AAGAAAATA AGGAACTCG CAAACACAAA CTCCGCTGT
1001 TTACCAAAA CATCGCCTCT TGATAAACC TAAGAGGTC CCGCTGCC TGTGACAATG TCAACGGCC GGGTATTTT ACCGTGCAA GGTAGCGTAA
1101 TCACTTGCT TTTAATGAA GACCTGTATG AAAGGCAT

Carcharhinus plumbeus-MNHN2002-1175-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATCCGCGCA ATTCGGGTCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATATTA ACTCAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAC ATTATAACTT TTAACAAAA CATTCTCAAC CTTTCAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAACCT CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAC AAATCATCAA AGTACTAAAA AGCAGAGATC ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTTC GAAGCAGCAC TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCAAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTTCAACCT CTAGACAAGA CTTACTCGTC AAAGAAATTT ATAAGAATTA ATAGTTATTT AGAAGAGGTA CAACCCCTTCT AAACCAAGAC
0601 ACAACTTTTT AAGGTGGGAA ATGATCATAA TTATTAAGGT TACTATCCCA GTGGGCCTAA AAGCAGCCAC CTGTTAAGTA AGCGTCGCAG CTCTAATCTA
0701 ATAATTA AAC CTTTAATTC GATATCCAT CACAACCCCT TTCATCTTAT TGGGTTATTT TATATATATA TATAAAGAA CTTATGCTAA AATGAGTAAT
0801 AAAGAGAACA AATCTCTCCC GACACAAGTG TATGTCAGAA AGAATTAAT CACTGATAAT TAAACGACC CAAACTGAGG TCATTATATC ACTTAACCAT
0901 CAACTAGAAA ACCCTATTCC CTTACTCGTT ATCCCTACAC AGGAGTGTC CCAGGAAAGA TTTAAAGAAA ATAAAGGAAC TCGGCAACA CAACTCCGC
1001 CTGTTTACCA AAAACATCGC CTCTTGATAA ACCATAAGG GTCCCGCTG CCCTGTGACA ATGTTCAACG GCCGCGGTAT TTTGACCGTG CAAAGGTAGC
1101 GTAATCACTT GTCTCTTAAA TGAAGACCTG TATGAAAGGC AT

Carcharhinus sorrah-NCC008-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT TAGTAAAGTA CCTCCCTTAC ACTGAGGGGA TATCCGTGCA ATTCGGATCA TTTTGAACCT
0101 TAAAGCTAGC CTATATACCA ACTCAACTAG ACCCTATAAA TCTAATTTAC ATTTTAAACCT TTTAACCAAA ACATTCTCAA CCTTTCAGTA TGGGTGACAG
0201 AACATAAACC TCCAGCGCAA TAGCTTATGT ACCGCAAGGG AAAGCTGAAA AAGAAATGAA ACAAATCATT AAAGTACTAA AAAGCAGAGA TCACCCCTCG
0301 TACCTTTTGC ATCATGATTT AGCTAGAAAA ACTAGGCAAA AAGACCTTAA GTCTATCTCC CCGAAACTAA ACGAGCTACT CCAAAGCAGC ATTATAGAGC
0401 TAACCCGTCT CTGTGGCAAA AGAGTGGGAA GACTTTCGAG TAGCGGTGAA AAGCCTACCG AGTTTGTGTA TAGCTGGTTA CCCAAGAAAA GAACCTTAGT
0501 TCTGCATTAA TTTTTCACCA TCTAGACAAG ACTTACTCGT CAAAGAAATC TATAAGAATT AATAGTTATT TAGAAGAGGT ACAACCCCTC TAAACCAAGA
0601 CACAACCTTT TAAGGTGGGT AATGATCATA ATTATTAAGG TTAACATCTC AGTGGGCCTA AAAGCAGCCA CCTGTAAAGT AAGCGTCGCA ACTCTAATCT
0701 AATAATTAHA CCTCTAATTC AGATATTCAT TCACAACCCC CTTTATCCTA TTGGGTATT TTTATTTTAT AAAAGAAGCT ATGCTAAAAAT GAGTAATAAA
0801 GAGAACAAT CTCTCCGAC ACAAGTGTAT GTCAGAAAGA ATTAATCAC TGATAATTAA ACAACCCCAA ACTGAGGTCA TTATATCACT TAACCATTAA
0901 CTAGAAAAAC CTATTCCTCT ACTCGTTATC CCTACACAGG AGTGTCAACA GGAAAGATTA AAAGAAAAATA AAGGAACTCG GCAAACACAA ACTCCGCCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGATAAACT ATAAGAGGTC CCGCTGCC TGTGATAATC TTCAACGGCC GCGGTATTTT GACCGTGCAA AGGTAGCGTA
1101 ATCACTTGTC TTTTAAATGA AGACCTGTAT GAAAGGCAT

Carcharhinus obscurus-HUMZ185257-16S



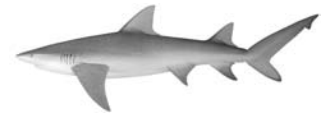
0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT CAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATCCGTGCA ATTCGGATCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATACCA ATTTAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAT ATTATAATTT TTAATCAAAA CATTCTCAAC CTTTTAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAAACC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAAA GAAATGAAAC AAACCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATC ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTCACTATC TAGACAAGAC TTACTCGTCA AAGAAATCTA TAAGAATTAA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AACCTTCTA AACCAAGACA
0601 CAACTTTTTA GGGTGGGAAA TGATCATAAT TATTAAGGTT ACCATCTCAG TGGGCCTAAA AGCAGCCACC TGTCAAGTAA GCGTCGCAGC TCTAATCTAA
0701 TAATCAAACC TTTAATCCAG ATATTTACTC ACAACCCCTT TTATCTTATT GGGTTATTTT ATATTTATAT AAAAGAAGCT ATGCTAAAAAT GAGTAATAAA
0801 GAGAATAAAT CTCTCCGAC ACAAGTGTAC GTCAGAAAGA ATTAATCAC TGATAATTAA ACGACCCCAA ACTGAGGTCA TTATATCACT TAACCATCAA
0901 CTAGAAAAAC CTATTCCTCT ACTCGTTATC CCTACACAGG AGTGTCAACA GGAAAGATTA AAAGAAAAATA AAGGAACTCG GCAAACACAA ACTCCGCCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGATAAACC ATAAGAGGTC CCGCTGCC TGTGATAATG TTCAACGGCC GCGGTATTTT GACCGTGCAA AGGTAGCGTA
1101 ATCACTTGTC TTTTAAATGA AGACCTGTAT GAAAGGCAT

Carcharhinus galapensis-C12-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT CAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TATCCGTGCA ATTCGGATCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATACCA ATTTAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAT ATTATAATTT TTAATCAAAA CATTCTCAAC CTTTTAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAAACC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAAA GAAATGAAAC AAACCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATC ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTCACTATC TAGACAAGAC TTACTCGTCA AAGAAATCTA TAAGAATTAA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AACCTTCTA AACCAAGACA
0601 CAACTTTTTA AGGTGGGAAA TGATCATAAT TATTAAGGTT ACCATCTCAG TGGGCCTAAA AGCAGCCACC TGTCAAGTAA GCGTCGCAGC TCTAATCTAA
0701 TAATCAAACC TTTAATCCAG ATATTTACTC ACAACCCCTT TTATCTTATT GGGTTATTTT ATATTTATAT AAAAGAAGCT ATGCTAAAAAT GAGTAATAAA
0801 GAGAATAAAT CTCTCCGAC ACAAGTGTAC GTCAGAAAGA ATTAATCAC TGATAATTAA ACGACCCCAA ACTGAGGTCA TTATATCACT TAACCATCAA
0901 CTAGAAAAAC CTATTCCTCT ACTCGTTATC CCTACACAGG AGTGTCAACA GGAAAGATTA AAAGAAAAATA AAGGAACTCG GCAAACACAA ACTCCGCCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGATAAACC ATAAGAGGTC CCGCTGCC TGTGATAATG TTCAACGGCC GCGGTATTTT GACCGTGCAA AGGTAGCGTA
1101 ATCACTTGTC TTTTAAATGA AGACCTGTAT GAAAGGCAT

Negaprion acutidens-MNHN2002-1201-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAC TAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TACCCGCGCA AATCGAGTCA TTTTGAACCT
0101 TAAAGCTAGC CTACACATCT ACTTAACTAA ACTTTATAAA TCCAATCTAC ATAATTACTT CTAACCAAAA CATTCTCAAC CTTTCAGTAT GGGCGACAGA
0201 ACAATAACCC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAT AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATT ACACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTACCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGTAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GTGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTCAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTCACTATC TAAACAAGAC TTACTCGTTA AAGAAATCCA TAAGAATTAA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AACCTTCTA AACCAAGACA
0601 CAACCTTTTA AGGTGGGAAA CGATCATAAT TATCAAGGTT ACTATCCAG TAGGCCATAA AGCAGCCATC TGTAAAGTAA GCGTCACAGC TCTAATCTAA
0701 TAATCAAACC TATAATCTAG ATATCTATTC ACAACCCCTT TATCTATTG GGTATTTTTA TATTCCTATA AAAGAACTTA TGCTAAAATG AGTAATAAAG
0801 AGAACAAATC TCTCCGACA CAAGTGTATG TCAGAAAGAA TTAATCACT GATAATCAA CGACCCAAA CTGAGGTCAT TATACCATCT AACATTAAC
0901 TAGAAAAACC TATTCTTCTA CTCGTTATTC CTACACAGGA GTGTCACAGG GAAAGATTAA AAGAAAATAA AGGAACTCGG CAAACATTAA CTCGCTGT
1001 TTACCAAAAA CATCGCTCT TGATAAACCA TAAGAGGTCC CGCCTGCCCT GTGATAACAT TTAACGGCCG CGGTATTTTG ACCGTGCAAA GGTAGCGTAA
1101 TCACTTGCTCT TCCAAATAAA GACCTGTATG AAAGGCAT

Triaienodon obesus-NCC013-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAACCAAAAT GTGGCTAAAC TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGGGA CATCCGTGCA ACTCGGATCA TTTTGAACCC
0101 TAAAGCTAGC CTATATACTA ACTCAACTAG ACCTTATAAA TCTAATCTAT ACTACAATTT TTAACATAAA CATTCTCAAC CTTTTAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATTACCC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAC AAATCACTAA AGTACCATAA AGCAGAGATT ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTATCCTCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAC CATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTTACTACC TAAACAAGAC TTTCTTATCA AAGAAATCCA TAAAAATTAA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AGCCCTTCTA AACCAAGACA
0601 CAACCTTTTA AGGTGGGAAA AGATCATAAT TATTAAGGTT ACCATCCAG TGGGCCATAA AGCAGCCACC TGTCAAGTAA GCGTCGCAGC TCTAATCTAA
0701 CAATTAAACC TTTAATTCAG ATATTTATTC ACAACCCCTT TTATCTATT GGGTTATTTT ATATTTATAT AAAAGAACTT ATGCTAAAAT GAGTAATAAG
0801 AGAACAAATC TCTCCGACA CAAGTGTATG TCAGAAAGAA TTAATCACT GATAATTAAA CGACCCAAA CTGAGGTCAT TATATCACTT AACCATTAAC
0901 TAGAAAAACC TATTCCCTA CTCGTTACCC CTACACAGGA GTGTCATCAG GAAAGATTAA AAGAAAATAA AGGAACTCGG CAAACACAAA CTCGCTGT
1001 TTACCAAAAA CATCGCTCT TGATAAACCA TAAGAGGTCC CGCCTGCCCT GTGACAATGT TCAACGGCCG CGGTATTTTG ACCGTGCAAA GGTAGCGTAA
1101 TCACTTGCTCT TTTAAATGAA GACCCGTATG AAAGGCAT

Galeocerdo cuvier-T006-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT CAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TACCCGTGCA ATTCGAGTCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTACACACCA ATTTAACTAG ACCTAATAAA TCTAATTTAC ATTACAACCT TAAACCAAAA CATTCTTAA CTTTTAGTAT GGGCGACAGA
0201 ACAATAACCT TAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAC AGCTGAAAA GAAATGAAAT AAATCATTAA AGTATTAAAA AGCAGAGATT ACACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGGCAAAAA GATTTTAAGT CTACCTCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGTAC TATAGAACCA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GTGGTGAAAA ACCTATCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTAATATTT AAACAAGACT TACTCGTTAA AAGACCTATA AGAATTAATA GTTATTTAGA AGAGGTACAA CCCTTCTAAA CCAAGATACA
0601 ACTTTTAAAG GTGGGAAATG ATCATAATTA TTAAGGTTGT TCCATCAGTG GGCCTAAAAG CAGCCATCTG TAAAGCAAGC GTCACAGCTC CAGCCTAACA
0701 ATTAACCTAT AATTTAGATA TTTACTCAAA ACCCCCTTTA TCCTATTGGG TTATTTTATA AAAATATAAA AGAACTTATG CTAAAATGAG TAATAAAGAG
0801 AACAAATCTC TCCCGACACA AGTGTATATC AGAAAAGAA TAAATCACTG TAATTAACA GCCCCAACT GAGGTCATCA TATCACTTAA TCATTAACCTA
0901 GAAAATCCTA TTCTTTTACT CGTTAACCTT ACACAGGAGT GTCACCAGGA AAGATTAATA GAAAATAAAG GAACTCGGCA AACACAACT CCGCTGTTT
1001 ACCAAAAACA TCGCTCTCG TTAACCATG AGAGGTCCCG CCTGCCCTGT GACAATGTC AACGGCCGCG GTATTTTGAC CGTGCAAAGG TAGCGTAATC
1101 ATTTGTCTTT TAAATGAAGA CCCGTATGAA AGGCAT

Prionace glauca-S464-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ATCGAGAAGA TATCCGCGCA ATTCGGATCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTATATACTA ATTTAACTAG ACCTTATAAA TCTAATTTAT ATTATAATTT TTAACCAAAA CATTCTCAAC CTTTCAGTAT GGGTGACAGA
0201 ACAATAAACCC CAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA CGCTGAAAA GAAATGAAAT AAATCATTAA AGTACTAAAA AGCAGAGATT ATTCCCTGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAT TAGGCAAAAA GACCTTAAGT CTACCTTCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAGAAAAGA ACTTTAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTTATCATC TAGACAAGAC TTACTCGTCA AAGAAATTTA TAAGAATTAA TAGTTATTTA GAAGAGGTAC AACCTTCTA AACCAAGACA
0601 CAACCTTTTA AGGTGGGAAA TGATCATAAT TATTAAGGTT ACCATCTCAG TAGGCCTAAA AGCAGCCACC TGTTAAGTAA GCGTCACAGC TCTAATTTAA
0701 TAATTA AACCTTCTCT ATATTCATTC ACAACCCCTT TTATTTCTATT GGGTTATTTT ATATTTATAT AAAAGA ACTT ATGCTAAAA GAGTAATAAA
0801 GAGAATAAAT CTCTCCGAC ACAAGTGTAC GTCAGAAAGA ATTAATCAC TGATAATTAA ACGGCCCAA ACTGAGGTCA TTATATTATT TAATCATCAA
0901 CTAGAAAAAT CTATTCCTCT ACCCGTTATC CCTACACAGG AATGTCAATCA GGAAGATTA AAAGAAAATA AAGGAACCTG GCAACACAAA ACTCCGCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGACAAACC ATAAGAGGTC CCGCTGCC TGTGACAAAC GTTCAACGGC CGCGGTATTT TGACCGTGA AAGGTAGCGT
1101 AATCACTTGT CTTTAAATG AAGACCTGTA TGAAAGGCAT

Sphyrna lewini-T033-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTAGCTAAAT CAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACTGAGGGAA TACCCGTGCA ACTCGGGTCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTACACACCA ACTCACTAG ACCCAATAAA TCTAATTTAC ACTACAATTT TCAATTA AAA CATTCTAAAC CTTTTAGTAT GGGCGACAGA
0201 ACAATAACCT TAGCGCAATA GCTTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAC AAATTATTA AGTACTAAAA AGCAGAGTTT ATACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAT TAGGCAAAAA GATTTTAAGT CTACCTTCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGTAGCAT TATAGAGCTA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA GCGGTGAAAA GCCTACCAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAAAAAGA ACTTCAGTTC
0501 TGCATTAATT TTTTATTACC CAAACAAGAC CTCCTTATTA AAGGAACCCA TAAGAATTAA CAGTTATTTA GAAGAGGTAC AGCCCTTCTA AACTAAGATA
0601 CAACCTTTTA AGATGGGAAA TGATCACAAT CATCAAGGTT ACCCCCTCAG TGGGCCTAAA AGCAGCCACC TGTAAGCAA GCGTCGCAGC TCCAGCTCAA
0701 CAACCAAACC TTCAATCCG ATACATATTC ACTACCTCTT TTATCTTATT GGGTTATTTT ATAAAAATAT AAAAGAATTT ATGCTAAAA GAGTAATAAA
0801 GAGAACAAAT CTCTCCGAC ACAAGTGTAT GTCAGAAAGA TTAATCACT GATAATTA AAA CGCCCCAAA CTGAGGCCAT TATATCATT AAACATTAAC
0901 CAGAAAACCC TATTCTTCCA CCCGTTAATC CTACACAGGA GTGTCACCAG GAAAGATTA AAGAAAATA AGGAACCTCG CAAACATAAA CTCCGCTGT
1001 TTACCAAAA CATCGCCTCT TGCTAAACCA TAAGAGGTC CCGCTGCC TGTGACAATGT TCAACGGCCG CGGTATTTTG ACCGTGCAAA GGTAGCGTAA
1101 TCACTTGTCT TTTAAATGAA GACCCGTATG AAAGCCAT

Sphyrna zygaena-T007-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAAAT GTGGTTAAAC CAGCAAAAAC CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TACCCGTGCA ACTCGGGTCA TTTTGAACCT
0101 CAAAGCTAGC CTACACACCA ACTTTAACCA AACCTAATAA ATCTAATTA CATTATAATT TTCAACCAA ACATTCTCAA CTTTTAGTA TGGGTGACAG
0201 AACATAA ACT CCAGCGCAAT AGCTTATGTA CCGCAAGGGA AAGGTGAAAA AGAAATGAAA TAAACCATTA AAGTACTAAA AAGCAGAGAT TATACCTCGT
0301 ACCTTTTGCA TCATGATTTA ACTAGAAAA TTAGGCAAAA AGACTTTAAG TCTACCTCCC CGAAACTAAA CGAGCTACTC CGAAGCAGCA TTATAGAGCT
0401 AACCCGTCTC TGTGGCAAAA GAGTGGGAAG ACTTCCGAGT AGTGGTGAAA AGCTACCAG GTTTAGTGAT AGCTGGTTAC CAAAAAAG AACTTCAATT
0501 CTGCATTAAT TTTTAACTAC CTAACAAGA CTTCTAGTC AAAGGA ACT ATAAGAATTA ATAGTTATTT AGAAGAGGTA CAGCCCTTCT AAACCAAGAT
0601 ACAACTTTTT AAGATGGGAA ATGATCACAA TTATCAAGGT TACTCCCTCA GTGGCCTAA AAGCAGCCAC CTGTAAAGCA AGCGTCGCAG CTCCAGCTCA
0701 ACAACCAAAC CTTTAAATTT GATATCTACT CATTACCCTT TTTATCCCTAT TGGGTATTTT TATAAAAATA TAAAAGA ACT TATGCTAAAA TGAGTAATAA
0801 AGAGAATAAA CCTCTCCGA CACAAGTGTG TGTCAGAAGA ATTAATCAC TGATAATTAA AACGGCCCA AACTGAGGCC ATTATATTAT TTAATCATTA
0901 ACCAGAAAAC CCTATTCTTC CACCCGTAA CCTACACAG GAGTGCACC AGGAAAGATT TAAAGAAAAT AAAGGA ACT GGCAACATA AACTCCGCT
1001 GTTTACAAA AACATCGCCT CTGTGAAAAC CATAAGAGGT CCCGCTGCC CTGTGACAAT GTTCAACGGC CGCGGTATTT TGACCGTGA AAGGTAGCGT
1101 AATCACTTGT CTTTAAATG AAGACCTGTA TGAAAGGCAT

Alopias pelagicus-T034-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCCTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAC CAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TACCCGTGCA ATTCGAGTCA TTTTGAACAT
0101 TAAAGCTAGC CTGTATACCT AACCTTATAA CCTAACCTTA TTAACCTACCT TATACACAAA TCCATAATTA AAACATTTTA CATTTTTAGT ATGGGCGACA
0201 GAACAAAAAC TCAGCGCAAT AGACCATGTA CCGGAAGGGA AAGCTGAAAA AGAAATGAAA TAAATAATTA AAGTAACAAA AAGCAGAGAT TTAACCTCGT
0301 ACCTTTTGCA TCATGATTTA GCTAGAAAAA CTAGACAAAG AGATCTTAAG CCTATCCCCC CGAAACTAAA CGAGCTACTT CGAAGCAGCA TAAATAGAGC
0401 CAACCCGTCT CTGTGGCAAA AGAGTGGGAA GACTTCCGAG TAGCGGTGAC AAACCTATCG AGTTTAGTGA TAGCTGGTTG CCTAAGAAAA GAACCTTAAT
0501 TCTGCATTAA TTCCTTCATC ACCAAAAAGT CTATCTTATT AAGGTCAAAC ATAAAAATTA ATAGTTATTC AGAAGAGGTA CAGCCCTTCT GAACCAAGAT
0601 ACAACTTTTA AAGGCGGAAA ATGATCATAT TTACCAAGGT TTCTACCTCA GTAGGCTCAA AAGCAGCCAC CTGTAAGATA AGCGTCACAG TTCAGGTCC
0701 TCGAAAACTT ATAATTTAGA TATTTTCTCA TAACCCCTT AACCCATATT AGGCTATTTT ATAAAAATTA AAAAGAAGCT ATACTAAAAAT GAGTAATAAG
0801 AGAACAAACC TCTCCAGACA CGAGTGTATG TTAGAAAGAA TTAATCACT AACAATTAAC CGAACCCAGA TTGAGGCTAT TATATTAACA TTACTTCTGT
0901 TAACTAGAAA ATCCTATTAC ATTACTCGTT AACCTTACAC AGGAGTGTCT TATGAAAAGA TTAAGAGAAA ATAAAGGAAC TCGGCAAAACA CAAACTCCGC
1001 TTACCAAAAA CATCGCTCT TGAATATTAT AAGAGGTCCC GCCTGCCTTG TGACAATGTT TTAACGCGCC CGGTATTTTG ACCGTGCAAA GGTAGCGTAA
1101 TCACTTGTCT CTTAAATGAA GACCCGTATG AAAGGCAT

Alopias superciliosus-T021-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCCTTG GAATCAAAAC GTGGCTAAAT TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAAA TACCCGTGCA ATTCGAGTCA TTTTGAACAT
0101 TAAAGCTAGC CTGTATACCT ACCTACAACC TAACCTTATT AATTACCTTA TATATTAATA CCTAACTAAA ACATTTTACC TTTTLAGTAT GGGCGACAGA
0201 AACAAAAACT CAGCGCAATA GACTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAAA GAAATGAAAC AAATAATTA AGTAATAAAA AGCAGAGATT TAACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGACAAAGA GATCTTAAGC CTATCCCCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAC GATAGAGCAA
0401 ACCCGTCTCT GTGGCAAAAG AGTGGGAAGA CTTCCGAGTA CCGGTGACAA GCCTACCGAG TTTAGTGATA GCTGGTTACC CAAAAAAGA ACTTTAATTC
0501 TGCATTAATT CCTTTTCCAC CAAAGAGTCC ATCTTACCAA GGTAAACAT AAAAATTAAT AGTTATTCAG AAGAGGAACA GCCCTTCTGA ACTAAGATAC
0601 AACTTTTAAA GGTGGTAAAT GATCATATTC ACCAAGGTTT TTACCTCAGT GGGCCAAAAA GCAGCCATCT GTAAAGTAAG CGTCACAGCT CCAGTCTCAC
0701 AAAAACCTAT AATTTAGATA TTTTCTCAT AATCCCTTA ACTATATTGG GTTATTTTAT AAAATTAATA AAGAAGTAT GCTAAAATGA GTAATAAGAG
0801 GACTAACCTC TCCAAACACA AGTGTATGTC AGAAAAGAAAT AAATCACTGA CAATTAACAG AACCCAGACT GAGGTCATTA TACTAATATT ACCTTAACCTA
0901 GAAAATCTTA TCATAACATT CGTTAACCCCT ACACAGGAGT GTCTTAAGGA AAGATTTAAA GAAAATAAAG GAACTCGGCA AACACAACT CCGCCTGTTT
1001 ACCAAAAACA TCGCCTCTTG AACATTATAA GAGGTCCCGC GTGCCTGTG ACAATGTTTT AACGCGCGG GTATTTTGAC CGTGCAAAGG TAGCGTAATC
1101 ACTTGTCTCT TAAATGAAGA CCCGTATGAA AGGCAT

Alopias vulpinus-DPS0138-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCCTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAT TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAAA TACCCGTGCA ATTCGAGTCA TTTTGAACAT
0101 TAAAGCTAGC CTGTATACCT TAACCTAAA CCTAACCTTA TTAATATACC TTATATGTTA AATCATAACT AAAACATTTT AACCTTTTAG TATGGGCGAC
0201 AGAACAAAAA CCAGCGCAAT AGATTATGTA CCGCAAGGGA AAGCTGAAAA AGAAATGAAA CAAATAATTA AAGTAACGAA AAGCAGAGAT TCAACCTCGT
0301 ACCTTTTGCA TCATGATTTA GCTAGAAAAA CTAGACAAAG AGATCTTAAG CCTACCTTCC CGAAACTAAA CGAGCTACTC CGAAGCAGCA CAATTTTAGA
0401 GCCAACCCGT CTCTGTGGCA AAAGAGTGGG AAGACTTCCG AGTAGCGGTG ACAAGCCTAT CGAGTTTAGT GATAGCTGGT TGCCCAAGAA AAGAACTTTA
0501 ATTCTGCATT AATTTCTTCA CCACCAAAAC AAGTCTATCT TATTAAGGGT TAAACATAAA AATTTATAGT TATTGAGAAG AGGTACAGCC CTCTGAACT
0601 AAGATACAAC TTTTCAAGGC GAAAAATGAT CATACTTACC AAGTTTTTTA CCTCAGTGGG CCCAAAAAGCA GCCATCTGTA AAGTAAGCGT CACAGCTCCA
0701 GTCTCACAAA AACCTATAAT TTAGATATCC TCTCATAAAC CCCTTAACCA TTACTGGGCT ATTTTATAAA ATTATAAAG AACCTATGCT AAAATGAGTA
0801 ATAAGAGAAC AAACCTCTCC AGACATGAGT GTATGTTAGA AAGAATTAAC TCACTAACAA TTAACAGAAC CCAAAGTGGG GCCATTATAT TAATATTACC
0901 TTAACCTAGAA AACCTTATTG TATTATTCGT TAACCTTACA CAGGAATGTC CTAAGGAAAG ATTTAAAGAA AATAAAGGAA CTCGGCAAAAC ACAAACTCCG
1001 CCTGTTTACC AAAACATCG CCTCTTGAAT ATTATAAGAG GTCCCGCCTG CCCTGTGACA ATGTTTTAAC GGCCGCGGTA TTTTGACCGT GCAAAGGTAG
1101 CGTAATCATT TGTCTTTTAA ATGAAGACCT GTATGAAAGG CAT

Isurus oxyrinchus-S473-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCCTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAC CAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA TACCCGTGCA ATTCGGGTCA TTCTGAACAT
0101 TAAAGCTAGC CTGTCCACCT ACCTCAAAT CAACATTATT AACTACCTTG CCCATTAATT CCTAACTAAA ACATTTTATC ATTTTAGTAT GGGCGACAGA
0201 ACAAAAACCTC AGCGCAATAG ACTATGTACC GCAAGGGAGA GCTGAAAGAG AAATGAAACA AATAATTAAA GTAGTAAAA GCAGAGATTA TATCTCGTAC
0301 CTTTTGCATC ATGATTTAGC TAGAAAAACT AGACAAAGAG ATCTTTAGCC TATCTTCCCG AAATAAACG AGCTACTCCG AAGCAGCACA ATTTAGAGCC
0401 AACCCGCTCTC TGTGGCAAAA GAGTGGGAAG ACTTCCGAGT AGCGGTGACA AGCCTATCGA GTTTAGTGAT AGCTGGTTGT CCAAGAAAAG AACTTCAGTT
0501 CTGCATTAAT TCTTTCATCA CCAAGAAGTC TACCATATTA AGGCCAAATA TAAGAATTAA TAGTTATTCA GAAGAGGTAC AGCCCTTCTG AACCAAGATA
0601 CAACCTTTTAA AGGAGGGAAA TGATCATATT TATTAAGGTT CTCACCTCAG TGGGCCAAA AGCAGCCACC CGTAAAGTAA GCGTCACAGC TCCAGTTTAA
0701 CAAAAACCTA TAATCTAGAT AATCTTCTCA GCACCCCTT AACTTTATTG GACTATTTTA TAACTTATA AAAGAAATTA TGCTAAAATG AGTAATAGGA
0801 GGACAAACCT CTCCCGACA CAAGTGTATG TCAGAAAGAA TTAATTCACT GACAATTATA CGAACCCAGA CTGAGGTTAT TATACCTTAT TTTACCTTAA
0901 CTAGAAAATC TTATTATAAC ATTCGTTAAC CCTACACAGG AGTGTCTTAA GGAAAGATTA AAAGAAAGTA AAGGAACTCG GCAAAACGTA ACTCCGCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGGAAGTCA TAAGAGGTCC CGCTCGCCTT GTGACAATGT TTAACGGCCG CGGTATTCTG ACCGTGCAAA GGTAGCGTAA
1101 TCACTTGTCT TTTAAATGAA GACCCGTATG AAAGGCAT

Isurus paucus-7Jp-16S



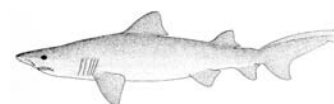
0001 TGTACTGGAA AGTGCCTTG GAATCAAAAT GTGGCTGAACT CTAGTAAAGC ACCTCCCTTA CACCGAGGAA ATACCCGTGC AATTCGAGTC ATTTGAAACA
0101 TTAAAGCTAG CCTGTCCACC TACCTTAAAC CCAACATTAT TACTCTACCT AACTCGTAAG CTCCTAACTA AAACATTTTA TCTCTTAGT ATGGGCGACA
0201 GAACAAAAAC CTCAGCGCAA TAGACTATGT ACCGCAAGGG AGAGCTGAAA GAGAAATGAA ACAATAAAT AAAGTAAGAA AAAGCAGAGA TTCTACCTCG
0301 TACCTTTTGC ATCATGATTT AGCTAGAAAA ACTAGACAAA GAGATCTTTA GCCTACCTTC CCGAACTAA ACGAGCTACT CCGAAGCAGC ACAACTTAGA
0401 GCCAACCCGT CTCTGTGGCA AAAGAGTGGG AAGACTCCG AGTAGCGGTG ACAAGCCTAT CGAGTTTAGT GATAGCTGGT TGTCCAAGAA AAGAACTCA
0501 ATTTCTGACT AATCTTTTCA TCACAAAAA GTCTACCATA CCAGGGCTAA AAATATAAGA ATTAGTAGTT ATTCAGAAGA GGTACAGCCC TTCTGAATCA
0601 AGATACAACCT TTCAAAGGAG GGAATGATC ATATTTACCA AGGTTCTCAC CTCAGTGGGC CAAAAAGCAG CCACCTGTAA AGTAAGCGTC ACAGCTCCAG
0701 TCTCACAAAA ACCTATAATT TAGATAATCT TCTCAGACC CCCTTAACTT TATTGGACTA TTTTATAAAC TTATAAAGA AATTATGCTA AAATGAGTAA
0801 TAGGAGGACA AACCTCTCCC GCACACAAGT GTATGTCAGA AAGAATTAAT TCACTGACAA TTATACGAAC CCAGACTGAG GTTATTATAC CTTATTTTAC
0901 CTTAACTAGA AAATCTTATT ATAACATTCG TTAACCTTAC ACAGGAGTGT CTTAAGGAAA GATTAAGAAGA AAGTAAAGGA ACTCGGCAAA CACGAACTCC
1001 GCCTGTTTAC CAAAAACATC GCCTCTGGA ACTCATAAGA GGTCCCGCTT GCCCTGTGAC AATGTTTAAAC GGCCGCGGTA TTCTGACCGT GCAAAGGTAG
1101 CGTAATCACT TGTCTTTTAA ATGAAGACCC GTATGAAAGG CAT

Lamna nasus-S462-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCCTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAC TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAAA TACTCGTGCA ATTCGAGTCA TTTTGAACAT
0101 TAAAGCTAGC CTATCCACCT ACCTCAAACC CAACATTATT AATTACCTTA CGTATTTACA CCTAACTAAA ACATTTTATC ATTTTAGTAT GGGCGACAGA
0201 ACAAAAACCTC AGCGCAATAG ACCATGTACC GCAAGGGAAA GCTGAAAGAG AAATGAAACA AATAATTAAA GTAATAAAAA GCAGAGATTC CACCTCGTAC
0301 CTTTTGCATC ATGATTTAGC TAGAAAAACT AGACAAAGAG ATCTTTAGCC TATCTTCCCG AAATAAACG AGCTACTCCG AAGCAGCACA ACTTAGAGCC
0401 AACCCGCTCTC TGTGGCAAAA GAGTGGGAAG ACTTCCGAGT AGCGGTGACA AGCCTATCGA GTTTAGTGAT AGCTGGTTGT CCAAGAAAAG AACTTCAATT
0501 CTGCATTAAT TCTTTCATCA CCAAAAAGTC TATCATACTA AGGTCAAACA TAAGAATTAA TAGTTATTCA GAAGAGGTAC AGCCCTTCTG AACCAAGACA
0601 CAACCTTCAA AGGAGGGAAA TGATCACATT TATCAAGGTT CTTACCCAG TGGGCCAAA AGCAGCCACC TGTGAAGTAA GCGTCACAGC TCCAGTCTCA
0701 CAAAAACCTA TAATTCAGAT ATCTTCTCA GCACCCCTT GACTATATTG GACTATTTTA TAAAATTATA AAAGAACTTA TGCTAAAATG AGTAATAAGA
0801 GGTAAACCT CTCCGACAC AAGTGTACAT CAGAAAAGAT TAATTCAGT ATAATTAAC GAACCCAAAC TGAGGTCATT ATATTCATAT TTTACCTTAA
0901 CTAGAAAATC TTATTATAAC ATTCGTTAAT CCTACACAGG AGTGTCTTAA GGAAAGATTA AAAGAAAATA AAGGAACTCG GCAAAACGTA ACTCCGCTG
1001 TTTACCAAAA ACATCGCCTC TTGGAAGTCA TATAAGAGGT CCCGCTGCC CTGTGACAAT GTTTAACGGC CGCGGTATTC TGACCGTGCA AAGGTAGCGT
1101 AATCACTTGT CTTTTAAATG AAGACCCGTA TGAAAGGCAT

Odontaspis ferox-MNHN-16S



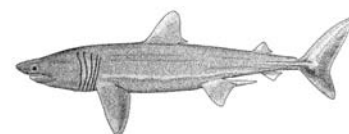
0001 TGTACTGGAA AGTGC ACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAC TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAAA TACCCGTGCA ATTCGGATCA TTTTGAACAT
0101 TAAAGCTAGC CTGTATAACT ACCCAAACCC AACCTTATTA ACTACCTTAT ATATTAATTC CTAATTAAAA CATTTTATCC TTCTAGTATG GGTGACAGAA
0201 CAAAACTCA GCGCAATAGA TTATGTACCG CAAGGGAAAG CTGAAAAAGA AATGAAATAA ATAATTAAAG TAATAAAAAG CAGAGATCTA ACCTCGTACC
0301 TTTTGCATCA TGATTTAGCT AGAAAAACTA GACAAAGAGA TCTTAAGCCT ATCCTCCCGA AACTAAAACGA GCTACTCCGA AGCAGCACAA TTAGAGCCAA
0401 CCCGTCTCTG TGGCAAAGA GTGGGAAGAC TTCGGAGTAG CGGTGACAAA CCTATCGAGT TTAGTGATAG CTGGTTGCC CAGAAAAGAA CTTTAATTCT
0501 GCATTAATTC CTTTACCACC AAAGAATTTA TCTTACTAAG GGTAATATA AAAATTAATA GTTATTCAGA AGAGGTACAG CCCTTCTGAA CCAAGATACA
0601 ACTTTTTAAG ATGGAATAAG ATCACATTTA TCAAGGTTTT TACCCAGTG GACCCAAAAG CAGCCATCTG TAAAGTAAGC GTCACAGCTC CAGTCTCACA
0701 AAAACCTATA ATTTAGATAT TCCTCTCATA ATCCCTTAA CTATATTGAG CTATTTTATA AAATATAAAA GAACCTATGC TAAAATGAGT AATAAGAGAA
0801 TAAACCTCTC CAGACATAAG TGTATGTCAG AAAGAATTAA ATCACTGACA ATTAACGAA CCCAAATTGA GGCCATTATA TTAATATTTA CTTAACTAGA
0901 AAATCTTATT ATAATATTCG TTGATCCTAC ACAGGAATGT CTTTAAGGAA AGATTTAAAG AAAATAAAGG AACTCGGCAA ACACAAACTC CGCCTGTTTA
1001 CCAAAAACAT CGCCTCTTGA GTATTATAAG AGGTCCCGCC TGCCCTGTGA CAATGTTTAA CGCCCGCGGT ATTTTGACCG TGCAAAGGTA GCGTAATCAC
1101 TTGTCTTTTA AATGAAGACC CGTATGAAAG GCAT

Carcharias taurus-09-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGC ACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAC TAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGAAAA TACCTGTGCG ATTCAGGTCA TTTTGAACAT
0101 TAAAGCTAGC CTGTACACCT ACCTTAAACC CAACCTTATT AATTACTTCA CATACTAATC CTAACATAAA ACATTTTAC CTTTTTAGTA TGGCGCACG
0201 AACAAAACT CAGCGCAATA AATTATGTAC CGCAAGGGAA AGCTGAAAA GAAATGAAAC AAATAATTA AGTAACAAA AGCAGAGATT CTACCTCGTA
0301 CCTTTTGCAT CATGATTTAG CTAGAAAAAC TAGACAAAAG GATCTTAAGC CTATCTTCCC GAAACTAAAC GAGCTACTCC GAAGCAGCAC AATTCAGAGC
0401 CAACCCGTCT CTGTGGCAA AGAGTGGGAA GACTTCCGAG TAGCGGTGAA AAGCCTATCG AGTTTAGTGA TAGCTGGTTG CCCAAGAAAA GAACCTTAAT
0501 TCTGCATTAA TTTCTTCATT GCCAAAAAGT CTATCTTATC AGGGTTAAAC ATAAAAATTA ATAGTTATTC AGAAGAGGTA CAGCCCTTCT GAACCAAGAT
0601 ACAACTTTTG AAGGAGGGAA ATGATCATAT TTATTAAGGT TTCCACCTTA GTGGGCTCAA GAGCAGCCAC CTATAAAGTA AGCGTCATAG CTCAGTTTC
0701 ACGAAAACCT ATAATTTGGA TATCTTCTC ATAACCCCT TAACATATAT GGGCTATTTT ATAAAATTAT AAAAGAAGCT ATGCTAAAAT GAGTAATAAG
0801 AGGATAAACC TCTCCAGACA CAAGTGTACG TCAGAAAGAA TTAATCACT GACAATAGA CGATTCCAGA TGAGGTTAT ATACCAATAT CATCTTAACT
0901 AGAAAATCCT ATTATAACAT TCGTTAACC TACACAGGAG TGTCTCAAG AAAGATAAA AGAAAATAA GGAACCTGGC AAACACAAAC TCCGCCTGTT
1001 TACCAAAAAC ATCGCCTCTT GCAACACCAT AAGAGTCCC GCCTGCCCTG TGACAATGTT TAACGGCCGC GGTATTTTGA CCGTGCAAAG GTAGCGTAAT
1101 CACTTGTCTT TTAATGAAG ACCCGTATGA AAGGCAT

Cetorhinus maximus



0001 TGTACTGGAA AGTGC ACTTG GAATCAAAAT GTGGCTAAAC TAGCAAAGCA CCTCCCTTAC ACCGAGGAGA AACCCGTGCA ATTCGAGTCA TTTTGAACAT
0101 TAAAGCTAGC CTGTACACCA CCTTAAACCT AACCTTATTA ATTACCTTAT AACTATTTTC CTAACATAAA CATTTTTACT TTTTAGTATG GGTGACAGAA
0201 CAAAAAATCA GCGCAATAGA CTATGTACCG CAAGGGAAAG CTGAAAGAGA AATGAAACAA ATAATTAAAG TAATAAAAAG CAGAGATTCC ACCTCGTACC
0301 TTTTGCATCA TGATTTAGCT AGAAAAACTA GACAAAGAGA TCTTAAGCCT ATCCTCCCGA AACTAAAACGA GCTACTCCGA AGCAGCACAA CTGAGCGAAC
0401 CCGTCTCTGT GGCAAAAGAG TGGGAAGACT TCCGAGTAG GGTGACAAGC CTATCGAGTT TAGTGATAGC TGGTTGTCCA AGAAAAGAAC TTAATTTCTG
0501 CATTAATTTT TCATACCAA TAAGTCCACC TTATTAAGGT CAAATATAAA AATTAATAGT TATTCAGAAG AGGTACAGCC CTTCTGAATT AAGATAACAAC
0601 TTTCAAAGGA GGGAAATGAT CATATTTATT AAGGTTTTCA CCTTAGTGGG CCCAAAAGCA GCCACCTGAA GAGTAAGCGT CACAGCTCCA GTTTAACAAA
0701 AAACCTATAA TACGGATAAC TCCTCATAAC CCCCTTAATC ATATTGGACC ATTTTATAAA ATTATAAAG AACTTATGCT AAAATGAGTA ATAAGAGGAC
0801 AAACCTCTCC AGACACAAGT GTATGTCAGA AAGAATTAAT TCACCTGACA TTAACGAAAC CCAGACTGAG GATATTATAC TGATATGACC TTAAGTAGAA
0901 AACCTTATTA CAATGCTCGT TAACCTTACA CAGGAGTGTC TTAAGGAAAG ATTAAGAGAA AATAAGGAA CTCGGCAAAC ACAAACTCCG CCTGTTTACC
1001 AAAAAACATC CCTCTTGAT TCCATAAGA GGTCCCGCCT GCCCTGTGAC AATGTTTAAAC GGCCGCGGTA TTTTGACCGT GCAAAGGTAG CGTAATCACT
1101 TGTCTTTTAA ATGAAGACCC GTATGAAAGG CAT

Rhincodon typus-Bal-16S



0001 TGTACTGGAA AGTGCACTTG GAATCAAGAT GTGGCTAAAT TAGTAAAGCA CCTCCCTTAC ACTGAGGAAA TATCCGTGCA ACTCGGATCA TCCTGAACCT
0101 CAAAACCTAGC CTAACCACCA ATCAAACCTTA ACCATACAAA TTACATAAAT ATATCAACAT ACCATTAAAA CATTTTAATC CTTTAAGTAT AGGTGACAGA
0201 AAAAAGAATT AGCGCAATAG CTTTAGTACC GCAAGGGAAA GCTGAAAAAG AAATGAAACA AATCATCAA GTACAAAAAA GCAGAGACTC AAACCTCGTAC
0301 CTTTTCATC ATGGTTTAGC CAGATAAACT AGACAAAAAG ACCTTAAGTC TACCTTCCCG AAACCTAAACG AGCTACTCCG AAGCAGCACA ACATAGAGCC
0401 AACCCGTTTC TGTGGCAAAA GAATGGGAAG ACTTCCGAGT AGCGGTGACA AACCTACCGA GTTTAGTGAT AGCTGGTTAC CTGAAAAAAG AATTTTAGTT
0501 CTGCATTAAT TTCTTCACTA CTAAATAAGA CTATCTTATT AAAGTATAAC ATAAAAATTA AAAGTTACTT AGAAGAGGTA CAGCCCTTCT AAACCAAGAT
0601 ACAACTTTAA AAGGTGGGTA TTGATCATAA TAAAAAGAT TTATTTTCC CCAGTAGGCC TAAAAGCAGC CACCTGAAAA GCTAGCGTCA TAGCTCCAGT
0701 CTTAAAAAAA TCTATAATAC TGATAACGTA TCATAACCCC CAAATTCTAC ATCAGGTTAT TTTATATAAG TATAAAAAAA CTTATGCTAA AATGAGTAAT
0801 AAGAGGGCAA ACCTCTCCTG ACATAAGTGT AAATCAGAAA GAATTAAATC ACTGATAACT AAACGAATCC ACTGAGGCCA TCATACTAAC AAATAATTAA
0901 CTAGACAAAC CTATCTAATA TATTCGTAA CCCTACACAG GAGTGTGATA AGGAAAGATT AAAAGAAAGT AAAGGAATC GGCAAACATA AACTCCGCCT
1001 GTTTACCAAA AACATCGCCT CCTGCCAAA CCATAGGAGG TCTAGCCTGC CCTGTGATGA TATTTTAACG GCCGCGGTAT CTTGACCGTG CGAAGGTAGC
1101 GTAATCACTT GTCTTTTAAA TGAAGACCTG TATGAAAGGC AT

Toulouse, 2003

NOM : CARAGUEL

PRENOM : Charles

TITRE : Spéciation des requins : approches moléculaires et application à la traçabilité du commerce des ailerons

RESUME :

Les ailerons de requin sont très prisés en Asie du Sud-est pour préparer la traditionnelle soupe chinoise. La forte valeur ajoutée des ailerons implique une surexploitation des requins et un effondrement des stocks, phénomène dramatique pour l'équilibre écologique marin. La prise de conscience de la communauté internationale a abouti à l'inscription de deux espèces, le requin baleine et le requin pèlerin, sur les listes de la CITES. Cependant, la dégradation des ailerons après traitement n'autorise pas le contrôle des produits par les analyses classiques. Nous proposons alors un système de spéciation des ailerons basé sur l'analyse moléculaire de l'ADN. La détermination d'un couple d'amorces universelles pour les requins permet d'amplifier, par PCR, le gène mitochondrial codant pour le ribosome 16S. Le séquençage direct de ce fragment donne une séquence de 1142 nucléotides spécifique à chaque espèce de requin. L'analyse comparative avec une banque de référence de 28 espèces nous permet d'identifier le genre et l'espèce de l'aileron dans la majorité des cas. En outre, une analyse phylogénétique de la séquence oriente l'identification lorsque l'espèce analysée ne figure pas dans la banque. L'utilisation de la molécule d'ADN pour assurer la traçabilité des produits transformés représente aujourd'hui la seule voie efficace. La mise en place de contrôles ponctuels sur les marchés, les aéroports ou chez les grossistes, permettrait alors un suivi qualitatif de ce commerce.

MOTS-CLES : Requin, Ailerons, ARNr 16S, marqueur d'espèce, traçabilité

ENGLISH TITLE : Sharks' speciation: Molecular methods and application to the traceability of shark fin trade.

ABSTRACT :

Sharks' fin are very snuffed in Southeast Asia in order to prepare the traditional Chinese soup. The strong added value of fins implies an overexploitation of the sharks and a collapse of stocks, a dramatic phenomenon for the marine ecological balance. The awakening of the international community led to the inscription of two species on the CITES lists: the whale shark and the basking shark. However, fins degradation after treatment does not authorize the products control using traditional analyses. Then we propose a system of fin speciation based on molecular analysis of DNA. The determination of a universal primers couple for sharks allows to amplify by PCR the mitochondrial gene coding for ribosome 16S. The direct sequencing of this fragment gives a 1142 nucleotides sequence specific for each shark species. The comparative analysis with a 28 species reference bank enables us to identify the fin genus and species in most of cases. Moreover, a phylogenetic analysis of the sequence directs the identification when the analyzed species does not appear in the bank. The use of DNA in the traceability of processed products represents the only effective way today. The use of specific controls on markets, airports or in wholesalers, would then allow a qualitative follow-up of this trade.

KEY WORDS : Sharks, Fins, rRNA16S, species marker, traceability