

ICES C. M. 1991

PAPER C.M. 1991/F : 12 Réf.K
Mariculture Committee/Réf. Shellfish Committee

CONTROLE DE LA PLOIDIE PAR IMAGERIE NUMERIQUE DANS DES EXPERIENCES D'INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES.

André GERARD, Jean-Marie PEIGNON et Dominique CHAGOT^{*}
IFREMER LABEIM, B.P.133 - 17390 LA TREMBLADE - FRANCE

RESUME

La maturation sexuelle chez les mollusques bivalves entraîne une diminution de la croissance somatique et parfois une augmentation de la mortalité. Ces inconvénients peuvent être éliminés par stérilisation génétique (triploïdisation). L'induction de la triploïdie nécessite un traitement des oeufs et un contrôle de la ploïdie à chaque génération. Le niveau de ploïdie est habituellement déterminé par comptage des chromosomes, mais cette technique n'est vraiment facile à mettre en oeuvre que pour le stade trocophore et les juvéniles mesurant de 5 mm à 3 cm seulement.

Pour être capable de suivre l'évolution du taux de triploïdie pendant toute la vie de l'animal, nous avons développé une méthode basée sur l'analyse de l'image du noyau. Le contenu individuel en ADN est déterminé par mesure de la densité optique intégrée du noyau coloré par la réaction de Feulgen.

Cette technique peut être utilisée en routine. La réaction est stoechiométrique et la lecture quantitative. Comparée au comptage des chromosomes, l'analyse d'image est plus fiable et elle est aussi plus simple que la cytométrie en flux.

Mots-clés : bivalve, triploïdie, caryologie, imagerie numérique.

ABSTRACT

Individual determination of ploidy level in experimentally induced triploid bivalve molluscs using image cytometry.

The sexual maturation in bivalve molluscs causes decreased growth and sometimes increased mortalities. These drawbacks can be avoided by genetic sterilization (triploidy). Triploidy induction require a egg treatment and a ploidy control at each generation. The ploidy level is usually determined by counting the chromosomes, a technique which is relatively easy for the trochophora stage and for juveniles measuring from 5 mm to 3 cm only.

In order to be able to follow up the evolution of the ploidy rate during any stage of animal life, we have developed an estimation method based on image cytometry. Individual DNA content is determined by integrated optical density of Feulgen-stained nuclei.

The technique can be used for routine examination. The reaction is stoichiometric and the reading is quantitative. If compared to chromosome counting, image cytometry is more reliable. Moreover, it is simpler than flow cytometry.

Keywords : bivalve, triploidy, caryology, image cytometry.

^{*} Dominique CHAGOT est décédée accidentellement avant la rédaction de ce document, nous lui dédions ce modeste écrit en souvenir de son étroite collaboration dans la mise au point des préparations histologiques.

INTRODUCTION

L'amélioration génétique dans le domaine de l'aquaculture, est désormais l'une des bases de l'augmentation de productivité. L'application des techniques génétiques de polyploïdisation, largement utilisée chez les plantes, permet de déboucher sur la production de populations stériles chez les poissons, mollusques et crustacés.

Chez les mollusques bivalves, l'effort de reproduction est prioritaire sur la croissance somatique (Héral et Deslous-Paoli, 1983). La triploïdisation permet, par une réduction de la gonadogenèse plus ou moins marquée selon le sexe et l'espèce, de réorienter ce flux énergétique vers la croissance somatique et la constitution de réserves glucidiques.

La triploïdie peut être obtenue, soit par rétention d'un globule polaire par des traitements physiques ou chimiques appropriés, soit par croisement d'un individu diploïde (2N) avec un individu tétraploïde (4N). Seule la première technique est actuellement utilisable chez les bivalves, la deuxième approche réalisée avec succès chez les poissons (Chourrout et al., 1986) ne sera envisageable que lorsque des bivalves tétraploïdes adultes pourront être obtenus.

L'induction de la triploïdie chez les bivalves exige donc un traitement des oeufs à chaque génération et une vérification systématique du rendement. Les mêmes critères sont nécessaires aux recherches sur la tétraploïdie. Déterminer le degré de ploïdie demeure un problème majeur et nécessite l'emploi d'une technique de contrôle rapide, fiable et utilisable à toute période de la vie de l'animal. La caryologie reste pour l'instant la technique de contrôle la plus utilisée, surtout en Europe (Beaumont, 1986 ; Quillet et Panelay, 1986 ; Dufy et Diter, 1990)), la cytométrie en flux ayant la préférence aux Etats-Unis (Chaiton et Allen, 1985 ; Downing et Allen, 1987) et la microfluorimétrie au Japon (Komaru et al, 1988 ; Wada et al, 1989).

Dans le domaine de la cytologie quantitative, le développement récent de la cytométrie à balayage, utilisée notamment en cancérologie, semblait être une technique facilement applicable au contrôle de la ploïdie chez les mollusques bivalves.

Ce document présente, les premiers résultats obtenus avec l'analyseur d'images microscopiques à balayage automatique SAMBA TM 2005 développé par TITN Alcatel. La fiabilité du système, qui permet de quantifier par densitométrie l'ADN nucléaire, révélé par la réaction de FEULGEN-ROSSENBECK est démontrée en comparant les résultats à ceux d'une étude caryologique.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

La fiabilité de l'analyseur d'image a été vérifiée sur des populations triploïdes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* âgées de 9 mois, et de palourdes du Pacifique *Ruditapes philippinarum* âgées de 7 mois, obtenues respectivement selon les protocoles de Downing et Allen (1987) et, de Dufy et Diter (1990).

Dans les deux cas, les tests ont été réalisés sur du naissain de 1 à 2 cm afin de pouvoir effectuer simultanément l'analyse caryologique et l'analyse d'image.

Analyse Caryologique

Le naissain a été préparé selon le protocole de Thiriot et al. (1982). Après traitement pendant 12 heures dans une solution de colchicine à 0,005% dans de l'eau de mer, les jeunes bivalves sont disséqués pour prélever les branchies. Utilisées dans un premier temps pour la préparation des lames pour l'analyse d'image (voir protocole suivant), les branchies, sont ensuite placées dans une solution

hypotonique d'eau de mer à 25% pendant 1 heure, puis fixées par 3 bains successifs de 30 minutes dans un mélange d'alcool éthylique absolu - acide acétique (3/1).

Séchées rapidement, elles sont alors placées dans une lame creuse contenant quelques gouttes d'eau acétiée à 50%. La suspension cellulaire obtenue après dilacération est projetée sur des lames préalablement chauffées à 44°C et rapidement réaspirée.

Les lames, après séchage, sont colorées pendant 10 minutes dans une solution de Giemsa à 4% (pH 6,8). La lecture se fait au microscope à l'objectif 100 à immersion.

Préparation des échantillons pour analyse d'image

La branchie disséquée pour la caryologie, est séchée sur du papier absorbant, des empreintes sont réalisées par apposition du tissu sur des lames histologiques. Après séchage, les lames sont fixées pendant 10 minutes au Bohm-Sprenger et peuvent être conservées dans cet état.

L'ADN est mis en évidence par la réaction nucléale de Feulgen-Rossenbeck (Giroud, 1987 - Lavaill et al., 1988). Les lames, réhydratées dans de l'eau distillée pendant 10 minutes, sont hydrolysées pendant 1 heure dans l'HCl 5N puis rincées à l'eau distillée pour bloquer l'hydrolyse. Trempées dans le réactif de Schiff pendant 1h30 à température ambiante, elles sont ensuite rincées à l'eau sulfureuse, 4 fois pendant 1 minute, pour éliminer le Schiff en excès. Rincées à l'eau distillée, les lames sont alors déshydratées à l'alcool absolu (2 fois 3 minutes), puis au xylène (2 fois 3 minutes) et protégées par une lamelle de verre.

L'analyseur d'image

Le système de base utilisé est le SAMBA TM 2005 de TITN-Alcatel complété par un logiciel d'application "Ploïdie .version 1.04" mis au point pour la cancérologie et de "Stat 2005 version 1.10" pour le traitement des données (fig. 1). Ce système d'analyse d'image a été développé sur la base des travaux présentés par Giroud (1987).

Il est organisé autour d'un capteur connecté à un dispositif qui digitalise l'image en combinant un procédé de balayage et un photodétecteur. Chaque point image est représenté par ses coordonnées et par une valeur numérique correspondant à son niveau de gris (256 niveaux analysés). Le processeur interne de commande et de traitement, qui permet la réalisation physique des mesures et des calculs, se décompose en deux modules :

- un module de commande du capteur et de gestion de l'acquisition,
- un module de traitement et d'analyse des images.

Le matériel est composé principalement d'un microscope relié à une caméra noir et blanc à 256 niveaux de gris, d'un ensemble de cartes de numérisation et de traitement en temps réel des images, d'un micro-ordinateur compatible AT-386 et de deux moniteurs de contrôle pour la visualisation des images et le traitement des données.

Les étapes du processus complet de traitement et d'analyse des images sont les suivantes : acquisition (digitalisation, numérisation)), prétraitement (amélioration de l'image), segmentation et étiquetage des objets (reconnaissance des objets qui composent l'image), paramétrisation et traitement des données.

L'analyse de l'image numérisée donne deux mesures de base :

- l'aire en pixels du noyau analysé, surface définie par l'opération de seuillage,
- la densité optique intégrée qui représente la quantité d'ADN dans le noyau.

Pour l'interprétation des mesures il est nécessaire de connaître la densité optique intégrée correspondant au contenu en ADN d'une cellule d'un individu diploïde. Toutes les valeurs de densité sont exprimées en unités relatives à cette valeur. A chaque analyse une référence externe d'un individu diploïde doit être utilisée, une centaine de cellules de référence sont mesurées et la moyenne de leur densité optique intégrée est retenue comme valeur diploïde. Après chaque analyse d'échantillon, les paramètres dépendants de la valeur de densité optique sont recalculés automatiquement en tenant compte de la valeur de densité optique intégrée de référence.

RESULTATS

Analyse caryologique

Le nombre diploïde de chromosomes est de 20 chez l'huître *Crassostrea gigas* (Ahmed et Spark, 1967) et de 38 chez la palourde *Ruditapes philippinarum* (Gérard, 1978). Pour chaque huître 10 métaphases ont été comptées, sur les 20 huîtres analysées, 12 individus présentaient des métaphases diploïdes et 8 des métaphases triploïdes (tableau 1) (fig. 2).

Pour les palourdes, la lecture des lames a été beaucoup plus difficile, les métaphases de bonne qualité étant beaucoup plus rares. Les ploïdies de 10 palourdes sur 24 n'ont pu être déterminées par cette technique. Pour les autres, 6 palourdes présentaient des métaphases diploïdes et 8 des métaphases triploïdes (tableau 2) (fig. 3).

Analyse d'image

Les noyaux d'une cinquantaine de cellules au minimum sont analysées automatiquement pour chaque échantillon. La moyenne de la densité optique intégrée (DOI) de chaque individu rapportée à la valeur de la DOI de la référence externe permet de calculer l'indice d'ADN qui est proche de 1 pour les diploïdes et de 1,5 pour les triploïdes.

Des histogrammes typiques d'individus diploïde et triploïde de palourde sont présentés dans la figure 4. Des pics mineurs de cellules à 4N et 6N sont souvent observés, ils correspondent à des cellules au stade G2 en cours de réplication.

Les résultats des DOI pour les deux espèces sont présentés dans les tableaux 1 et 2. Ils concordent parfaitement avec les nombres chromosomiques quand ils ont pu être déterminés. Les échantillons de palourde qui ont posé des problèmes de lecture lors de l'analyse caryologique se sont révélés en forte majorité triploïdes (8/10), quand les préparations ne sont pas de très bonne qualité, il est plus délicat de lire des métaphases triploïdes que des métaphases diploïdes.

La décomposition en populations Gaussiennes de toutes les cellules analysées, réalisée avec le programme "Stat 2005" permet pour chaque espèce, de bien individualiser les populations diploïdes et triploïdes (fig. 5 et 6). Pour les huîtres les valeurs moyennes de DOI pour les diploïdes et les triploïdes sont respectivement de 10199 ± 2335 et de 15879 ± 3836 ; +pour les palourdes, elles sont de 22006 ± 3262 et de 33243 ± 4395 .

DISCUSSION

En cytogénétique des mollusques, le contrôle du niveau de ploïdie par caryologie demeure une technique fiable et peu coûteuse en matériel et produits, mais comme toutes les méthodes d'investigation conventionnelles elle nécessite de longues et fastidieuses lectures de lames microscopiques.

L'appareil d'analyse d'image présenté dans ce document a montré sa fiabilité et sa rapidité puisque la lecture d'un échantillon pour une analyse de ploïdie prend moins de 5 minutes. Cette technique est utilisable en routine, la réaction nucléale de Feulgen est stoechiométrique et la lecture quantitative. Sa

grande efficacité a surtout été perçue dans la lecture des préparations de palourde dont la ploïdie n'a pu être déterminée lors de l'analyse caryologique.

L'absolue nécessité pour les besoins de la comparaison entre caryologie et imagerie numérique, d'utiliser le même matériel biologique apporte certainement un biais dans les résultats de l'analyse d'image, le traitement à la colchicine ayant anormalement modifié le faciès chromatinien des noyaux analysés. L'utilisation en routine réalisée actuellement sur du matériel non traité montre une plus grande fiabilité dans le calcul de l'indice d'ADN.

L'extension de la technique au contrôle de la ploïdie sur les embryons et les larves est en cours. L'analyse ne se fait plus individuellement mais sur une population cellulaire dans laquelle la fréquence de cellules polyploïdes est recherchée par analyse statistique en utilisant notamment la décomposition en courbes gaussiennes présentée dans les figures 5 et 6.

Bien que plus lente que la cytométrie en flux, la cytométrie à balayage présente l'avantage de réaliser une analyse cellule à cellule pour le ou les caractères considérés avec la possibilité de vérifier pour chacune d'elles la validité des résultats obtenus (Giroud, 1987). Cette technique se rapproche plus de la microfluorimétrie mais avec un système beaucoup plus ouvert, permettant dans un laboratoire de génétique des mollusques de réaliser avec le même appareil des mesures de ploïdie, des mesures morphométriques sur les larves, des lectures de gels d'électrophorèse, des mesures de fluorescence, des recherches de métaphases, des traitements statistiques et d'envisager le tri d'animaux adultes par biopsie notamment dans le cadre des recherches sur la tétraploïdie.

REFERENCES

- Ahmed M. and Spark A.K., 1967. A preliminary study of chromosomes of two species of oysters (*Ostrea lurida* and *Crassostrea gigas*). J. fish. res. bd. Canada 24-10, 2155-2159.
- Beaumont, A. R., 1986. Genetic aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L.). Aquaculture, 57 : 99-110.
- Chaiton J.A. and Allen S.K. Jr., 1985. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. Aquaculture, 48, 35-43 .
- Chourrout D. , Chevassus B., Krieg F., Happe A., Burger G. and Renard P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females. Potential of tetraploid fish. Theor. Appl. Genet., 72, 193-206.
- Downing S.L., Allen S.K. Jr., 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : optimal treatments with cytochalasine B depend on temperature. Aquaculture, 61, 1-15.
- Dufy C., Diter A., 1990. Poliploidy induced in Manila clam. I : chemical induction and larval performances of triploids. Aquat. Living Resour., 3, 55-60.
- Gérard A., 1978. Etude des garnitures chromosomiques de deux veneridae : *Ruditapes decussatus* (L.) et *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). Haliotis, 9-1, 69-71 (1978).
- Giroud F., 1987. Approches cytométriques de la prolifération et de la différenciation : notion de faciès chromatinien. Thèse 87/GRE1/0099 - 243p.
- Héral M. et Deslous-Paoli J.M, 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesures calorimétriques et par dosages biochimiques. Oceanol. Acta 6,2,193-199.
- Komaru A., Uchimura Y., Ieyama H. and Wada K.T., 1988. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA Microfluorometry with DAPI staining. Aquaculture, 69, 201-209.

- Lavaill R., Lequeux N., Radal M., Ursule E., 1988. Technique et quantification morphométrique de l'index d'aneuploïdie des tumeurs solides. Etude de 70 cas de cancer au sein. Rev. Fr. Histotechnol., 1,1,31-34.
- Quillet E. and Panelay P.J., 1986. Triploidy induction by thermalshocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 57, 271-279.
- Thiriot-Quievreux C. et Ayraud N., 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. Marine biology 70, 165-172.
- Wada K. T., Komaru A. and Uchimura Y, 1989. Triploid induction in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. Aquaculture, 79, 11-19.