

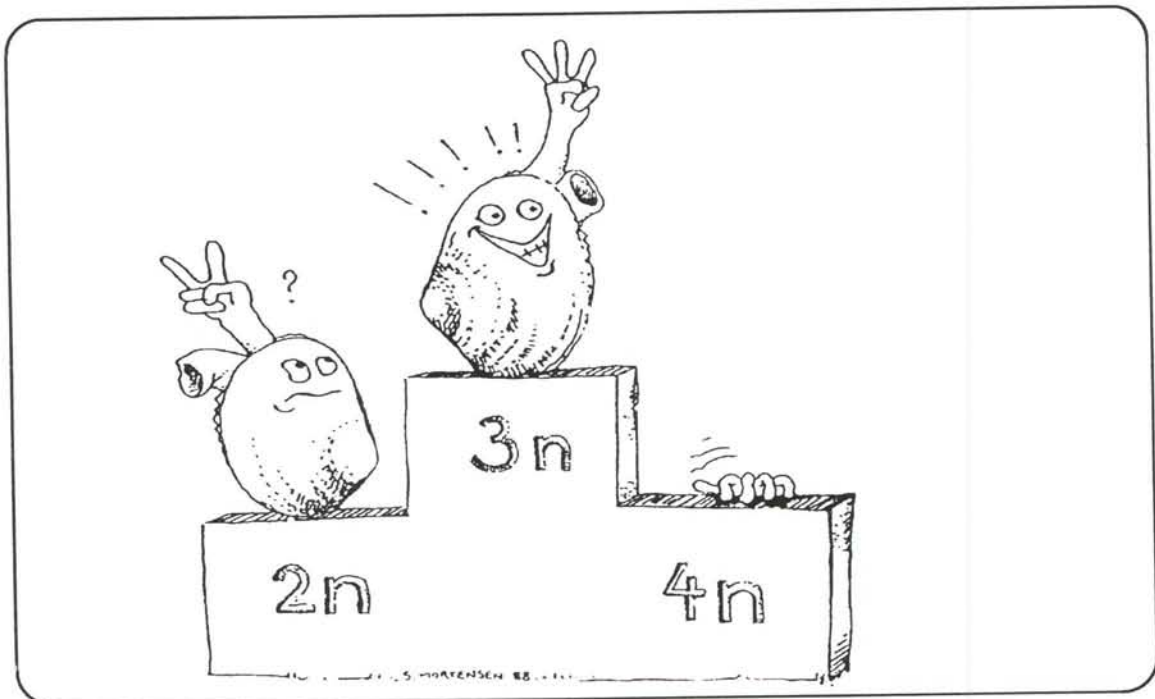
**Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes  
de l'IFREMER**

---

**POLYPLOIDISATION CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES :  
TECHNIQUES D'OBTENTION,  
PERFORMANCES DES PRODUITS OBTENUS**

**Première partie : Maîtrise des techniques de polyploïdisation  
application aux espèces d'intérêt commercial en France  
(huitres creuses et palourdes)**

Equipe du Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés marins à La Tremblade



RIDRV-90.29-RA/LA TREMBLADE

**POLYPLOIDISATION CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES :  
TECHNIQUES D'OBTENTION ET PERFORMANCES DES  
PRODUITS OBTENUS**

**1ère partie**

**Maîtrise des techniques de polyploïdisation,  
application aux espèces d'intérêt commercial  
en France (huîtres creuses et palourdes).**

## 1 - INTRODUCTION

Les méthodes classiques de sélection basées sur la variance génétique de dominance nécessitent généralement la création préalable de lignées à forte consanguinité (Falconer, 1982). Ces méthodes qui peuvent être longues s'appuient sur des plans expérimentaux lourds à mettre en oeuvre. Des méthodes plus récentes, telle la reproduction uniparentale, mises au point pour plusieurs espèces animales permettent d'obtenir une augmentation plus rapide de la consanguinité. Cependant, ce processus reste long car il nécessite l'obtention d'au moins trois générations pour vérifier la stabilité du caractère sélectionné.

Chez les animaux d'élevages aquacoles, poissons et mollusques, les caractères à améliorer sont souvent la croissance, une réduction du temps d'élevage permettant d'accroître la rentabilité, et la qualité de la chair, couleur et goût qui doivent correspondre aux critères des consommateurs. Or, chez ces espèces la maturation sexuelle engendre un retard de croissance (Gouletquer et al., 1987) dû à la mobilisation des réserves énergétiques qui sont employées pour la gamétogénèse (Gabbot, 1975 ; Adachi, 1979) et une modification des qualités organoleptiques de la chair, en particulier chez les coquillages qui deviennent "laiteux".

L'ensemble de ces raisons a conduit "la recherche" à s'intéresser à la production d'animaux triploïdes, qui sont généralement stériles et par là même, susceptibles de présenter de meilleures performances de croissance et une stabilité plus grande de la qualité de chair.

Ainsi, la production de poissons triploïdes a permis d'obtenir un gain substantiel de croissance (Chourrout, 1989) résultant effectivement d'une réduction gonadiale et une stabilité de la qualité de chair (Chevassus, 1987). Ces méthodes ont aussi été appliquées avec succès aux mollusques, les recherches sur la polyploïdisation ayant été surtout effectuées aux U.S.A. Une technique a été mise au point et appliquée avec des variantes chez plusieurs espèces, notamment *Crassostrea virginica* (Stanley et al., 1981), *C. gigas* (Allen et Downing, 1986 ; Allen 1987), *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984), *Haliotis discus* (Arai et al., 1986).

Par contre, lors de la proposition de recherche aucun travail n'avait été publié sur la palourde et l'huître plate. Par ailleurs, comme pour les poissons, il conviendrait de produire des géniteurs tétraploïdes afin d'obtenir par simple croisement avec des géniteurs diploïdes 100% d'animaux triploïdes. En effet, toutes les techniques actuellement connues ne permettent pas d'atteindre ce pourcentage et les résultats fluctuent d'un lot à l'autre.

## 2 - RAPPEL DES PROPOSITIONS DE TRAVAIL

Tenant compte de l'état d'avancement des recherches et de l'intérêt des applications possibles résultant de l'obtention d'animaux tri et tétraploïdes, le programme présenté s'articule en trois grandes parties :

- acquisition des techniques de triploïdisation et leurs applications aux espèces françaises d'intérêt commercial (*C. gigas*, *Ruditapes philippinarum* et *R. decussatus* (Palourdes) et *Ostrea edulis*, l'huître plate),
- production de lignées diploïdes et triploïdes : comparaison de leurs performances de croissance dans les eaux littorales françaises, comparaison de la qualité de la chair et étude de la fonction de reproduction,
- mise au point de techniques de tétraploïdisation et essais d'obtention de géniteurs tétraploïdes viables. Dans le cas positif, essais de croisement avec des géniteurs diploïdes et vérification de la descendance.

Le rapport de 1989 comprend, la mise en place des systèmes expérimentaux, l'acquisition et l'amélioration des techniques de triploïdisation pour *C. gigas*, l'huître creuse, et l'application de ces techniques à *R. philippinarum*, la palourde japonaise.



### 3 - PRINCIPE DE LA POLYPLOIDISATION

La diploïdisation consiste en une modification du nombre de chromosomes de toutes les cellules somatiques et germinales. Cette opération doit être réalisée au moment de la fécondation, avant la première division de l'embryon.

L'oeuf fécondé normal est à 24 chromosomes,  $n$  provenant du stock maternel et  $n$  du stock paternel. Or, la division réductionnelle (méiose) étant terminée chez les spermatozoïdes émis, la modification du nombre de chromosomes n'est envisageable que chez les ovules qui restent bloqués, selon les espèces (Longo, 1983), en fin de prophase ou en début de métaphase de la division méiotique. Enfin, en fonction de la vitesse de division de l'oeuf il est possible d'obtenir des animaux triploïdes, par rétention du premier globule polaire (gp1) ou du deuxième globule polaire (gp2) (Fig. 1).. Les animaux obtenus par rétention du gp1 présentant une hétérozygotie supérieure aux animaux qui résultent de la rétention du gp2, pourraient avoir des performances de croissance plus intéressantes.

### 4 - TECHNIQUES DE POLYPLOIDISATION

La rétention des globules polaires peut être obtenue, soit par un traitement chimique, soit par des traitements physiques (chocs de pression ou chocs thermiques).

#### 4.1. Traitement chimique

L'agent chimique utilisé classiquement est la cytochalasine B. (CB). Les cytochalasines qui résultent du métabolisme de diverses espèces de moisissures, modifient le degré de polymérisation des molécules d'actine en empêchant leur addition aux filaments sans, cependant, inhiber la mitose. L'efficacité de l'action de la CB dépend de plusieurs paramètres : la concentration, la température, la durée et le moment d'application du traitement. Ces paramètres qui dépendent de la biologie et du développement embryonnaire seront variables selon les espèces et devront, en conséquence, être déterminés.

Cependant, la méthode de base définie par Downing et Allen (1987) (concentration 0,5mg/l, durée du traitement 15 mn à 25°C) a pu servir de référence pour ce travail.

#### 4.2. Traitements physiques

##### . Chocs hyperbares

Avec *C. gigas*, (Chaiton et Allen, 1985) ainsi que chez *Haliotis discus hannai* (Arai et al., 1986), les triploïdes ont été obtenus par des chocs de pression compris entre 6000 à 8000 psi (410 à 550 bars) appliqués quelques minutes après la fécondation.

##### . Chocs thermiques

Des chocs chauds (30 à 38°C) ont été testés chez *C. gigas* (Quillet et Panelay, 1986). Des chocs chauds et froids ont été appliqués sur *Haliotis discus hannai* (Arai et al., 1986 ; Fujino et al., 1987).

Les chocs physiques détruisent le fuseau achromatique (fibres astériennes) responsable de la séparation des chromosomes. Or, du fait de l'asynchronisme dans les moments d'expulsion des globules polaires (Longwell et Stiles, 1968), ce type de traitement ne semble pas pouvoir affecter plus de 60 % des ovules (Chaiton et Allen, 1985 ; Quillet et Panelay, 1986).

## 5 - MISE EN PLACE DES SYSTEMES EXPERIMENTAUX : MATERIELS ET METHODES

### 5.1. Origine, maintien et maturation des géniteurs

Les huîtres creuses, âgées de 2 ans, proviennent toutes d'une exploitation locale (Y. Papin, La Tremblade). De février à juin les gamètes ont été produits par des géniteurs ayant mûri au laboratoire dans des bacs où la température de l'eau est augmentée par étapes de 8 à 15°C puis à 22°C et 24°C, température de maturation. La

nourriture distribuée en continu est composée de *Chaetoceros calcitrans* et de *Tetraselmis suecica* à une densité d'environ  $7.10^8$  cell j-1. Les animaux ont été conditionnés à une densité de 50 /100l.

Une stabulation d'un mois dans ces conditions permet d'obtenir des animaux matures et aptes à pondre. De juillet à août, les huîtres ont été prélevées dans le milieu naturel.

Les palourdes, âgées de 2 ans et mesurant 35 à 50 mm de long, ont été fournies par 2 exploitations locales (Y. Boisard, Artouan et la SATMAR, St-Just). De février à mai elles ont mûri au laboratoire, en bac à fond nu selon la méthode de Gérard (1978). Ensuite, et jusqu'à fin août, elles ont été prélevées dans le milieu, la veille de l'expérimentation.

#### 5.2. Techniques de ponte, récolte de gamètes et insémination

Les mêmes protocoles de stimulation de ponte, de récolte de gamètes et d'insémination ont été appliqués aux deux espèces.

Plusieurs méthodes décrites dans la littérature, ont été testées avec plus ou moins de succès. La méthode la plus efficace que nous avons régulièrement utilisée est la suivante : après immersion pendant une nuit à 18°C - 20°C, les géniteurs sont réimmergés à 22°C - 25°C. L'addition de spermatozoaires frais détruits par ultra son (3 minutes à 100 W) ou d'eau de mer ayant contenu des ovocytes engendre un déclenchement de la ponte au maximum dans l'heure qui suit l'immersion.

Chaque géniteur commençant à pondre est retiré du bac. Sa cavité palléale est alors rincée et il est isolé dans un bécher où il termine sa ponte. Le sperme non motile et les ovules atrésiques (clairs polyédriques) ou immatures (très allongés) sont éliminés, ainsi que les impuretés par tamisage.

La fécondation s'obtient par le mélange de gamètes provenant, pour les huîtres, de 3 à 10 géniteurs de chaque sexe, pour les palourdes de 10 à 15 géniteurs. Le mélange



spermes-ovules s'effectue après le dénombrement des ovules à partir de 2 ou 3 échantillons (100 µl dans 1 ou 2l), et selon le ratio 5 à 10 spermatozoïdes par ovule. Un témoin ovule est prélevé avant l'insémination pour estimer le taux de fécondation incontrôlée qui n'a jamais été supérieur à 3%.

### 5.3. Elevage larvaire et métamorphose

Les larves nageuses sont élevées dans des bacs cylindroconiques de 150 l aérés par la base. La technique classique de Loosanoff et Davis (1963) est utilisée. Durant 24 h, la densité des larves est fixée à 100/ml, puis jusqu'à la métamorphose elle est de 10 larves/ml.

La température est maintenue à 25°C  $\pm$  1°C et la nourriture est distribuée tous les jours à raison de 50 à 100 cellules/ml selon l'âge des larves. Elle est composée d'*Isochrysis galbana* (Clone T.iso) (seule pour les palourdes) ou avec *Chaetoceros calcitrans* pour les huîtres. Tous les deux jours, l'eau de mer filtrée à 1 µm et stérilisée aux UV, est renouvelée en évitant aux larves tout changement de température.

Au cours de cette opération, l'effectif de chaque lot a été estimé par comptage de 3 échantillons (représentant chacun 1/10 000ème ou 1/20 000ème de la population totale) et la taille moyenne a été calculée d'après les mesures de 30 larves par lot (diamètre de la coquille mesuré parallèlement à sa charnière). Des antibiotiques sont ajoutés à l'eau renouvelée, alternativement du chloramphénicol (10 mg/l) et du sulfate de gentamycine (5mg/l) ou de la furazolidone (5 mg/l). Deux échantillons d'eau par bac ont été quotidiennement prélevés et déposés sur deux milieux de cultures différents. Ce contrôle a permis de quantifier la flore bactérienne totale, sur le milieu 2216 E de Oppenheimer et Zobell (1952), et la flore de vibrions présumés, sur le milieu sélectif TCBS de Kobayashi et al. (1963).



#### 5.4. Caryologie

Les lames caryologiques de tissu branchial de naissain ont été préparées selon la technique de la suspension cellulaire. Un contrôle précoce s'avérant nécessaire pour connaître l'efficacité des méthodes testées de triploïdisation, une adaptation de la technique de Chourrout et Happe (1986) a du être mise au point pour les embryons. Chez ces derniers, les taux d'hétéropléïdes ou de diploïdes ont été estimés en comptant 30 à 50 métaphases par lot traité. Les préparations ont été obtenues selon la méthode suivante :

Les jeunes trochophores sont immergées 6 heures après la fécondation dans une solution de colchicine (0,2 g/l d'eau de mer) pendant 2 heures afin de bloquer les chromosomes en métaphase. Un choc osmotique complémentaire dans une solution hypotonique (eau de mer : 3, eau distillée : 7) de 20 minutes induit un gonflement des cellules qui permet de mieux distinguer les chromosomes. Les larves sont ensuite fixées par 3 bains successifs (les deux premiers n'exédant pas 30 minutes) dans du liquide de Carnoy (éthanol : 3, acide acétique : 1) à 4°C. Le renouvellement du fixateur se fait par remise en suspension de l'échantillon centrifugé 5 minutes à 25 g, puis les cellules embryonnaires sont dissociées par agitation pendant 10 minutes dans de l'acide acétique dilué à 50% dans de l'eau distillée et déposées sur une lame préchauffée à 45°C environ. Enfin, les lames sont colorées en 10 minutes par une solution de GIEMSA (4%) à pH 7 (tampon phosphate), rincées à l'eau distillée et séchées à l'abri de la poussière.

#### 5.5. Estimation du taux de polyploïdie

Le nombre de chromosomes est de 20 chez l'huître (Thiriote-Quievreux et Ayraud, 1982) et de 38 chez la palourde (Gérard, 1978).

Chez l'huître les métaphases présentant un nombre de chromosomes de 6 à 10, 18 à 22, 28 à 32 ont été respectivement classées comme haploïdes, diploïdes, triploïdes.

Chez la palourde, le même classement a été fait pour les nombres de chromosomes suivants : 17 à 21, 36 à 38 et 54 à 57.

## 5.6. Analyse des données

Les données ont été traitées avec les logiciels STATITCF et STATGRAPHICS. Les figures ont été, pour la plupart, réalisées avec STATGRAPHICS.

### 5.6.1. Taux d'hétéroplôides ou gynogénétiques

La comparaison de différents traitements testés au cours d'une même expérience ou des répétitions d'un traitement identique au cours d'expériences successives a été effectuée à l'aide d'un test de  $\chi^2$ , appliqué aux effectifs des types d'individus rencontrés (haploïdes, diploïdes, triploïdes, etc...).

Dans le cas d'une comparaison entre traitements différents, provenant de plusieurs expériences sans réplication, une analyse de variance a été effectuée à partir des pourcentages  $x$  du type d'individus recherchés, transformés par la fonction arc-sin  $\sqrt{x/100}$ . Le ou les traitements significativement plus efficaces ont été désignés par le test de Newman-Keuls.

### 5.6.2. Croissance larvaire

Les tailles individuelles moyennes, pendant l'élevage larvaire, au sein de différents lots (traité, témoin) ont été comparées grâce à une analyse de variance à deux facteurs. L'un de ces facteurs a été l'âge des larves, l'autre, le type de lot (traité, témoin). La variable analysée a été la longueur de la coquille en  $\mu\text{m}$ , transformée en Log pour remplir la condition d'homogénéité des variances. La collecte de ces données a été détaillée précédemment dans le paragraphe 5.3.

Dans certains cas, les paramètres des droites de régression de la croissance moyenne des différents lots ont été comparées par une analyse de covariance.

## 6 - MAITRISE DE LA TECHNIQUE DE TRIPLOIDISATION CHEZ *CRASSOSTREA GIGAS* ET TENTATIVE d'AMELIORATION DE LA METHODE

La technique de triploïdisation mise au point pour *C. gigas* par Downing et Allen (1987) a été employée avec succès au laboratoire, les pourcentages de triploïdes, établis au stade trochophore, ayant varié entre 56% et 80%. Cependant, tenant compte, d'une part, du temps de manipulation des ovocytes et, d'autre part, de la rapidité d'évolution des ovocytes fécondés à 25°C, il nous a paru important de vérifier l'effet du vieillissement des ovules sur les taux de fécondation et de vérifier si le temps de 30 minutes préconisé par ces auteurs pour appliquer le traitement était bien le temps optimum.

### 6.1. Effet du vieillissement des gamètes

Le vieillissement des ovules est défini ici comme la perte de leur aptitude à la fécondation après un séjour plus ou moins long dans l'eau et à la température où ils ont été émis.

Lors des expérimentations de production de polyploïdes l'insémination n'a jamais été pratiquée immédiatement après l'émission des gamètes. Plusieurs manipulations préalables sont, en effet, nécessaires : élimination des impuretés par tamisage, éventuellement concentration des ovules dans un moindre volume d'eau, comptage des gamètes, tri des mâles présentant une bonne motilité des spermatozoïdes. De plus, le regroupement nécessaire de plusieurs pontes requiert un certain temps car elles ne sont pas émises simultanément. L'influence de l'intervalle de temps entre la ponte et l'insémination a été observée sur les taux de fécondation et de survie au stade larve D.



Seul le vieillissement des ovules a été testé. En effet, il a été observé que les spermatozoïdes étaient encore motiles 24 h après leur émission. Or, il est couramment admis que leur pouvoir fécondant est étroitement lié à leur motilité.

Les expériences utilisant des géniteurs "maturés" hors saison (pontes début et mi-mars) ont porté sur des pontes individuelles fécondées par un mélange de sperme (10 mâles). Ceci a permis de mesurer la variabilité interfemelle. Chaque femelle isolée a pu pondre pendant 10 mn. Le sperme a été ajouté aux ovules à des temps variant de 15 mn à 2 h après le milieu du temps de ponte. Il a été retiré par tamisage 5 mn après l'insémination. Les taux de fécondation ont été déterminés 3 à 5 h plus tard. Les résultats révèlent une importante variabilité interfemelle (fig. 2). Dans la plupart des cas, le taux de fécondation est pratiquement nul lorsque l'insémination est pratiquée 60 mn ou plus après la ponte. Un délai inférieur à 30 mn garantit le succès de l'insémination. Le taux de larves D à 24 h n'est, par contre, pas affecté par le vieillissement des gamètes dans 18 cas sur 20 étudiés.

Une autre expérience, utilisant des géniteurs "maturés" en conditions naturelles (juillet) a montré qu'un mélange d'ovules (d'une dizaine de femelles) inséminé par un mélange de sperme 4 h 30 après la ponte présentait un taux de fécondation de 95%. Lors de nombreux essais, avec de tels géniteurs, des pontes ont été inséminées environ 1 h après l'émission et ont presque toujours présenté des taux de fécondation comparables.

Un certain nombre de travaux (Lannan *et al.*, 1980 ; Muranaka et Lannan, 1984) ont traité de l'effet du conditionnement sur la survie larvaire et la maturation, mais pas sur le vieillissement des gamètes.

## 6.2. Etude du moment optimal d'application

L'étude de l'efficacité du traitement a été faite pour les temps : 20, 25, 30, 35 et 40 minutes après la fécondation (Fig. 3).

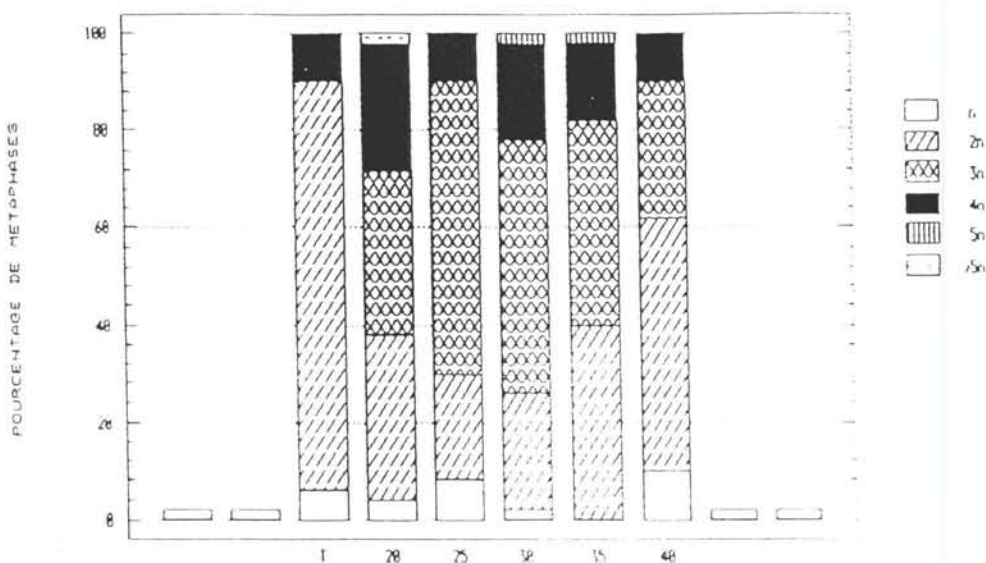


Figure 3 : Taux de polyploïdes induits en fonction du moment d'application du traitement (CB).

Aucune métaphase triploïdie n'a été observée dans le témoin. Le moment d'application a une influence significative sur le taux de triploïdes induits ( $\chi^2_4$  ddl=12,68;  $p>0,02$ ). Le pourcentage maximum correspond au temps 25 minutes (58%). Cependant il n'est pas significativement différent des temps 30 et 35 minutes ( $\chi^2_1$  ddl=0,18;  $p>0,05$ ), ( $\chi^2$  ddl=1,61;  $p>0,05$ ). Il faut noter par ailleurs la présence d'un faible pourcentage de tétraploïdes dans chacun des 6 lots observés. Ce phénomène semble être indépendant du traitement à la CB puisqu'il n'y a pas de différence entre les lots traités et le témoin ( $\chi^2_5$  ddl=8,51;  $p>0,10$ ).

Sur la base de ces résultats, deux autres expériences d'induction de triploïdes ont été réalisées en appliquant le traitement à  $t=25$  min. Les pourcentages des triploïdes étant estimés à 56% et 72%, une analyse statistique intégrant aussi le premier essai révèle que ces taux sont significativement différents.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Downing et Allen (1987). Leur taux moyen de triploïdes est supérieur à celui de cette étude (62%) mais il a été estimé sur des animaux âgés d'un an. Sachant que ces auteurs ont montré que le taux de triploïdes augmente avec l'âge (meilleure survie), il est possible que les taux obtenus ici ne soient pas différents dès leurs, âge d'un an.

### 6.3. Discussions, conclusions

La technique mise au point aux U.S.A pour obtenir des huîtres creuses triploïdes a été appliquée avec succès au laboratoire, les pourcentages d'huîtres triploïdes étant comparables à ceux donnés dans la littérature. En outre un effet, du vieillissement des ovules, dont il faudra tenir compte selon la méthode de maturation employée a été mis en évidence. Le décalage observé dans les résultats entre les géniteurs maturés au laboratoire et les géniteurs ayant mûri dans le milieu naturel pourrait s'expliquer par un apport nutritionnel différent, notamment dans la composition en acide gras essentiel. Des contrôles de régime alimentaire seraient de nature à préciser ce point. Néanmoins, le respect de la méthodologie et l'adaptation d'outils permettent de pratiquer dans de bonnes conditions la triploïdisation par la cytochalasine B. Par ailleurs, la vérification faite sur le moment optimal d'application du traitement a permis de constater que les meilleurs résultats étaient systématiquement obtenus pour les temps 25, 30 et 35 minutes après la fécondation.

Il conviendra, donc, de bien définir le temps 0 (temps de fécondation) et de maintenir les oeufs à température constante pendant la phase précoce de leur développement.

## 7 - MISE AU POINT DE LA TRIPLOIDISATION DE LA PALOURDE *RUDITAPES PHILLIPPINARUM*

Le manque de données sur le déroulement du développement embryonnaire chez la palourde a nécessité une pré-étude de celui-ci, pour déterminer les temps d'émission des gp1, gp2 et le temps de la première division des cellules embryonnaires. De plus, il a été également nécessaire de vérifier, compte tenu des résultats acquis avec *C. gigas*, de l'effet possible du vieillissement des gamètes.

La mise au point d'une méthode de triploïdisation, en utilisant la CB, a été effectuée dans un deuxième temps.



## 7.1. Influence du vieillissement des gamètes

Tenant compte des données précédemment obtenues, l'influence du temps sur le vieillissement des gamètes a été étudié de 0 à 120 mn, les contrôles ayant lieu 7 heures après la fécondation.

Un vieillissement de 45 minutes ne semble pas affecter la qualité des ovules. Passé ce délai, le taux de fécondation diminue, de même que le synchronisme du développement des oeufs (augmentation du taux d'embryon en "retard"). (Fig. 4).

En conséquence, pour obtenir un fort pourcentage de polyploïdes, les fécondations artificielles ont été effectuées au plus tard 1 heure après la ponte des premiers ovules. Ce temps permet d'appliquer un traitement inductif à des cellules au même stade de développement.

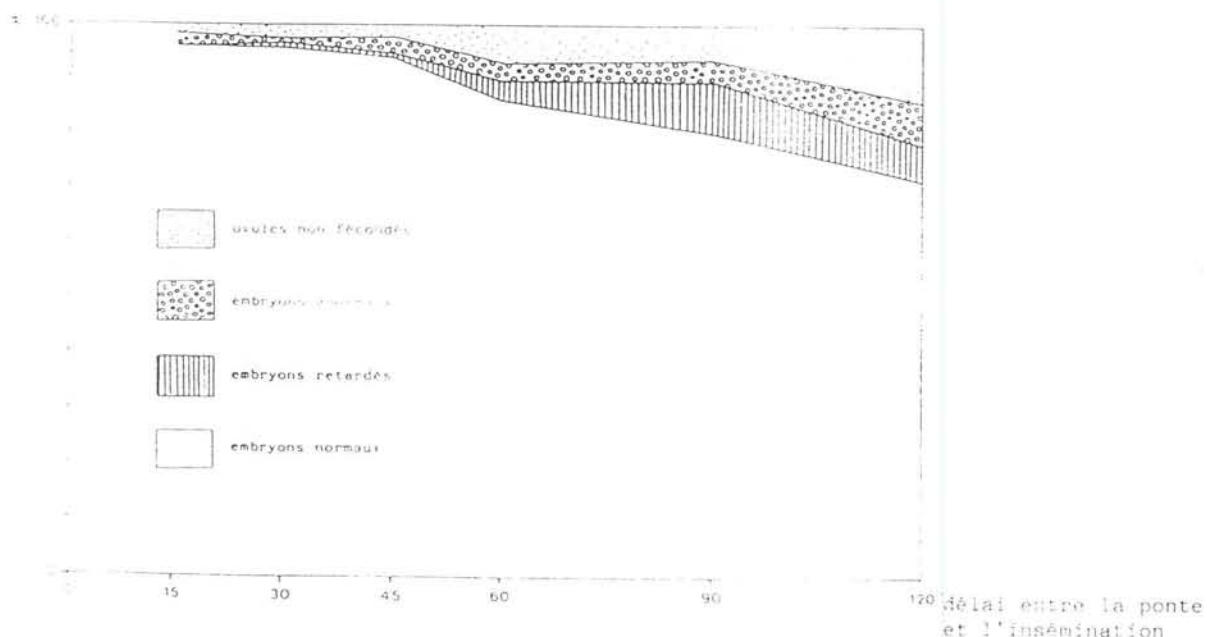


Fig. 4 INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DES OVULES SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE (t = 7 heures).

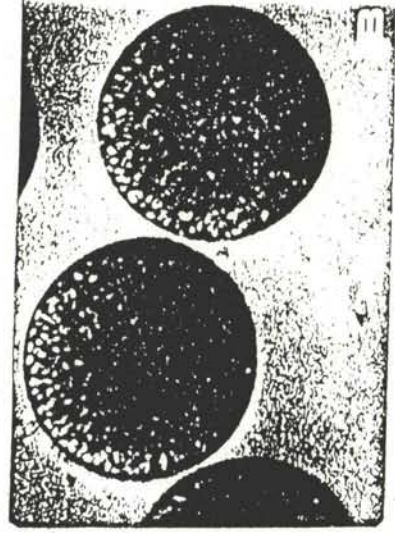
## 7.2. Chronologie du développement embryonnaire précoce

### 7.2.1. Observations qualitatives

Des ovules ont été inséminés (t = 0) afin d'observer les mécanismes cellulaires externes. Les étapes caractéristiques ont été photographiées et sont présentées en fig 5.



spermatozoïdes

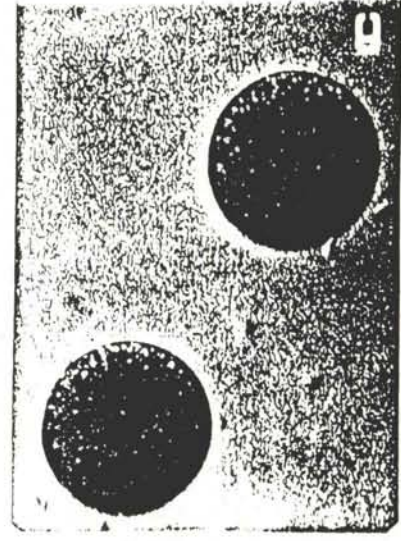


ovocyte

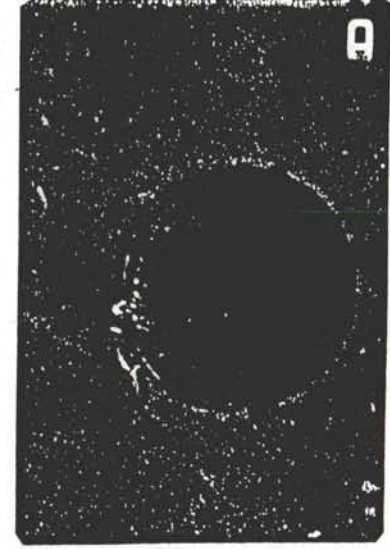
FECUNDATION



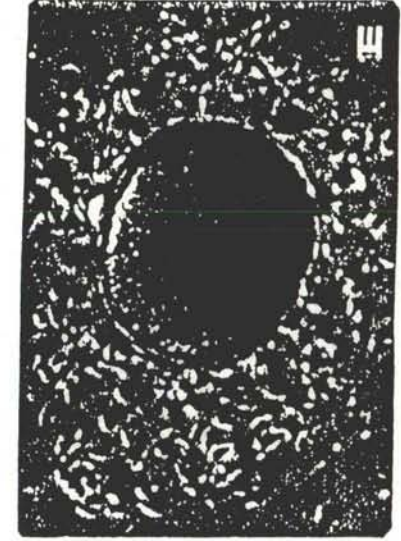
temps  
0mn



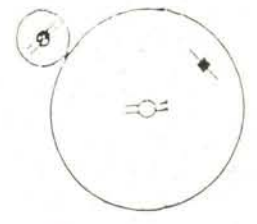
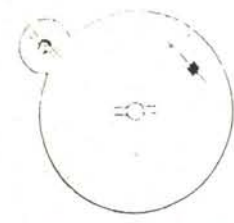
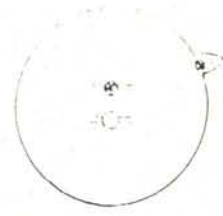
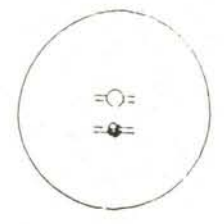
50µm



Expulsion du  
premier  
10mn  
globule polaire  
(GPI)

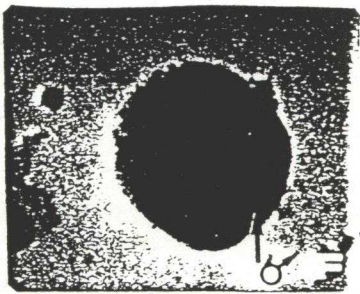


20mn  
stade GPI



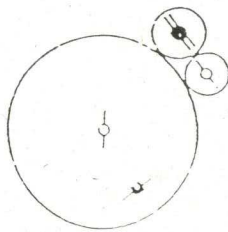


mn

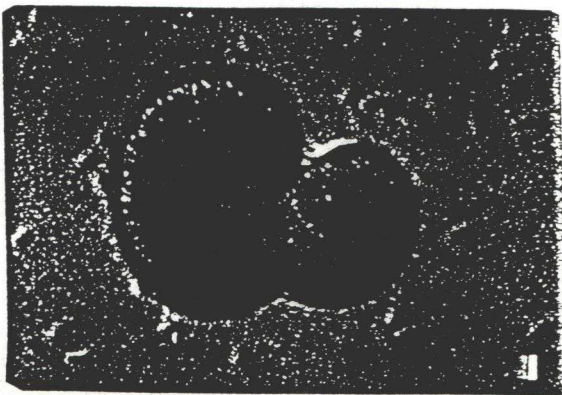
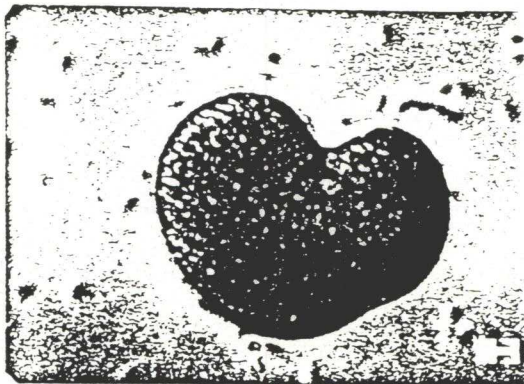
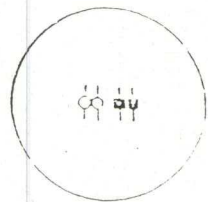
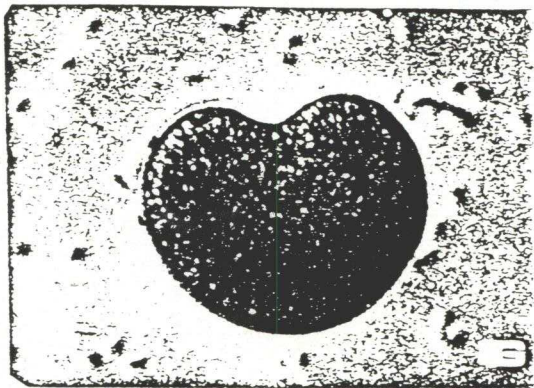


50 μm

← stade GP2 →



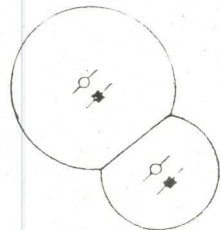
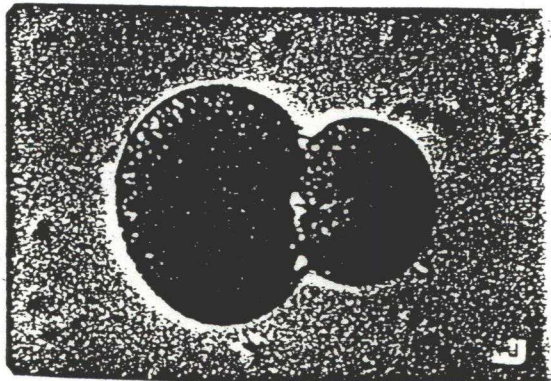
mn Amorce de la première division mitotique (sans lobe polaire 1)



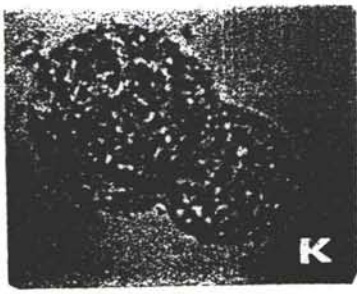
50mn

stade 2 cellules

Echelle  
50 μm



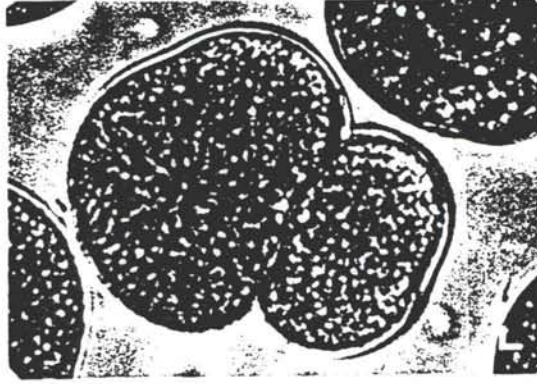




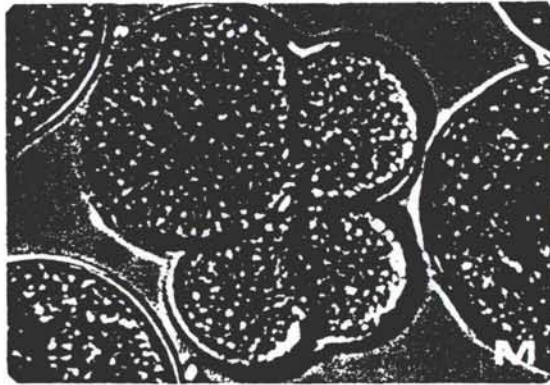
K

50µm

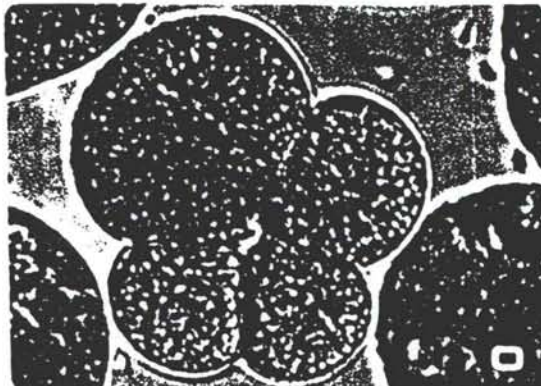
Amorce de la deuxième  
division mitotique  
(sans lobe polaire 2)



L



M



O

stade 4 cellules

50µm

L'observation du GP1 (fig.5, E) s'est révélée relativement aisée. En effet, de par sa forte réfringence, il est visible même au travers du vitellus. Par contre, le GP2, plus petit, est expulsé à proximité du GP1 (fig. 5, F) et se distingue difficilement. Les premières divisions embryonnaires ont été étudiées chez de nombreuses espèces de Mollusques. Chez la plupart d'entre elles, une protrusion cytoplasmique (lobe polaire) s'individualise au pôle végétatif de la cellule avant la cytodiérèse et se résorbe ensuite dans l'une des deux cellules filles dont le volume est alors augmenté. Il s'agit des cellules CD (1ère mitose) et D (2de mitose) (fig. 6).

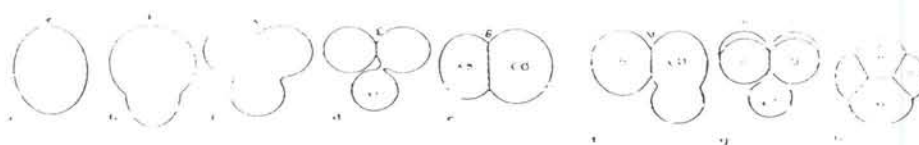


Fig.6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION DU LOBE POLAIRE

(a-c) formation du lobe polaire au cours du premier clivage, (d) stade "trifoliate" avec le lobe polaire (L1), (e) stade "deux cellules", (f et g) formation du second lobe polaire (L2) au cours du deuxième clivage, (h) stade "quatre cellules" vu du pôle végétal.  
(d'après Verdonk et Van den Biggelaar, 1983)

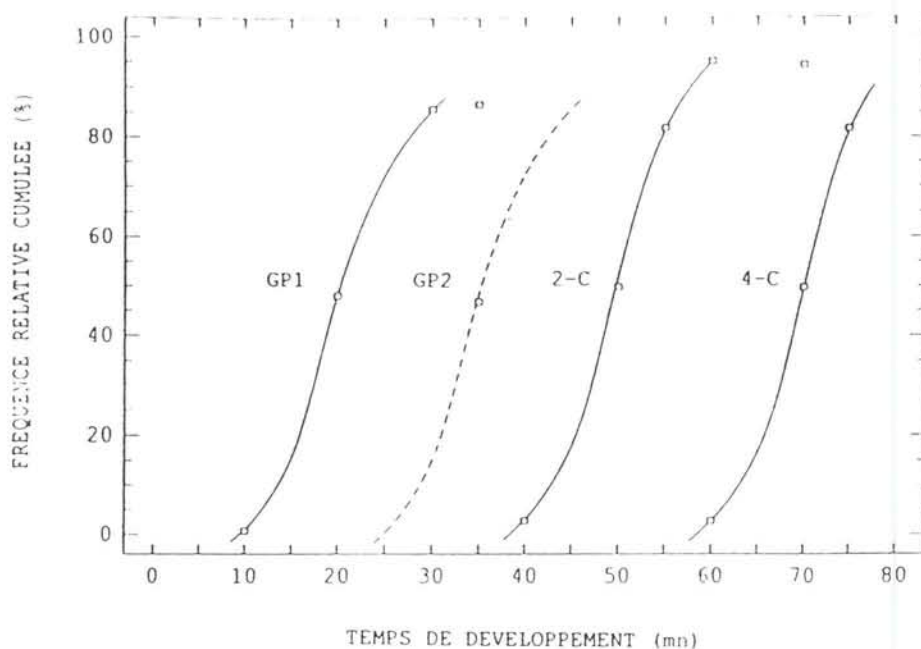
Ce phénomène, présent chez les genres *Musculus*, *Mytilus*, *Crassostrea*, *Ostrea* et *Ensis* n'a cependant pas lieu chez *Cumingia*, *Spisula*, *Teredo*, *Dreissensia*, *Unio* et *Anodonta* (Verdonk et Van Den Biggelaar, 1983). Chez *R. philippinarum*, nous n'avons jamais observé de lobe polaire. Le sillon de division apparaît sous les globules polaires (fig. 5, H) et individualise immédiatement deux cellules filles de taille inégale. Le processus est identique lors de la deuxième division mitotique, mais il ne concerne que la cellule CD, la cellule AB se clivant en son milieu (fig. 5, L à O).

#### 7.2.2. Observations quantitatives

Afin d'estimer les moments d'apparition des globules polaires et des stades 2 et 4 cellules, les oeufs ont été fixés dans du liquide de Carnoy à des intervalles de temps réguliers après la fécondation. Le rythme de division n'étant pas synchrone d'un embryon à l'autre,

plusieurs stades sont présents au même instant. Il a été considéré, suivant Arai et al. (1986) qu'un stade embryonnaire était atteint lorsqu'il représentait 40% de la population.

Les fréquences cumulées relatives de chaque stade sont représentées en fonction du temps (fig. 7). Le GP1 apparaît entre 15 et 20 mn, le GP2 doit être expulsé entre 25 et 30 mn. Le premier clivage a lieu de 45 à 50 mn après la fécondation et le stade 4 cellules est atteint au bout de 65 à 70 mn.



**Figure 7 :** Moments d'apparition du premier et du second globule polaire (GP1 et GP2) et des stades 2- et 4- cellules (2-C et 4-C) chez la palourde. Les sigmoïdes (tracées à la main) représentent les fréquences relatives cumulées de chaque stade présent dans la population (300 individus par comptage).

### 7.3. Essais de triploïdisation de la palourde

#### 7.3.1. Induction par la cytochalasine B

Trois expériences récurrentes ont permis de tester des moments d'application compris entre 0 et 60 mn après l'insémination. Les pourcentages de triploïdie parmi les embryons sont significativement différents d'un



traitement à l'autre ( $F=10,32$  ;  $P < 0,001$ ) mais pas d'une expérience à l'autre ( $F=0,68$  ;  $P > 0,50$ ) (fig. 8). Le pourcentage moyen le plus élevé a été produit par les traitements débutant à 20 mn ( $75,8 \pm 5,7\%$ ). Il n'est cependant pas significativement différent de celui produit par les traitements appliqués 15 mn après insémination. Aucune différence significative n'a été détectée entre les 4 pourcentages de triploïdie obtenus aux temps 19 ou 20 mn après insémination ( $\chi^2=6,32$  ; 3 ddl ;  $P > 0,05$ ).

Les pourcentages de larves anormales (âgées de 7 heures) sont, dans tous les lots traités à la CB, significativement supérieurs à ceux des témoins traités seulement avec le DMSO (fig.9).

Aucune métaphase triploïde n'a été observée dans les témoins.

#### 7.3.2. Performances larvaires

Les pourcentages d'embryons triploïdes ont été de 66,7 et 90,0%, respectivement pour les élevages I et II. Après le traitement, le lot traité et le témoin ont été divisés en deux lots pour l'élevage, dans les deux expériences.

La survie des lots traités a décru régulièrement par rapport au témoin dans les deux élevages (fig. 10). Au moment de la métamorphose, la survie relative moyenne des lots traités représentait respectivement 19,3 et 27,0 % des témoins dans les élevages I et II. La survie absolue des témoins au même moment s'élevait respectivement à 18,4 et 34,3 %.

Le suivi bactérien n'a révélé aucune prolifération anormale qui puisse rendre compte des mortalités observées dans les lots traités. En effet, les nombres de bactéries totales ont varié de 0 à  $10^4$ /ml et ceux de vibrions présumés n'ont pas dépassé 10/ml.

La taille moyenne des larves traitées a été significativement inférieure à celle des témoins, depuis le 3ème jour jusqu'à la métamorphose, dans l'élevage I

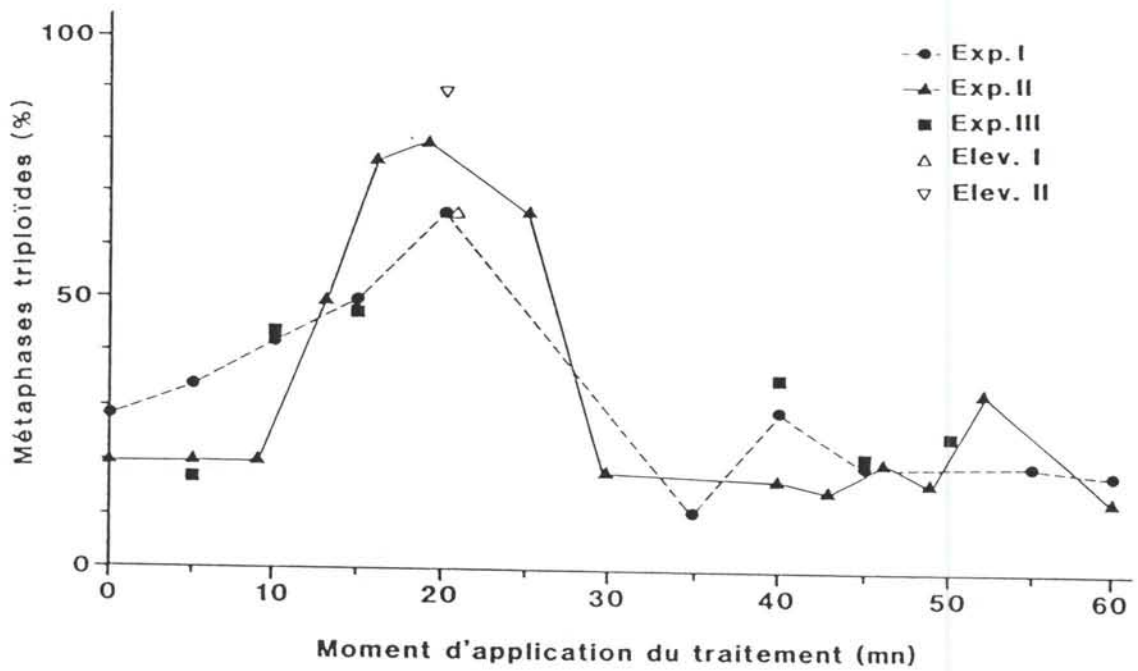


Figure 8 : Pourcentage d'embryons triploïdes chez la palourde, en fonction du moment d'application du traitement avec la CB. Les résultats des 3 expériences de mise au point et de 2 inductions destinées à l'élevage sont reportés sur le graphe.

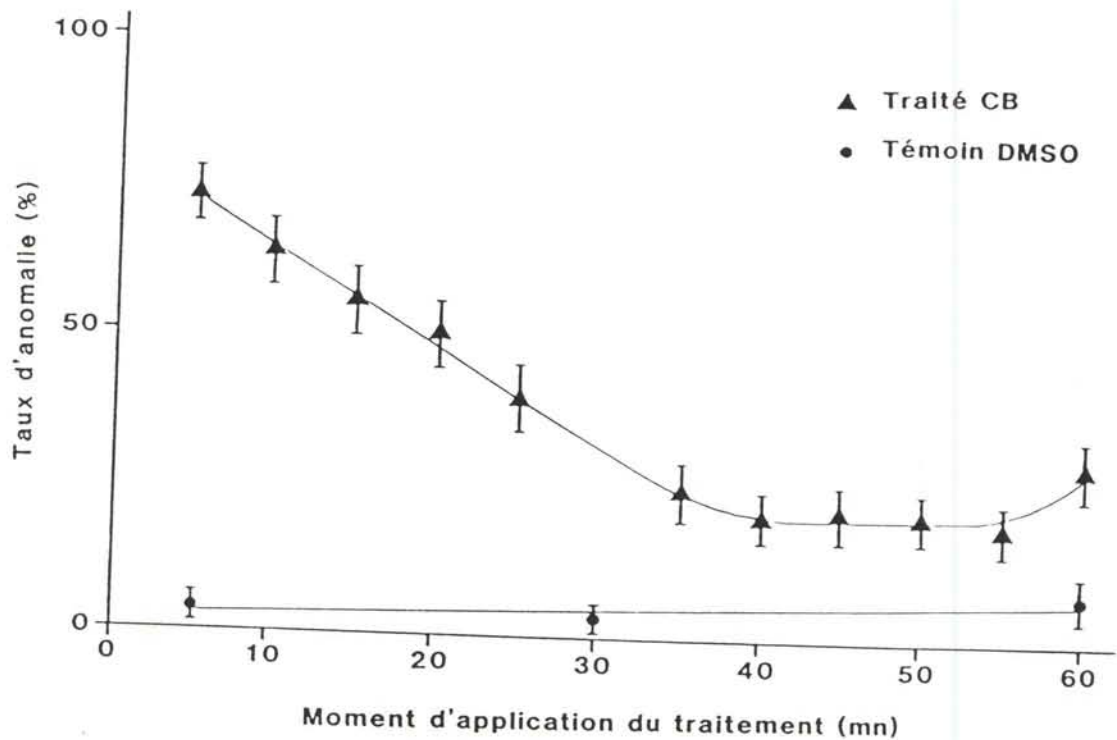


Figure 9 : Taux d'anomalie dans les lots traités avec la CB et dans les témoins traités avec le DMSO seulement, en fonction du moment d'application. Ces observations ont été faites sur des palourdes âgées de 7 heures. Les traits verticaux correspondent aux intervalles de confiance à 95 % (n = 300).

( $F=46,3$ ;  $P < 0,0001$ ) (fig.11). Par contre, dans l'élevage II, aucune différence significative de taille n'a été détectée entre les lots traités et les témoins ( $F=0,12$  ;  $P > 0,70$ ). Pour l'élevage I, le taux de croissance des lots traités a été comparé à celui des témoins. Une analyse de covariance a montré que les pentes des droites de régression étaient égales ( $F=0,84$  ;  $P > 0,5$ ) et que leurs ordonnées à l'origine étaient différentes ( $F=24,6$  ;  $P < 0,05$ ). Les droites sont parallèles et montrent que les individus traités ont conservé leur retard pendant tout l'élevage larvaire, en gardant un taux de croissance égal à celui des témoins.

L'observation des lots traités a montré que les pourcentages de larves D, 26 heures après la fécondation, variaient selon le moment d'application du traitement (fig. 12). Pour les traitements appliqués de 0 à 13 mn et de 46 à 52 mn, les pourcentages de larves D ont été les plus faibles (4 à 26%) et les larves trochophores anormales les plus nombreuses (5 à 25%). Le témoin était composé de 84% de larves D et 16% de larves trochophores normales. Les larves trochophores anormales étaient soit grosses, translucides et entièrement recouvertes de cils, soit atteintes de malformations de la coquille.

### 7.3.3. Evolution de la proportion de triploïdes dans les populations traitées

Les deux élevages ont différé sur ce point. Dans l'élevage I, la différence de pourcentage de triploïdes entre le stade embryonnaire et le stade naissain (4 mois) n'est pas significative (tableau 1). Dans l'élevage II, le pourcentage de triploïdes a changé significativement en chutant de 90 à 32% en moyenne sur les deux réplicats. Cette dernière estimation, sur le naissain, paraît fiable puisque les duplicats ne diffèrent pas significativement l'un de l'autre (tableau 1). On peut estimer la mortalité différentielle des triploïdes (au sein du lot traité) à  $\frac{90\% - 32\%}{90\%} = 64\%$ , dans l'élevage I.



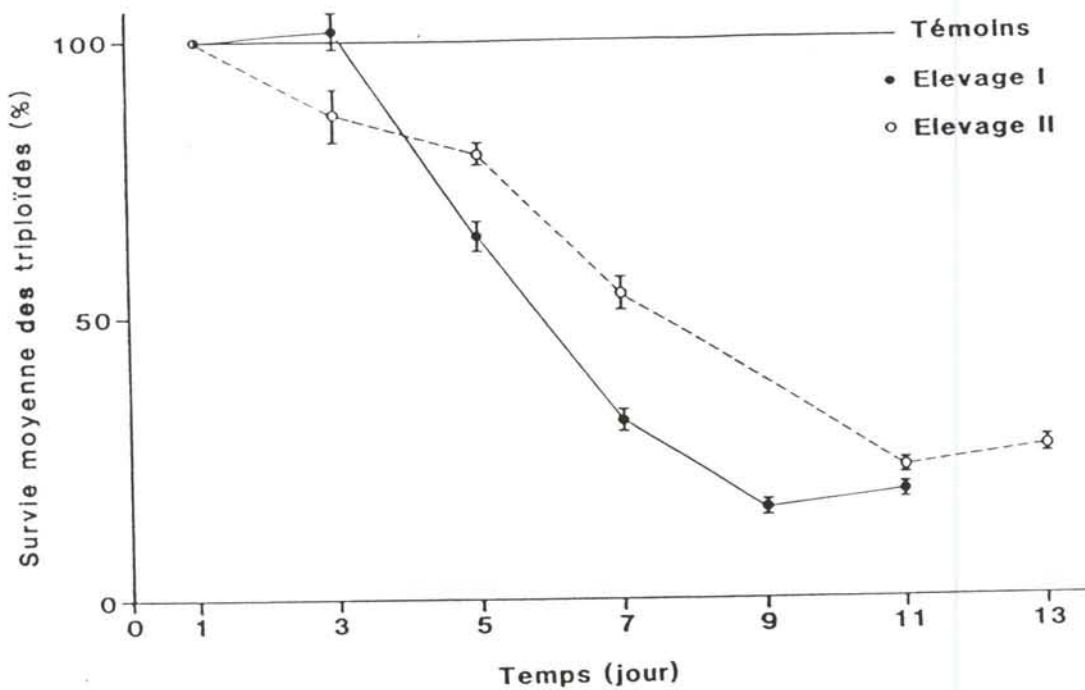


Figure 10 : Survie moyenne (2 réplicats) des lots triploïdisés rapportée à celle des témoins, pendant l'élevage larvaire, chez la palourde. Deux élevages successifs ont été menés. Les traits verticaux représentent l'erreur standard de la moyenne des 2 réplicats. La survie absolue des témoins s'élevait à 18,4 % dans l'élevage I et à 34,3 % dans l'élevage II.

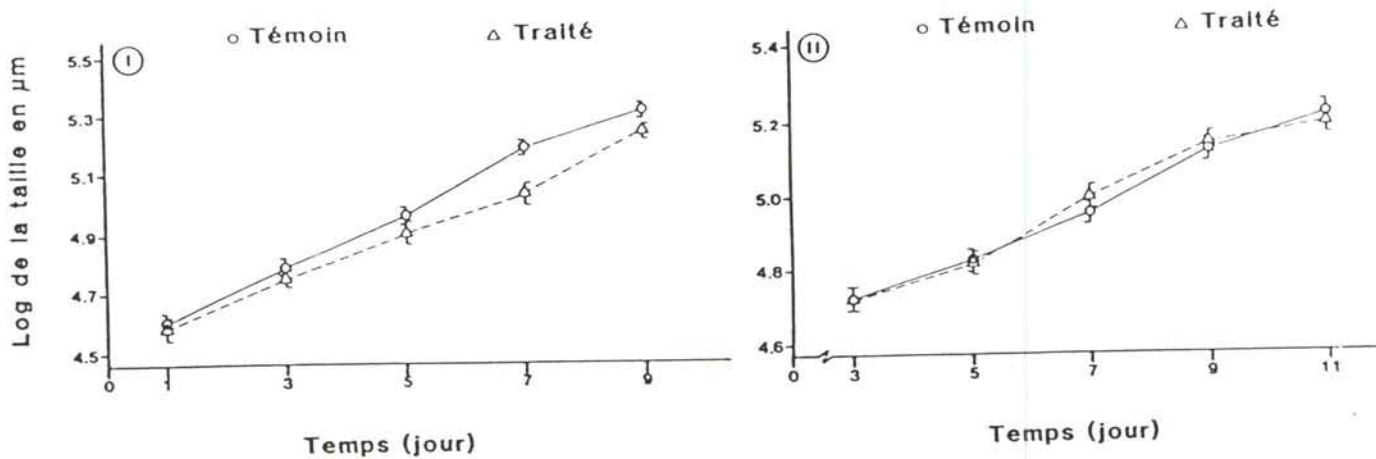
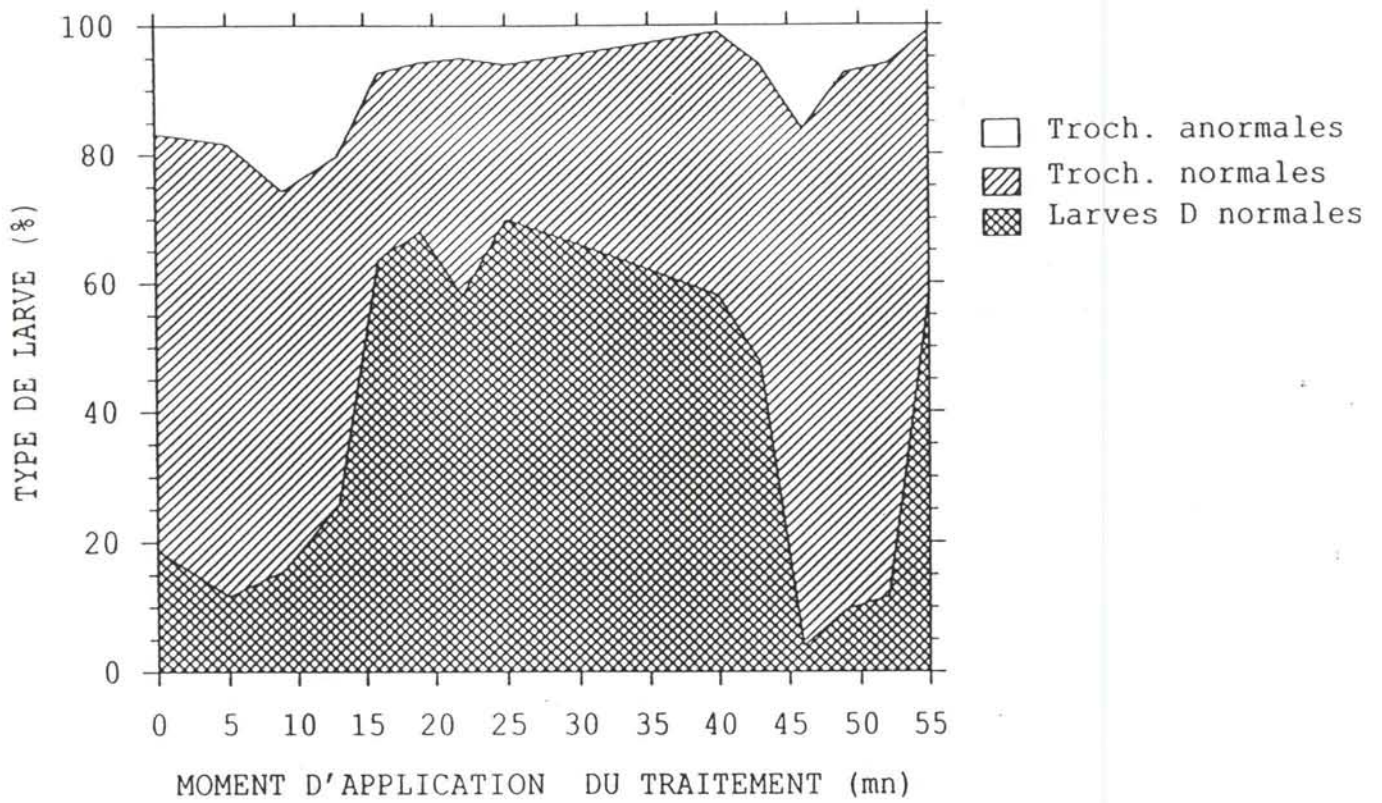


Figure 11 : Croissance des lots traités et des témoins (moyenne des duplicats) dans les deux élevages larvaires de palourdes. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance à 95 %, calculés d'après la variance résiduelle de l'ANOVA.



**Figure 12** : Pourcentages de larves D normales et trochophores normales et anormales en fonction du moment d'application du traitement (CB). L'observation a été faite sur des larves de palourdes âgées de 26 heures. Le témoin était composé de 84 % de larves D et 16 % de larves trochophores normales.

Tableau 1 : Comparaison des pourcentages de triploïdes estimés chez les embryons et dans le naissain de palourde (4 mois) pour les élevages I et II. Les estimations ont été faites sur les deux répliquats, demeurés séparés au stade naissain (1 et 2), pour l'élevage II.

	Elevage I		Elevage II		
	Embryons	Naissain	Embryons	Naissain 1	Naissain 2
Triploïdes	20	19	27	9	5
Diploïdes	7	17	2	15	14
Tétraploïdes	3	0	1	0	0
Total	30	36	30	24	19
Pourcentage de triploïdes	66,7      52,7		90	37,5      26,3	
$\chi^2$ , 1 ddl	1,3 ( $p > 0,05$ )		0,6 ( $p > 0,05$ )		
$\chi^2$ , 2 ddl			24,2 ( $p < 0,001$ )		

#### 7.4. Discussion - conclusion

Le traitement optimal mis au point pour la palourde semble reproductible car les pourcentages de triploïdes induits au cours des différentes expériences successives ne sont pas significativement différentes. Cette méthodologie a depuis lors été confirmée, et les pourcentages d'animaux triploïdes varient généralement entre 60% et 80% (évaluation au stade larvaire). Par contre, les survies larvaires, comparées au témoin, sont relativement faibles. Contrairement aux observations d'Allen (1987) pour les huîtres, les mortalités sont échelonnées tout au long de la vie pélagique. Ce constat laisse penser soit à une différence de sensibilité à la CB des larves de palourdes, soit à une maîtrise relative des techniques d'élevage larvaires. L'application de la méthodologie retenue dans plusieurs écloseries devrait permettre de préciser la bonne hypothèse. Cependant, la grande fertilité des bivalves d'intérêt commercial relativise l'importance de ces données, de faibles survies larvaires (20%) permettant d'obtenir des milliers d'individus par ponte.



Cette remarque est confortée par les études réalisées par Thiriot et al., (1989) qui tendraient à démontrer que, pour les bivalves, les animaux de "tête de lot" ont de meilleures performances de croissance et de survie que les autres.

## 8 - CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de 1989, plusieurs techniques de triploïdisation ont été testées et appliquées avec succès au laboratoire.

D'abord maîtrisée avec l'huître creuse, *C. gigas*, la technique de triploïdisation en utilisant la cytochalasine B a été employée avec la palourde japonaise, *R. philippinarum*. Cette mise au point a nécessité l'acquisition de connaissances sur l'embryologie précoce de cette espèce et le testage de plusieurs moments et durées d'application.

La vérification de la reproductibilité de ces méthodes sera faite au cours de cette année, les objectifs étant de produire des populations significatives d'huîtres creuses et de palourdes triploïdisées. Ces populations seront ensuite mises en élevage, avec des témoins diploïdes normaux afin d'apprécier leur comportement, en particulier leur vitesse de croissance et la qualité de la chair.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, K., 1979. Seasonal changes of the protein level in the adductor muscle of the clam, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve) with reference to the reproductive seasons. *Exp. Biochem. Physiol.*, 64 (A) : 85-89.
- Allen, S.K., Jr., 1987a. Genetic manipulations : critical review of methods and performances, shellfish. *In Proc World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May 1986, Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, pp. 127-144.*
- Allen, S.K., Jr., 1987b. Gametogenesis in three species of triploid shellfish : *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. *In Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May 1986, Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, pp. 207-218.*
- Allen, S.K., JR. and Downing, S.L., 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 102 : 197-208.
- Arai, K., Naito, F. and Fujino, K., 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52 : 417-422.
- 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.
- Chevassus, B., 1987. Caractéristiques et performances des lignées uniparentales et des polyploïdes chez les poissons d'eau froide. *In Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May, 1986. Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, pp. 145-161.*
- Chourrout, D., 1989. Gynogenèse, polyploïdie et transfert de gènes chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Thèse de Doctorat de l'université Paris VI, 60 p.

- Downing, S.L. and Allen, S.K., Jr., 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61 : 1-15.
- Falconer, D.S., 1982. Introduction to quantitative genetics. Longman Ed., New-York.
- Fujino, K., Okumura, S. and Inayoshi, H., 1987. Temperature tolerance differences among normal diploid and triploid Pacific abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 15-21.
- Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalves molluscs : a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In Proc. 9th Eur. Mar. Bio. Symp., Obon Scotland ed. Bamer, Aberdeen, Univ. Press : 191-211.
- Gérard, A., 1978. Recherches sur la variabilité de diverses populations de *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* (Veneridae, Bivalvia). Thèse de Doctorat 3ème cycle, Univ. Bret. Occid., Brest, 149 p.
- Gouletquer, P., Lombas, I. et Prou J., 1987. Influence du temps d'immersion sur l'activité reproductrice et sur la croissance de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et l'huître japonaise *Crassostrea gigas*. *Haliotis*, 16 : 453-462.
- Lannan, J.E., Robinson, A. and Breese, W.P., 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*, 21 : 337-345.
- Longo, F.J., 1983. Meiotic maturation and fertilization. In *The Mollusca*, vol. 3, K.M. Wilbur Ed., Academic Press, New-York, pp. 49-89.
- Longwell, A.C. and Stiles, S.S., 1968. Removal of yolk from oyster eggs by Soxhlet extraction for clear chromosome preparations. *Stain Techn.*, 43 : 63-68.



- Muranaka, M.S. and Lannan, J.E., 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas* : environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, 39 : 217-228.
- Quillet, E. and Panelay, P.J., 1986. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57 : 271-279.
- Stanley, J.G., Allen, S.K., Jr. and Hidu, H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 23 : 1-10.
- Tabarini, C.L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42 : 151-160.
- Thiriot-Quévieux, C. et Ayraud, N., 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. *Mar. Biol.*, 70 : 165-172.
- Verdonk, N.H. and Van Den Biggelaar, J.A.M., 1983. Early development and the formation of the germ layers. *In* *The Mollusca*, vol. 3, K.M. Wilbur Ed., Academic Press, New-York, pp. 91-122.