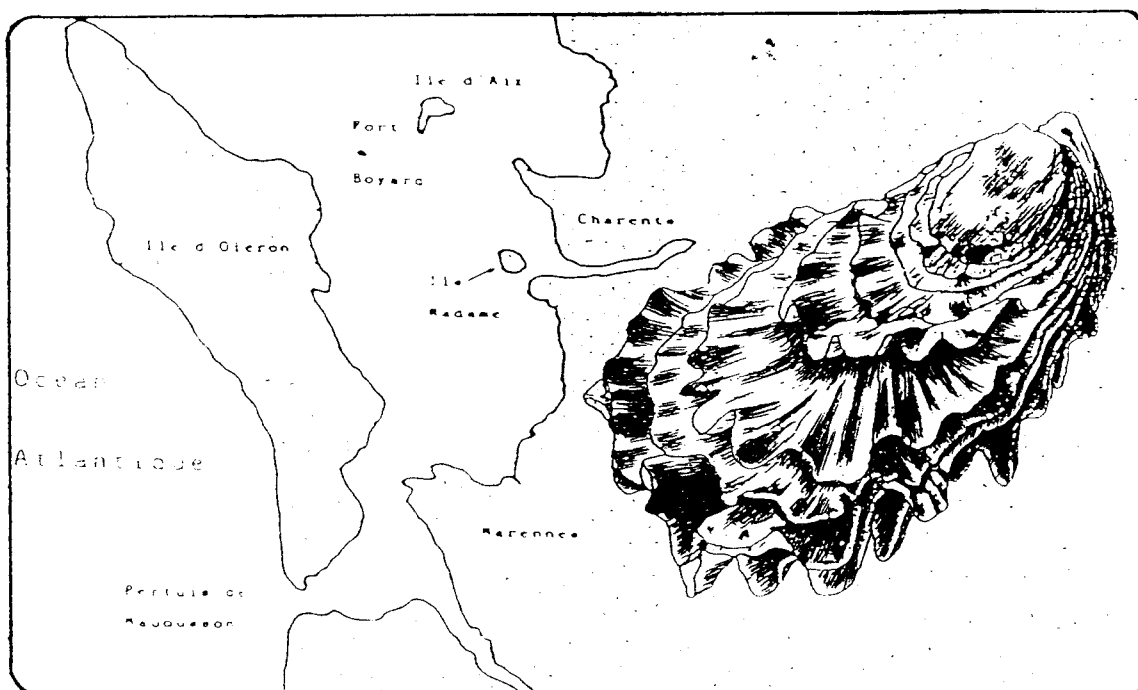


Rapports internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER

OBTENTION DE SOUCHES CONCHYLICOLES PERFORMANTES PAR POLYPLOIDISATION (2ème partie)

André GERARD

Unité de Recherche en Génétique et Eclosion



Adresse : IFREMER URGE BP 133 Ronce les Bains 17390 LA TREMBLADE

DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES

DEPARTEMENT RESSOURCES AQUACOLES

STATION/LABORATOIRE LA TREMBLADE

AUTEUR <p style="text-align: center;">André GERARD</p>	CODE : RIDRV-91-08 RA/La Tremblade
TITRE : Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation (2ème partie)	Date : 06 juin 1991 Tirage en nombre : 50 Nb pages : 37 Nb figures : 23 Nb photos :
CONTRAT (intitulé) N° _____	Convention IFREMER Région Poitou-Charentes 1989 - 1993 Rapport année 1990
DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>	

RESUME

Après la phase de mise en place des systèmes expérimentaux, d'acquisition et d'amélioration des techniques de triploïdisation réalisée en 1989, le programme de l'année 1990 comporte quatre actions principales.

- . la production de populations significatives diploïdes et triploïdes d'huître creuse et de palourde du Pacifique en vue de comparer leurs performances dans les eaux littorales françaises.

- . les premiers essais d'induction de la triploïdie chez la palourde européenne.

- . la mise au point d'une technique du contrôle de la ploïdie à toute période de la vie de l'animal, par imagerie numérique.

- . le bilan des premiers essais d'induction de la tétraploïdie chez *C. gigas* et *R. philippinarum*.

mots clés : Polyploïdie-Triploïdie-Tétraploïdie-Cytogénétique

key words : *Crassostrea gigas* - *Ruditapes philippinarum* -
Ruditapes decussatus - Imagerie numérique



PREAMBULE

Ce document présente les résultats obtenus lors de la deuxième année du programme "Obtention de souches conchyliques performantes par polyploïdisation" réalisé dans le cadre du Contrat Etat région Poitou-charentes. Il fait suite au document de 1990 traitant de la "Maîtrise des techniques de polyploïdisation, application aux espèces d'intérêt commercial en France (huîtres creuses et palourdes)". Rapport interne IFREMER - RIDRV-90.29 - RA/LA TREMBLADE).

Il est aussi le bilan provisoire du travail de nombreuses personnes qui appartiennent, n'appartiennent plus, ou, n'ont jamais appartenu à l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion :

- Cadoret, J.P.
- Cailleteau, G.
- Chagot, D.
- Diter, A.
- Dufy, C.
- Ledu, C.
- Noël, T.
- Peignon, J.M.
- Phélipot, P.
- Simian, Y.

S O M M A I R E

1 - INTRODUCTION	1
2 - RAPPEL DES PROPOSITIONS DE TRAVAIL	2
3 - RAPPEL DU PRINCIPE ET DES TECHNIQUES DE POLYPLOIDISATION	3
3.1 - Introduction de la triploïdie	3
3.2 - Induction de la tétraploïdie	3
4 - CONTROLE DU TAUX DE LA DIPLOIDIE	5
5 - INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE : PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ANNEE 1990	6
5.1 - Production de populations di et triploïdes des huîtres : <i>Crassostrea gigas</i>	
5.1.1 - Technique d'induction	6
5.1.2 - Résultats des essais de production	7
5.1.3 - Evolution du taux de triploïdie	10
5.1.4 - Efficacité et reproductibilité du traitement	10
5.2 - Production de populations di et triploïdes de palourdes du Pacifique <i>Ruditapes philippinarum</i>	13
5.2.1 - Technique d'induction	13
5.2.2 - Résultats des essais de production	13
5.3 - Premiers essais d'induction de la triploïdie chez <i>Ruditapes decussatus</i>	18
6 - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE CONTROLE DE LA POLIDIE PAR IMAGERIE NUMERIQUE	22
7 - CONTROLE DES PERFORMANCES BIOLOGIQUES : MISE EN PLACE DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	25

8 - INDUCTION DE LA TETRAPLOIDIE	26
8.1 - Tétraploïdie diparentale chez la palourde	27
8.2 - Tétraploïdie diparentale chez l'huître creuse	30
8.3 - Gynogénèse chez l'huître	30
8.3.1 - Gynogénèse haploïde	32
8.3.2 - Restauration de la diploïdie	32
8.3.3 - Induction de la tétraploïdie	32
9 - DISCUSSION - CONCLUSION	36

1 - INTRODUCTION - RAPPEL DES OBJECTIFS

L'effort de reproduction chez les mollusques bivalves est prioritaire sur la croissance somatique, il monopolise le métabolisme énergétique dès le printemps pour la gamétogenèse induisant un retard de croissance et une modification des qualités organoleptiques de la chair (Héral et Deslous-Paoli, 1983).

La réduction de la gonadogenèse par induction de la triploidie permet de réorienter ce flux énergétique vers la croissance somatique. La triploïdisation est une des premières techniques de cytogénétique à déboucher sur des applications aquacoles. Chez les mollusques, les recherches ont surtout été menées aux Etats Unis sur plusieurs espèces : *Crassostrea virginica* (Stanley et al., 1981), *C. gigas* (Allen et Downing, 1986, 1987, 1990) *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984), *Haliotis discus* (Arai et al., 1986). Ces expériences ont mis en évidence, notamment chez *C. gigas*, une stérilité partielle des individus triploïdes accompagnée d'une amélioration des performances de croissance et le maintien d'une teneur élevée en glycogène tout au long de l'année.

En France, cette technique a surtout été développée dans le domaine piscicole par l'INRA, la production de poissons triploïdes a permis d'obtenir des gains de croissance (Chourrout, 1989) résultant effectivement d'une réduction gonadiale et une stabilité de la qualité de la chair (Chevassus, 1987). Chez les mollusques les recherches ont surtout été approfondies depuis la création de l'écloserie de La Tremblade notamment dans le cadre du présent contrat Etat-Région Poitou-Charentes où les techniques de triploïdisation sont appliquées aux principales espèces françaises d'intérêt commercial : l'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'huître plate *Ostrea edulis*, la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et la palourde européenne *Ruditapes decussatus*.

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 comprenait la mise en place de 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.

Le rapport de 1990 présente :

- . la production de lignées di et triploïdes de *Crassostrea gigas* et de *Ruditapes philippinarum*,
- . les premiers essais d'induction de la triploïdie chez *Ruditapes decussatus*,
- . La mise au point d'une technique de contrôle de la ploïdie par analyse d'image,
- . la mise en place du protocole de contrôle des performances dans le milieu naturel pour *C. gigas*,
- . les essais d'induction de la tétraploïdie

3 - RAPPEL DU PRINCIPE ET DES TECHNIQUES DE POLYPLOIDISATION

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

La méiose étant achevée chez les spermatozoïdes, la modification du nombre de chromosomes n'est envisageable que chez les ovocytes qui sont bloqués au stade prophase ou au début de la métaphase de la lère division méiotique (Lucas, 1971). C'est la pénétration du spermatozoïde qui provoque l'achèvement de la méiose et l'expulsion des deux globules polaires (Fig. 1).

3.1 - Induction de la triploïdie

Deux méthodes sont utilisables :

- la rétention d'un des deux globules polaires par un traitement physique ou chimique approprié : choc de pression, choc de température ou traitement à la cytochalasine B (Fig. 1).

- le croisement d'un individu diploïde ($2N$) avec un individu tétraploïde ($4N$) engendre des individus triploïdes. Cette méthode, qui est la plus fiable et qui évite le traitement des oeufs à chaque génération ne sera applicable que si des tétraploïdes viables et fertiles sont obtenus.

La technique d'induction retenue à l'issue des premiers essais est le traitement chimique à la cytochalasine B.

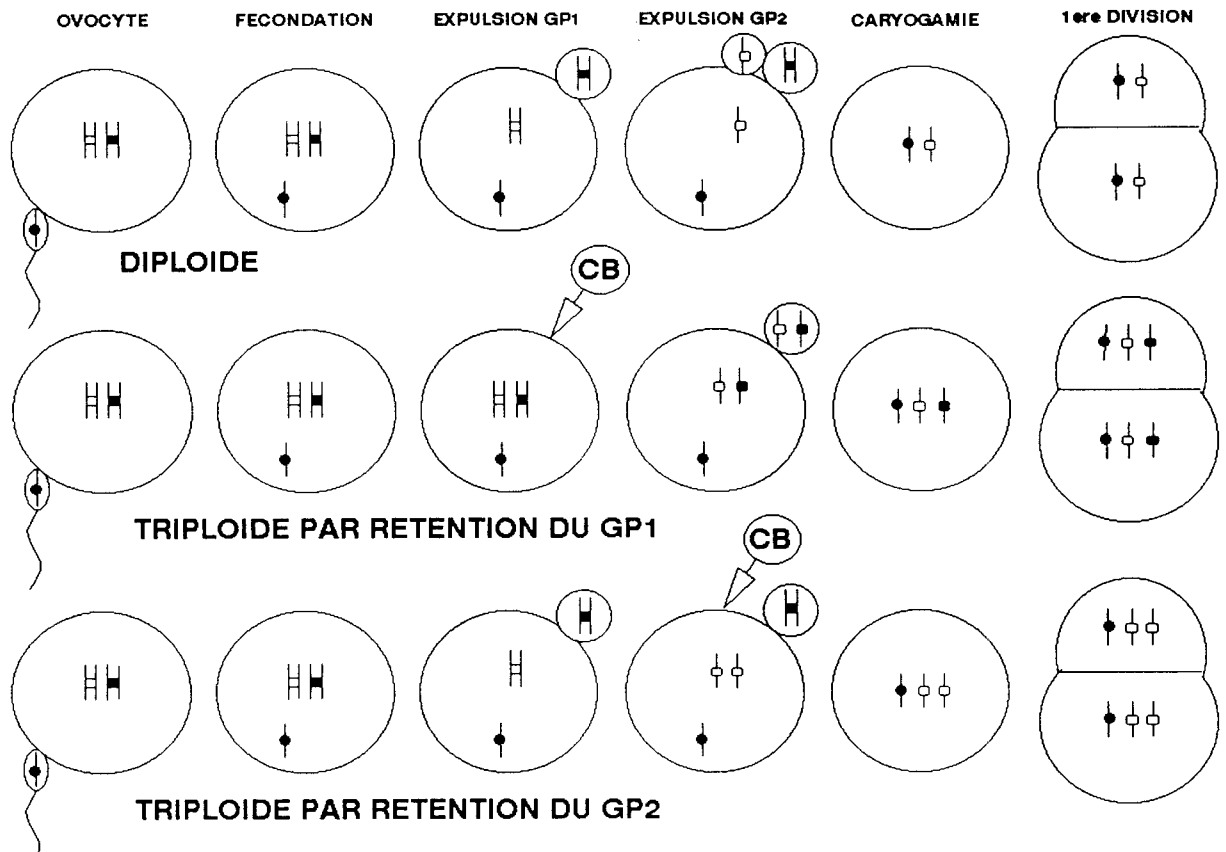
L'efficacité de l'action de la cytochalasine B dépend de plusieurs paramètres : la concentration, la température, la durée et le moment d'application du traitement. Ces paramètres qui sont fonction de la biologie et du développement embryonnaire doivent être déterminés pour chaque espèce.

3.2 - Induction de la tétraploïdie

Diverses méthodes sont utilisables dont principalement :

- la rétention des deux globules polaires précédée d'une inactivation du stock chromosomique du spermatozoïde (tétraploïdie gynogénétique),

Fig.1: INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE



- la suppression de la première division mitotique (tétraploïde endomitotique).

Tant qu'une méthode d'obtention de tétraploïdes viables ne sera pas mise au point, aucune technique n'est écartée :

- Traitements chimiques
- Chocs de pression
- Chocs thermiques
- Electrofusion

La rétention des globules polaires ou la suppression de la première division mitotique peuvent être obtenues, soit par un traitement chimique, soit par des traitements physiques (chocs de pression ou chocs thermiques).

4 - CONTROLE DU TAUX DE POLYPLOIDIE

Tous les contrôles réalisés en 1990 ont été effectués par analyse caryologique. Les chromosomes métaphasiques ont été préparés selon la technique de la suspension cellulaire, aussi bien pour les embryons que pour le naissain (Rapport interne RIDRV-90.29).

5 - INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE : PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ANNEE 1990

5.1 - Production de populations di et triploïdes d'huître creuse : *Crassostrea gigas*

Au cours de cette deuxième année du programme, l'objectif principal était l'obtention de lignées diploïdes et triploïdes en nombre significatif afin de tester leurs performances biologiques dans le milieu naturel.

Nos efforts se sont surtout concentrés sur *C. gigas* dont l'impact économique n'est plus à démontrer, avec dans un premier temps, une amélioration et une simplification de la technique d'induction afin de l'appliquer à un grand nombre d'ovocytes, et, dans un deuxième temps, à des essais de production de plusieurs milliers d'animaux diploïdes et triploïdes.

5.1.1 - Technique d'induction

Elle ne diffère pas fondamentalement de celle mise au point en 1989 (Rapport interne RIDRV-90.29) à partir de la méthode de Downing et Allen (1987). Toutefois quelques variantes ont été apportées :

La récolte des gamètes a tantôt été réalisée selon la méthode classique des chocs thermiques, tantôt par "stripping" : méthode qui présente l'avantage de supprimer la phase de stimulation de la ponte et d'attente d'expulsion des gamètes, et qui permet d'obtenir, chez *gigas*, des gamètes parfaitement matures à un stade d'évolution méiotique bien synchrone chez tous les ovules et avec l'assurance d'une absence totale de fécondation incontrôlée.

Le traitement des oeufs a été effectué à $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, par de la cytochalasine B à la concentration de 0,5 mg/l, celle-ci étant préalablement dissoute dans du DMSO (1 mg/ml).

Le traitement d'une durée de 20 mn a été le plus souvent appliqué à deux moments différents : 20 et 25 minutes, un lot témoin diploïde, étant réalisé sur le même pool d'oeufs.

Le système de tamisage des oeufs à l'issue du traitement a été modifié. Un tamis de 300 mm de diamètre comprenant une toile de 10 microns de vide maille placé sur plusieurs épaisseurs de tissu éponge a tout simplement été utilisé plutôt que le système nécessitant une pompe à vide décrit par Duffy (1988).

Après la période de rinçage dans du DMSO (1 ml/l) pendant 20 minutes, les oeufs ont été directement déversés dans les bacs d'incubation sans subir un nouveau tamisage.

5.1.2 - Résultats des essais de production

Le développement larvaire de *C. gigas* a été perturbé toute l'année par des blocages de croissance enregistrés entre le 4ème et le 6ème jour de l'élevage (Fig. 2).

L'origine de ces blocages n'a pu être clairement identifiée malgré de nombreuses analyses chimiques et bactériologiques, et de multiples recherches zootechniques.

Ces difficultés de production de larves de gigas ont également été rencontrées dans différentes écloseries françaises, y compris à l'écloserie IFREMER d'Argenton. Une réunion regroupant différents laboratoires et écloseries a été organisée par nos soins au tout début de l'année 1991 pour établir un bilan de la situation sur le littoral français et pour mettre en place un protocole d'étude en 1991.

Malgré ces difficultés, trois lots de 10.000 triploïdes (élevages 9021 et 9026) ont été obtenus. Mais ces élevages qui comportaient 60 à 70% de triploïdes lors du contrôle caryologique effectué 6 heures après la fécondation présentaient seulement 20 à 30% de larves à développement normal dans le témoin diploïde.

A l'issue du contrôle caryologique réalisé sur le naissain de 1 à 2 cm, l'élevage 9026 n'a pas été conservé, le taux de triploïdes ayant considérablement diminué : de 66 à 20%. En conséquence, seuls les résultats de l'élevage 9021 (du 5 juillet 1990) seront surtout présentés ici, mais avec toutes les réserves qui s'imposent puisque seulement 23% des larves diploïdes ont atteint le stade pédivéligère. On peut toutefois remarquer que la mortalité dans les lots triploïdes (Fig. 3) a été encore plus forte puisque seulement 5,4% des larves ont atteint ce stade dans le lot CB-20mn et 5,9% dans le lot CB-25mn.

A l'inverse, la croissance larvaire des lots triploïdes a été légèrement supérieure surtout après le 15ème jour d'élevage (Fig 4), cette légère différence s'est maintenue juste après la métamorphose.

Ensuite, pendant la période de prégrossissement entre le mois d'août 1990 et le mois de février 1991, les conditions d'élevage n'étaient pas suffisamment contrôlées pour autoriser une quelconque comparaison. Les différents lots ont néanmoins été maintenus dans des conditions aussi homogènes que possible pour les amener à une taille permettant leur transfert en mer.

Fig.2 : BILAN ELEVAGES GIGAS 1990
CROISSANCE LARVAIRE

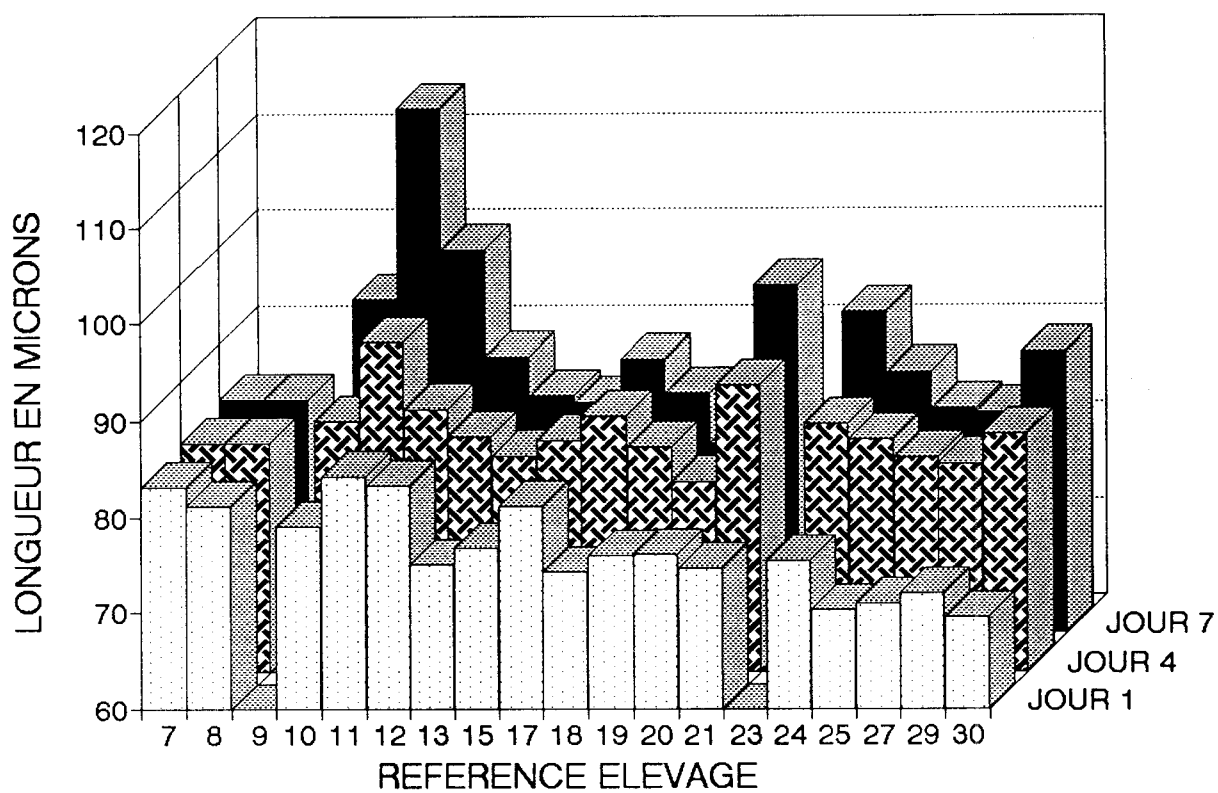


Fig. 3 : Elevages larvaires *Crassostrea gigas*
Mortalités comparées

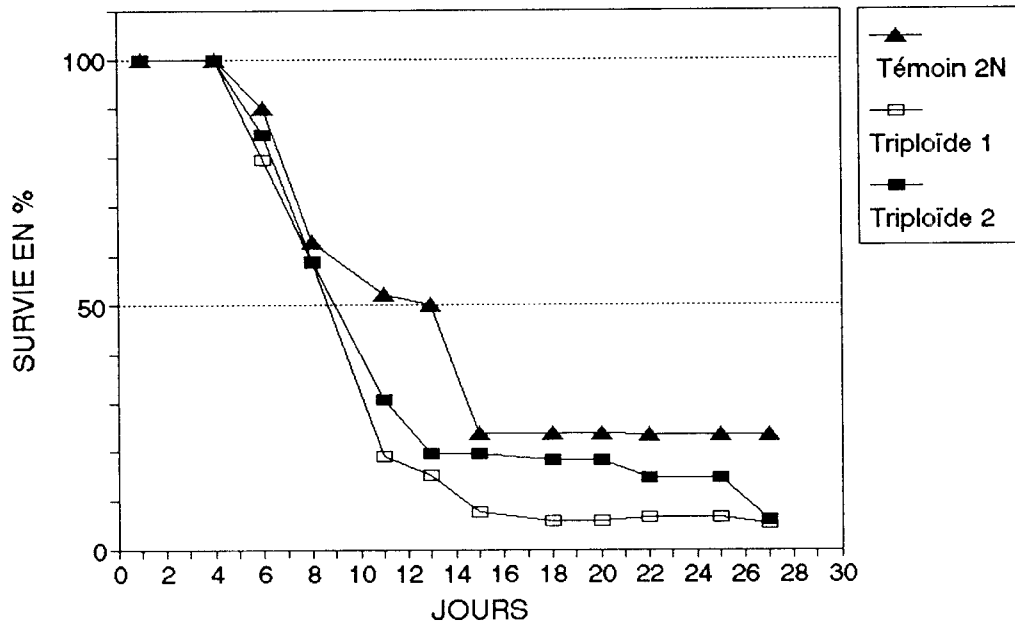
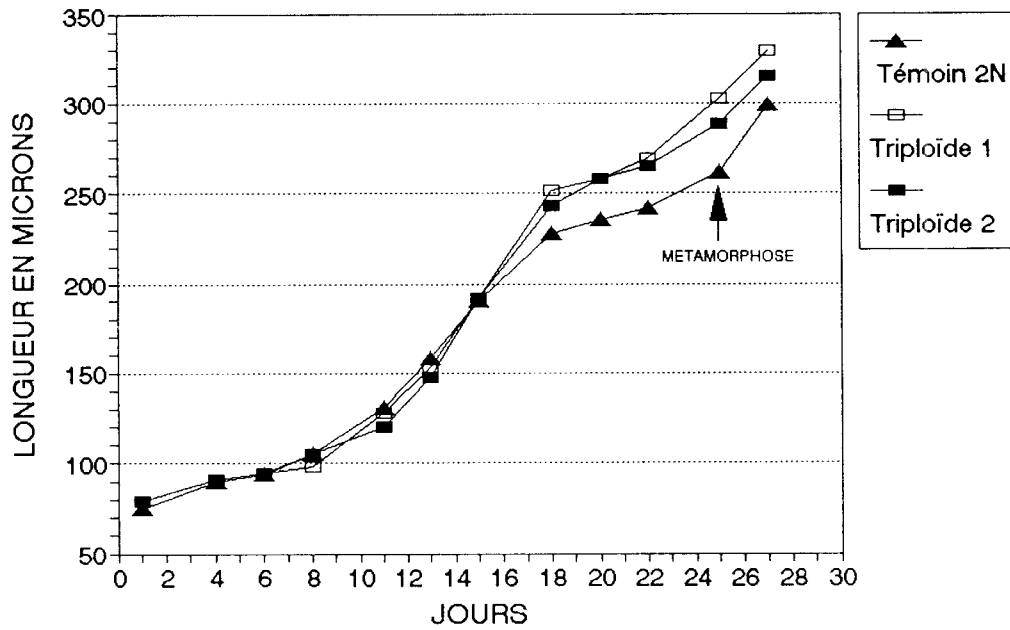


Fig. 4 : Elevages larvaires de *Crassostrea gigas*
Croissances comparées



5.1.3 - Evolution du taux de triploïdie

Les moyens de contrôle de la ploïdie en 1990 étant uniquement basés sur l'analyse caryologique, le deuxième bilan du taux de triploïdie n'a pu être réalisé que sur le naissain de 6 mois d'une taille de 2 à 3 cm.

La forte diminution de ce taux dans l'élevage 9026 a déjà été mentionnée plus haut, pour l'élevage 9021 l'évolution a été négative pour le lot CB-20mn (Fig. 5) et légèrement positive pour le lot CB-25mn. Dans ce dernier cas, si l'on considère que les embryons tétraploïdes observés à 6 heures n'ont pas survécu, le pourcentage de triploïdes est resté à peu près constant.

5.1.4 - Efficacité et reproductibilité du traitement

Les anomalies rencontrées dans le développement larvaire de *C. gigas* nous ont obligé à multiplier les élevages et les inductions afin d'obtenir des lots significatifs de triploïdes. Les résultats bruts des contrôles caryologiques effectués 6 heures après ces traitements sont présentés dans la figure 6.

Les traitements réalisés 20 minutes après la fécondation s'avèrent tout aussi performants que les traitements à 25 minutes préconisés par Ledu (1989) et Diter (1990). Mais dans les deux cas, une forte variabilité est enregistrée, de 43 à 94% pour le traitement à 20 minutes et, de 47 à 78% pour l'induction à 25 minutes. Des études complémentaires seront nécessaires pour essayer de cerner les critères d'une plus grande régularité.

L'élevage 15 a non seulement fourni le meilleur taux de triploïdie, 94% à 20 mn, et 78% à 25 mn mais également le meilleur rendement au stade larvaire D (Fig. 6 et 7). Les 39 millions de larves D "triploïdes" obtenues lors de cet élevage ont malheureusement, tout comme le témoin diploïde, subi un blocage de croissance entre le 4ème et le 7ème jour d'élevage.

Fig.5: Crassostrea gigas
Evolution du taux de triploïdie

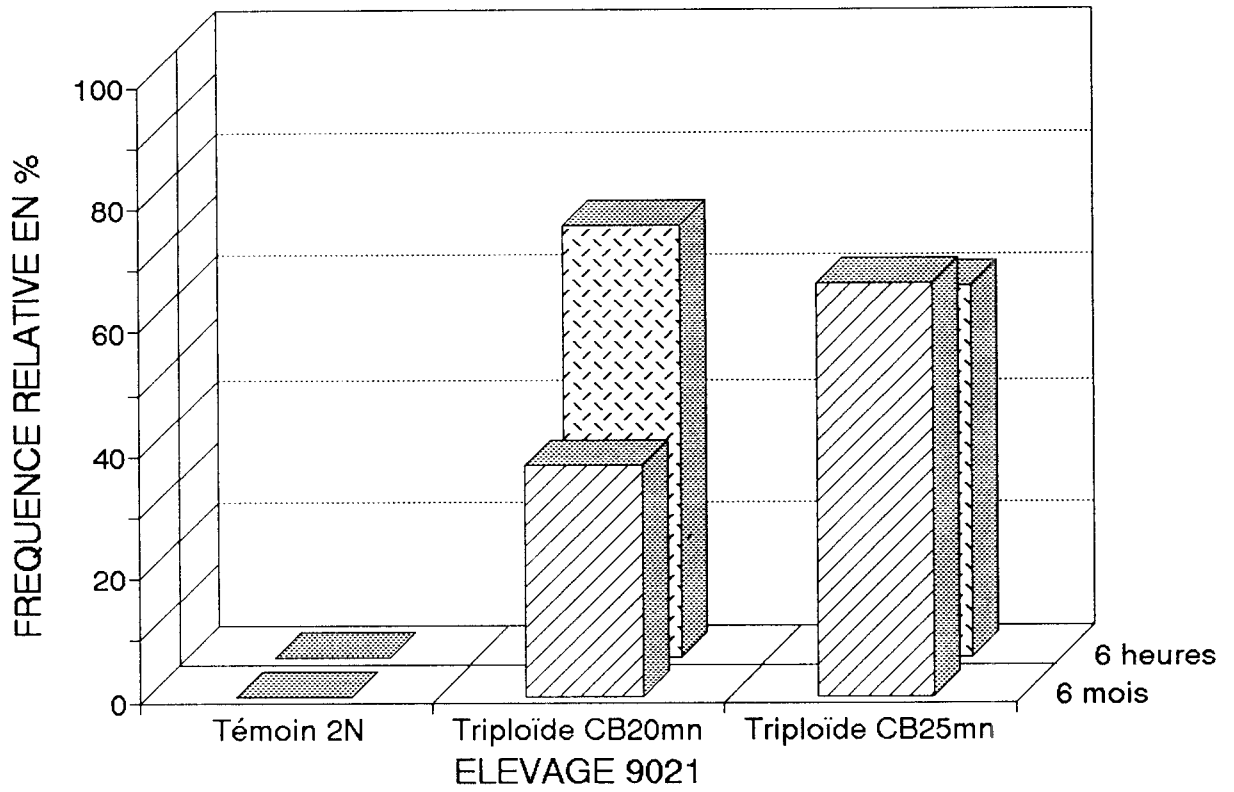


Fig.6:TRIPLOIDIE CHEZ CRASSOSTREA GIGAS
Bilan des inductions (embryons de 6h.)

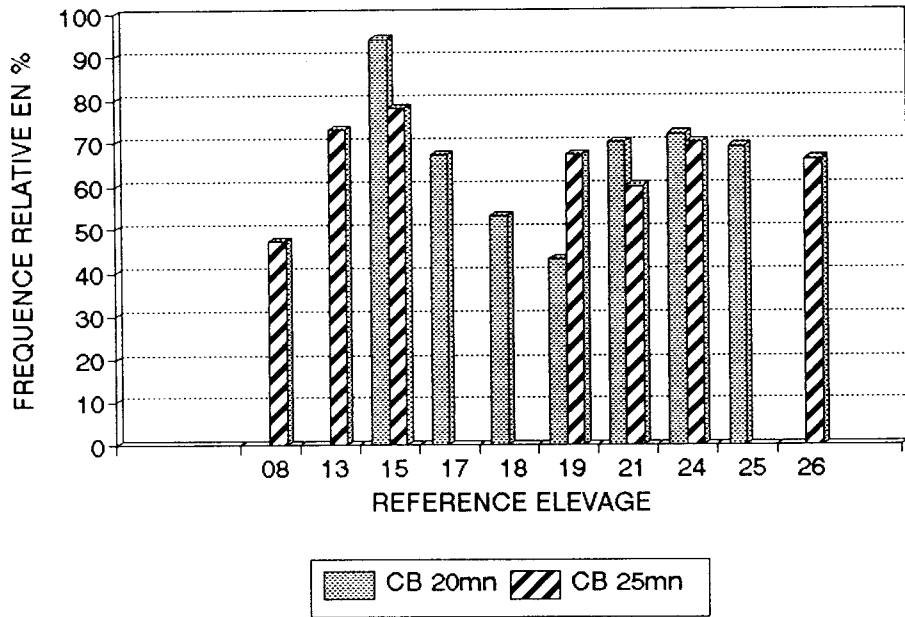
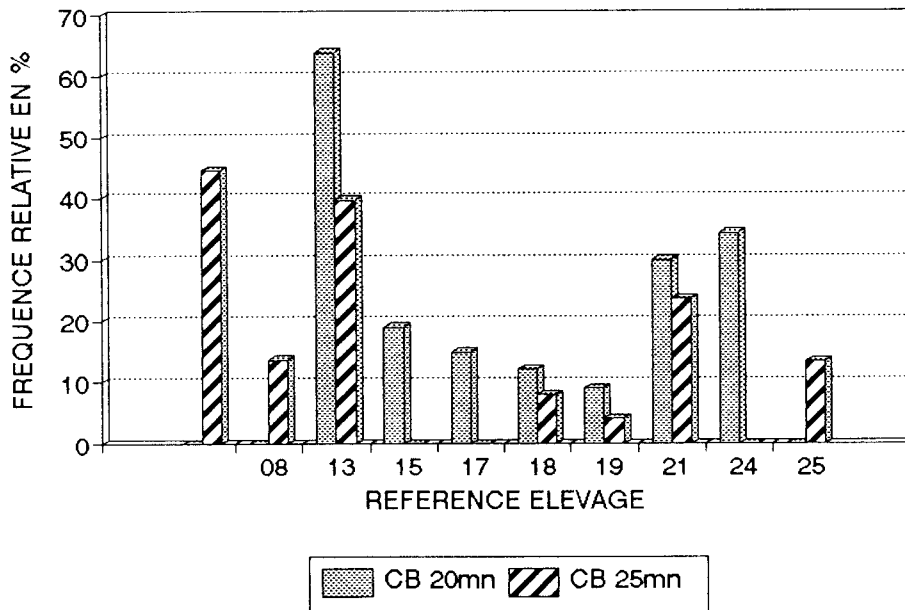


Fig.7:TRIPLOIDIE CHEZ CRASSOSTREA GIGAS
Survie relative au stade larve D



5.2 - Production de populations di et triploïdes de palourdes du Pacifique *Ruditapes philippinarum*.

5.2.1 - Technique d'induction

Celle-ci a déjà fait l'objet d'études approfondies au laboratoire Dufy (1988), Ledu (1991), Diter (1990), Dufy et Diter (1990).

Le protocole d'induction de la triploïdie par la cytochalasine B semble parfaitement optimisé pour cette espèce, il a été appliqué tel qu'il a été défini par Dufy et Diter (1990) mais avec les mêmes aménagements techniques que ceux mis au point pour *C. gigas*.

Les oeufs sont traités 20 minutes après la fécondation, à $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, avec de la cytochalasine B à la concentration de 1mg/l préalablement dissoute dans du DMSO (1mg/l), et déversés directement dans le bac d'incubation à raison de 100 embryons/ml au maximum.

5.2.2.- Résultats des essais de production

Un premier essai d'induction a été réalisé le 14 juin 1990 (élevage 9016) avec des animaux insuffisamment mature, ce qui s'est traduit par un développement larvaire très lent et un faible taux de métamorphose. Bien que l'élevage ait été abandonné, il a permis de vérifier l'efficacité du traitement préconisé par Dufy et Diter (1990) puisque 76,6% d'embryons triploïdes ont été décélés 6 heures après la fécondation dans les deux lots traités (Fig. 8).

Un deuxième essai (élevage 9022), effectué le 10 juillet 1990, avec des géniteurs conditionnés depuis 42 jours au laboratoire, a fourni des taux de triploïdes extrêmement voisins ; respectivement 76,6%, 80% et 72,7%.

Ces résultats confirment les taux moyens trouvés par Dufy et Diter (1990) : $75,8\% \pm 5,7\%$ sur quatre expériences.

L'influence du traitement sur le développement larvaire est présenté dans la figure 9, le taux de larves D normal a été calculé par rapport à celui du témoin diploïde. Cette survie relative a été beaucoup plus forte que dans les expériences réalisées sur *C. gigas*.

La survie pendant la phase larvaire diffère totalement des résultats de Dufy et Diter (1990) qui ont observé une mortalité différentielle entre le témoin et les lots traités, se traduisant par une survie relative moyenne de

Fig.8 : TRIPLOIDIE CHEZ RUDITAPES PHILIPPINARUM
 Bilan des inductions (embryons de 6h.)

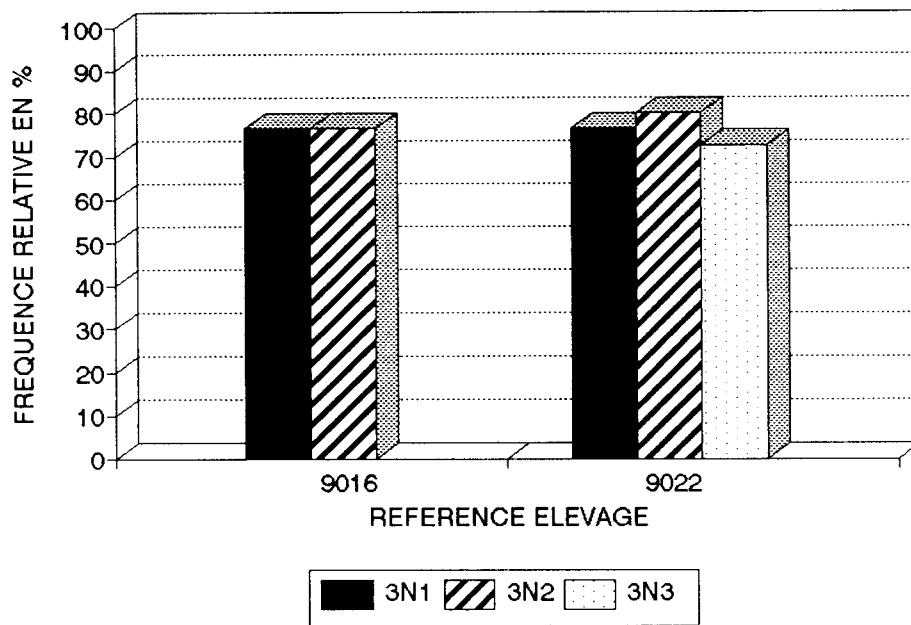


Fig.9 : TRIPLOIDIE CHEZ RUDITAPES PHILIPPINARUM
 Survie relative au stade larve D

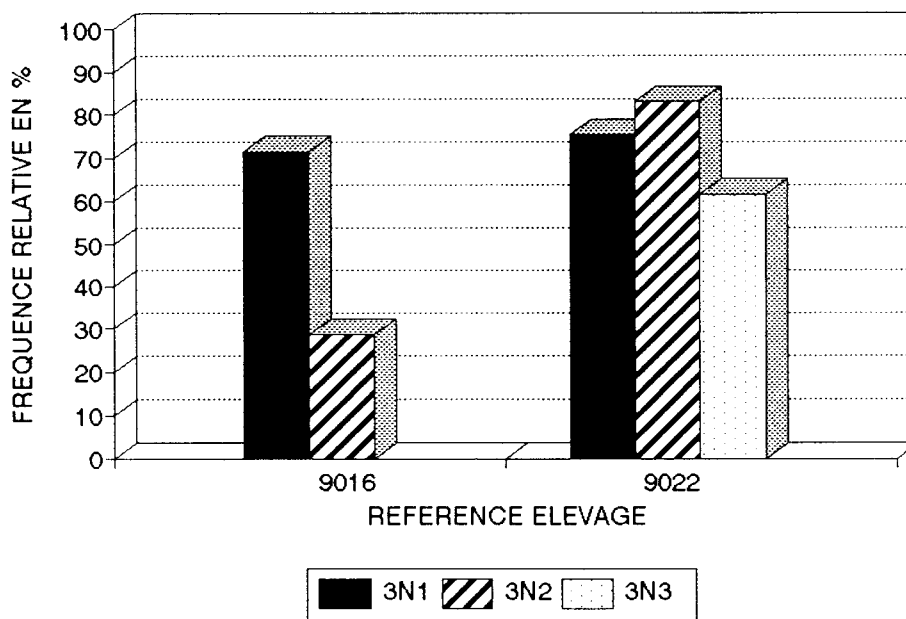


Fig.10:Elevages Ruditapes philippinarum
Mortalités larvaires comparées

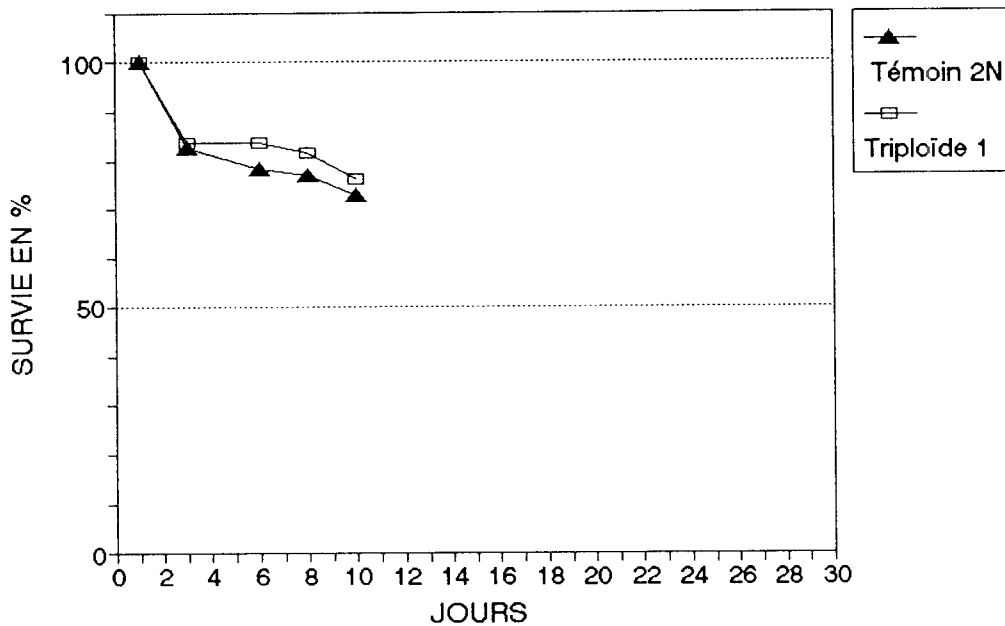
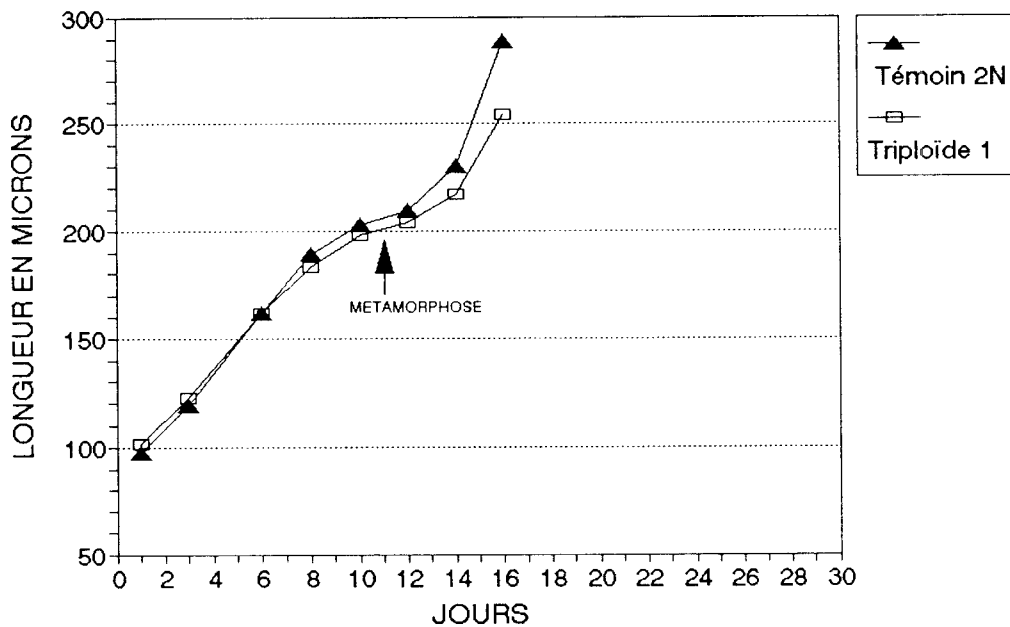


Fig.11:Elevages Ruditapes philippinarum
Croissances larvaires comparées



19 à 27% dans les lots traités alors que la survie absolue des témoins n'était au même moment que de 18 à 34%.

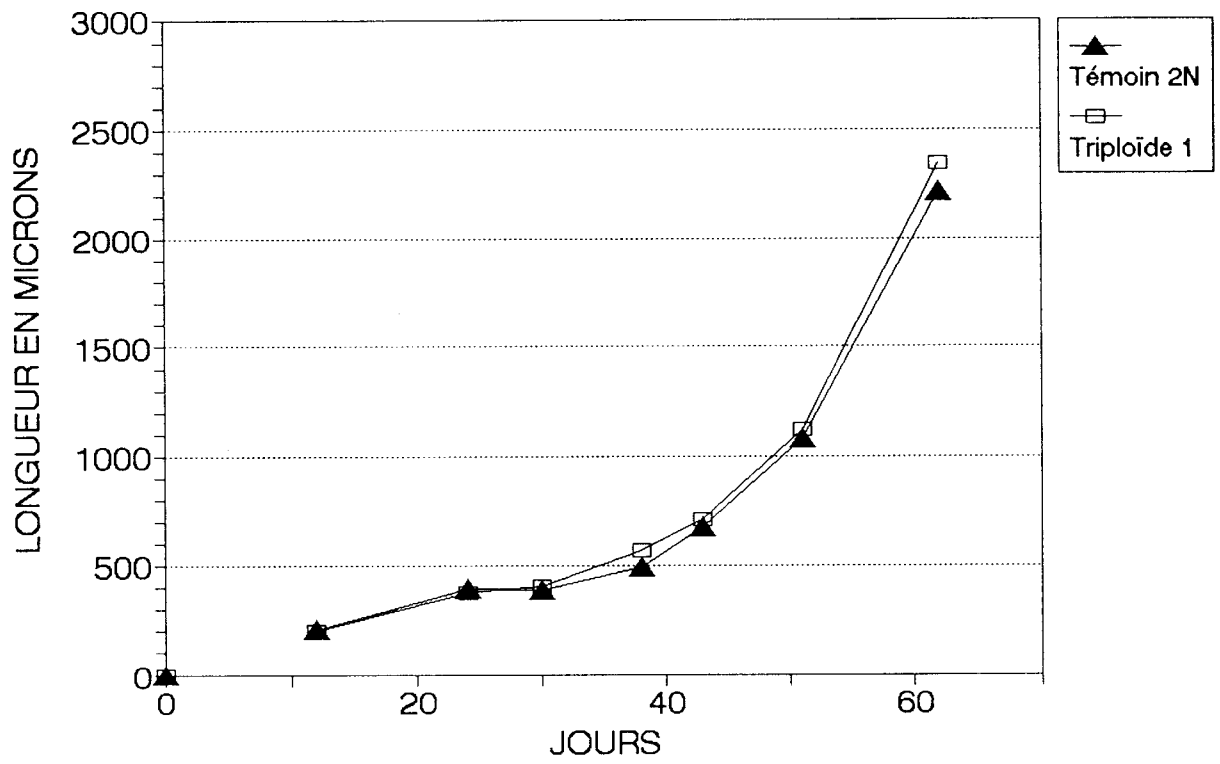
Les survies enregistrées dans notre élevage 9022 (Fig. 10) confirme l'observation de Ledu (1989) qui n'avait pas trouvé de différence entre le lot traité et le témoin (respectivement 39,4% et 36,3%), mais avec des taux nettement supérieurs puisqu'en en valeur absolue 76,3% des triploïdes ont atteint le stade pédivéligère pour 72,9% des témoins diploïdes.

En ce qui concerne la croissance larvaire les résultats sont comparables à ceux obtenus par Dufy et Diter (1990) la métamorphose est atteinte entre le 10ème et le 12ème jour, les palourdes triploïdes accusant un léger retard par rapport aux diploïdes (Fig. 11).

Pendant la métamorphose et le développement postlarvaire, les palourdes ont été placées dans la micronurserie de La Tremblade qui n'est pas encore totalement équipée pour faire une étude comparative de la croissance, malgré cette imperfection, notamment dans le contrôle du débit, les taux ont sensiblement été les mêmes entre les deux lots (Fig. 12).

A partir du 62ème jour d'élevage, un lot de 500.000 "triploïdes" et un lot témoin de 200.000 diploïdes ont été transférés à la nurserie IFREMER de BOUIN pour accélérer leur prégrossissement avant la période hivernale. Elles ont été ramenées à La Tremblade fin janvier 1991 pour achever leur nursage et établir les bilans des taux de triploïdie avant d'entamer la phase de contrôle des performances dans le milieu naturel.

Fig.12:Elevages Ruditapes philippinarum
Croissances postlarvaires comparées



5.3 - Premiers essais d'induction de la triploïde chez *R. decussatus*

Dans le programme initial de polyploïdisation des principales espèces de bivalves d'intérêt commercial, la palourde européenne n'avait pas été retenue comme espèce cible. Mais devant l'engouement du marché espagnol pour cette espèce, face à la maladie des "anneaux bruns" et aux difficultés de commercialisation qui frappe actuellement la palourde du Pacifique, nous avons décidé d'étendre nos recherches à la palourde européenne.

La triploïdisation de cette espèce n'ayant fait l'objet d'aucune publication, la technique d'induction était donc à mettre au point. L'efficacité de l'action de la cytochalasine B dépendant de plusieurs paramètres : la concentration, la durée, la température et le moment d'application ; eux-mêmes dépendant de la biologie et du développement embryonnaire de l'espèce testée ; tous ces paramètres devaient être déterminés.

Ces travaux n'ont pu débuter qu'en fin d'année. N'ayant à notre disposition qu'un lot de géniteurs provenant d'une maturation décalée (10-13°C depuis le 15 avril puis 23°C à partir du 15 août) une induction a été tentée en utilisant empiriquement les données du développement embryonnaire, la dose (1 mg/l) et la durée du traitement (15 mn) de *R. philippinarum*, avec 3 moments d'application 15, 20 et 25 minutes et une température légèrement plus faible (23°C).

Les résultats de cette induction et la survie relative au stade larve D sont présentés dans les figures 13 et 14. Les croissances larvaires (Fig. 15) des lots traités (sauf le lot CB 25 mn qui n'a pas été conservé), ont été semblables à celle du témoin diploïde jusqu'au stade pédivéligère. Les survies, pendant cette même période (Fig. 16), ont été légèrement plus faibles dans les lots traités (63,3 et 65,3% pour 79,3% dans le témoin).

Si ces résultats semblent satisfaisants, ils ne font toutefois pas ressortir les nombreuses déformations observées pendant l'élevage larvaire sur les prodissoconques des lots traités. La métamorphose de ceux-ci s'est accompagnée de fortes mortalités qui nous ont amené à suspendre l'élevage au bout du 30ème jour.

Fig.13 : TRIPLOIDIE CHEZ RUDITAPES DECUSSATUS
Bilan des inductions (embryons de 6h.)

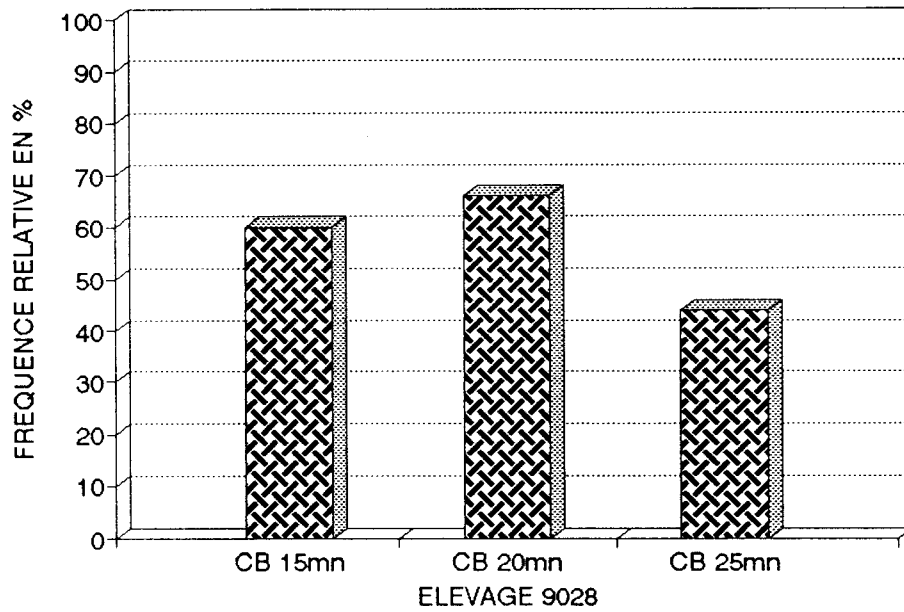


Fig.14 : TRIPLOIDIE CHEZ RUDITAPES DECUSSATUS
Survie relative au stade larve D

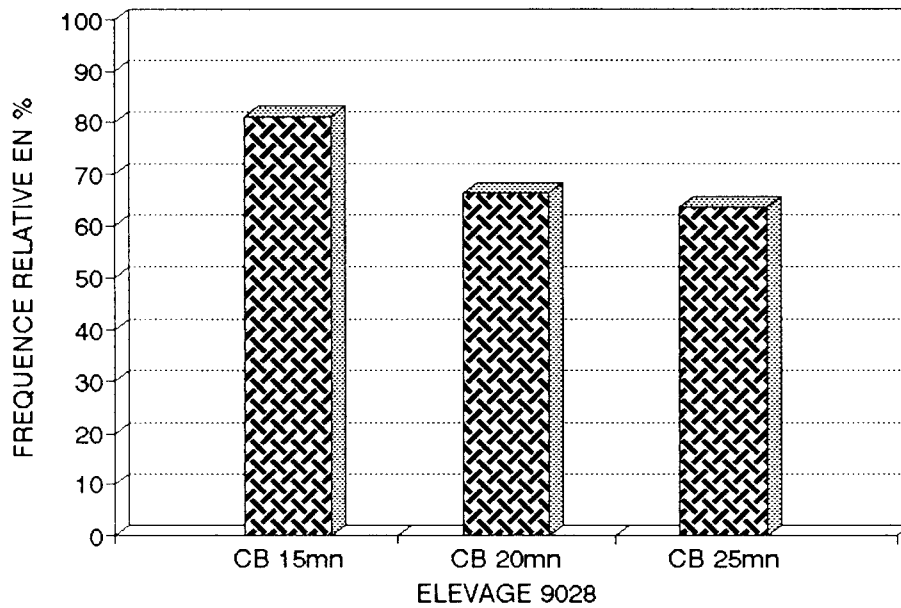


Fig.15: Elevages de Ruditapes decussatus
Croissances larvaires comparées

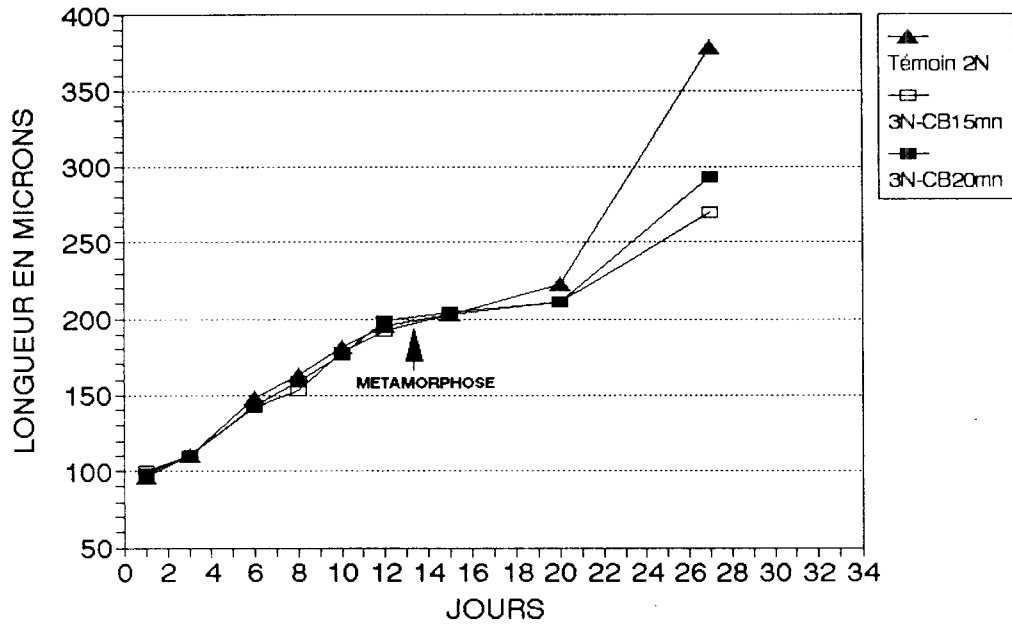
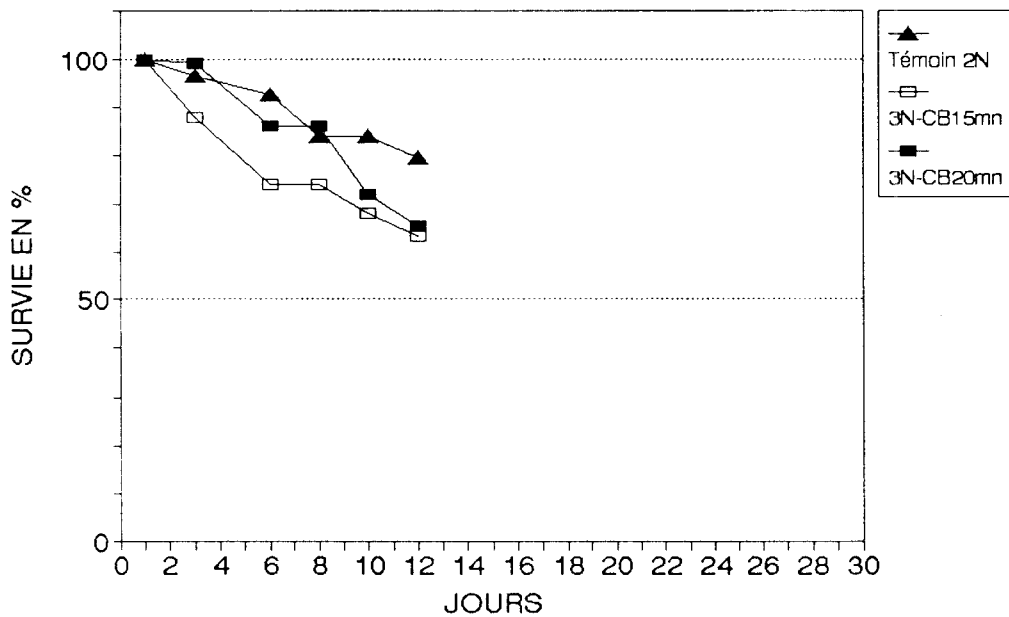


Fig.16: Elevages de Ruditapes decussatus
Mortalités larvaires comparées



L'origine de ces mortalités est pour l'instant inconnue, elle peut tout simplement être d'origine bactérienne, mais son développement unique dans les lots triploïdes peut faire penser à un dosage trop fort de la cytochalasine ou à une température trop élevée pendant le traitement ayant entraîné des déformations visibles de la coquille larvaire accompagnées peut être d'anomalies somatiques létales au moment de la métamorphose.

Ces travaux seront repris en 1991, en étudiant le développement embryonnaire à plusieurs températures et en testant différentes doses de cytochalasine B.

6 - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE CONTROLE DE LA PLOIDIE PAR IMAGERIE NUMERIQUE

Pour estimer rapidement les résultats d'un traitement d'induction et juger de son efficacité, seule l'étude caryologique était réalisable au laboratoire. Cette technique est fiable et peu coûteuse en matériel et produits mais elle présente de multiples inconvénients :

* Elle n'est vraiment aisée qu'à certaines périodes de la vie de l'animal (sur l'embryon de quelques heures ou sur le naissain de 1 à 3 cm), ce qui limite considérablement son champ d'application.

* Elle requiert beaucoup de temps de lecture au microscope limitant du même coup le nombre d'échantillons analysables.

* Elle engendre des biais dans l'estimation des pourcentages des polyploïdes puisqu'elle est basée sur la fréquence de cellules polyploïdes au sein d'une population de cellules émanant d'un certain nombre d'individus échantillonnés.

* Elle est réalisée sur l'embryon de 6 à 8 heures, alors que les taux de larves D normales à l'issue du traitement n'exèdent pas 10 à 20% dans certains cas.

* Elle ne permettrait que très difficilement le tri d'animaux adultes par biopsie dans le cas d'obtention de tétraploïdes par exemple.

Pour toutes ces raisons, le laboratoire s'est engagé dans la recherche d'une technique permettant un contrôle de la ploïdie à toute période de la vie de l'animal.

Cette recherche s'est opérée en plusieurs étapes :

* Dans un premier temps, nous avons testé des appareils de mesure de fluorescence. Ces systèmes, qui présentaient l'avantage de ne pas être trop onéreux, n'ont pas, malgré de multiples essais, répondu à notre attente.

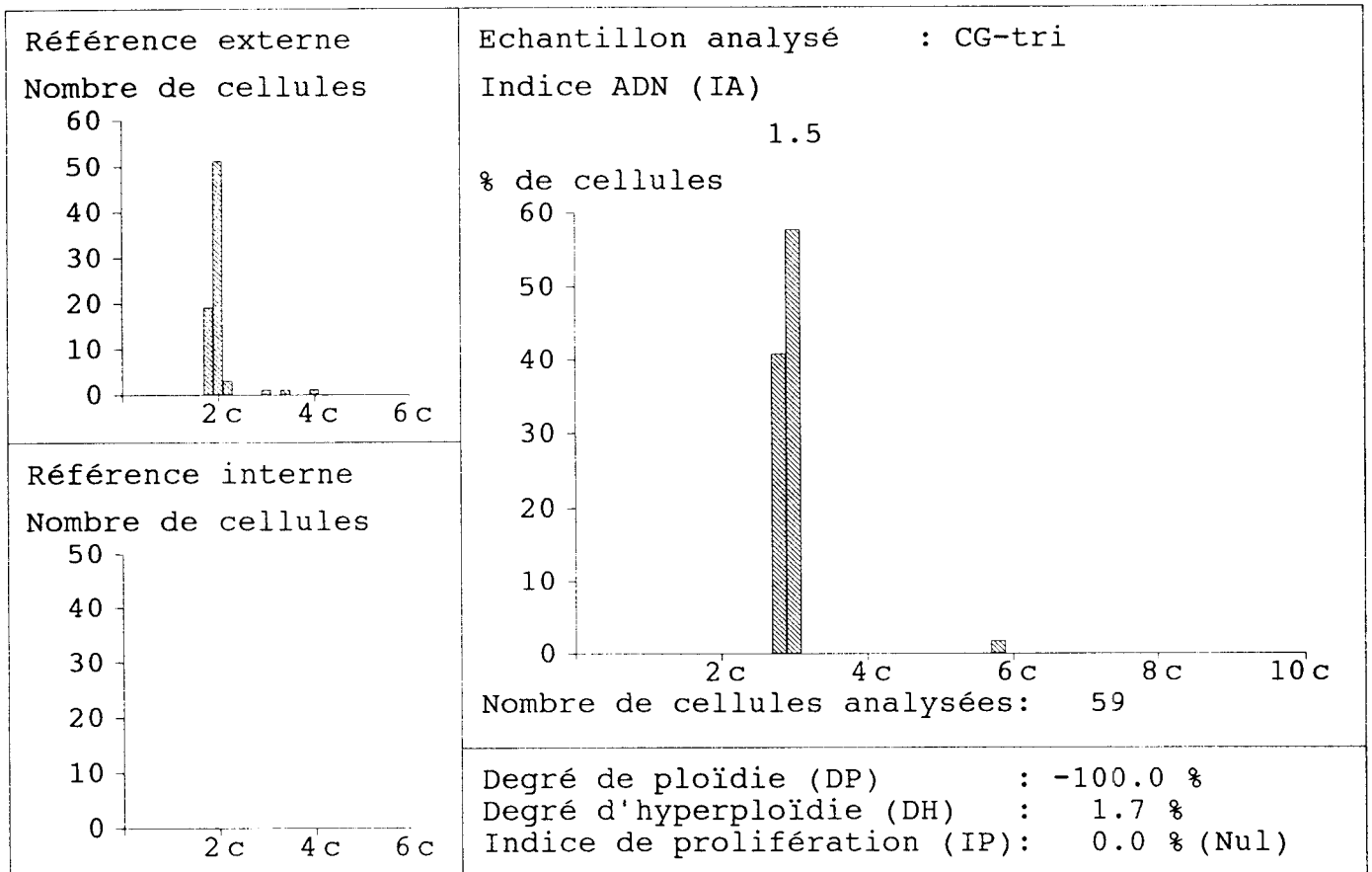
* Dans un deuxième temps, nous nous sommes rapprochés des fabricants d'analyseurs d'images proposant des logiciels de mesure de la ploïdie dans le milieu médical pour la cancérologie. Le principe repose sur la mesure du contenu d'ADN par densitométrie sur des cellules colorées au Feulgen.

* La troisième phase, la plus délicate, a été la mise au point des préparations histologiques. Des cellules de plusieurs tissus préparées selon différentes techniques ont

FIGURE 17

ANALYSE DE PLOIDIE

Le : 21/5/1991
 Référence de la lame : CG-tri
 Examen reçu le : 18/04/1991



été testées, seules les empreintes branchiales ont fourni des résultats fiables et reproductibles.

* La phase suivante avait pour but de vérifier la fiabilité de la méthode sur des animaux dont la ploïdie pouvait être contrôlée simultanément par caryologie. Cette vérification n'a pu être réalisée qu'en fin d'année quand les lots de gigas ont atteint 20 mm. La fiabilité de la technique a été démontrée, tous les résultats obtenus en analyse d'image étant en parfaite concordance avec ceux de l'analyse caryologique.

* Restait ensuite le choix du matériel. Les trois appareils testés des sociétés Becton-Dickinson, Biocom et TITN Alcatel fournissaient des résultats peu différents quant à la performance de l'analyse, notre choix s'est donc porté sur celui qui offrait les plus grandes fonctionnalités (exploitation graphique et analyse statistique intégrées) et une plus grande convivialité (environnement windows en particulier), le système Samba 2005 de TITN-Alcatel.

La technique mise au point qui permet dès à présent de contrôler la ploïdie sur tout animal supérieur à 2 mm à partir d'une référence externe provenant d'un témoin diploïde (Fig. 17) sera étendue au cours de l'année 1991 aux phases embryonnaire et larvaire. Ces travaux feront l'objet d'une communication à la 79ème réunion statutaire du CIEM (Conseil International pour l'Exploitation de la Mer) qui se déroulera à La Rochelle en septembre 1991.

7 - CONTROLE DES PERFORMANCES BIOLOGIQUES : MISE EN PLACE DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

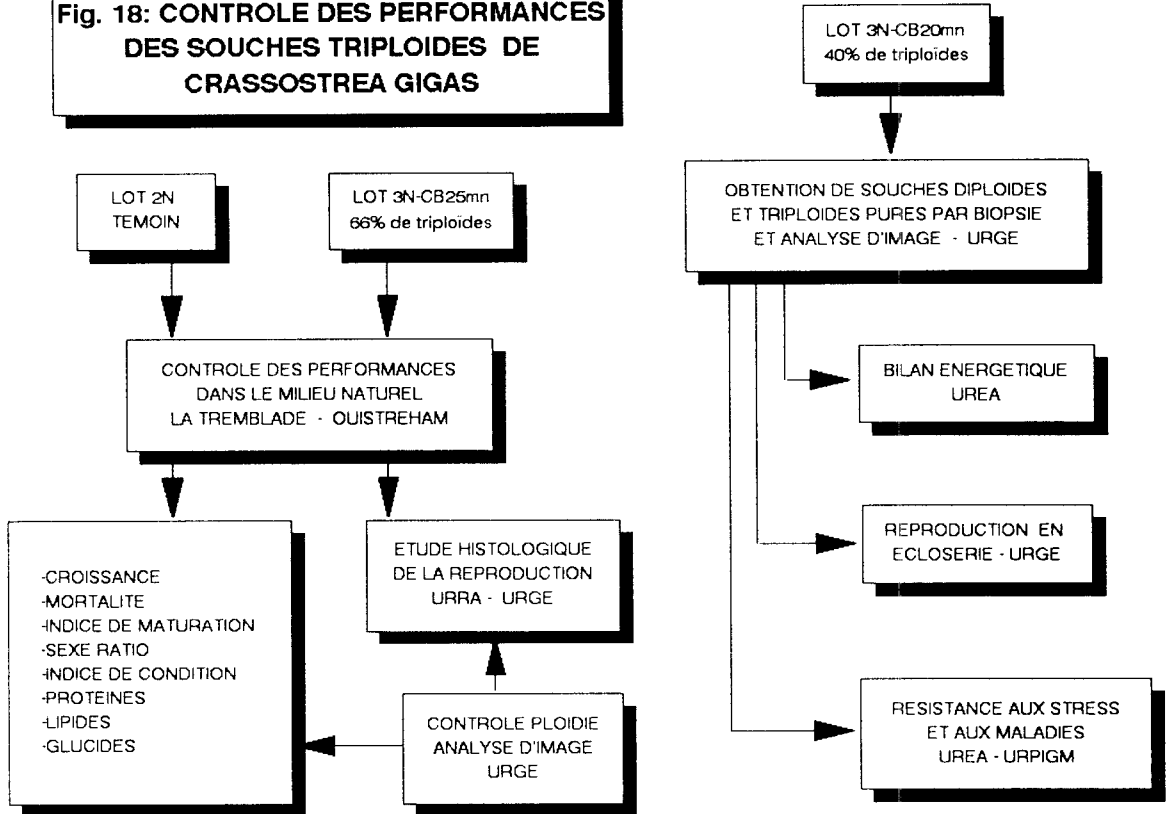
En fin d'année 1990, après vérification des taux de polyploïdes dans nos élevages de *Crassostrea gigas* (Fig. 5) un protocole de contrôle des performances biologiques dans le milieu naturel et en laboratoire a été établi (Fig. 18) mettant à contribution plusieurs Unités de Recherche d'IFREMER.

Pour le contrôle des performances dans le milieu naturel, deux sites ont été retenus : La Tremblade et Ouistreham. L'Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA) de La Tremblade et le laboratoire Régional d'Ouistreham assureront le suivi des élevages, le contrôle des différents paramètres de croissance, la mortalité, la maturation et les constituants biochimiques. Le contrôle de la ploïdie sur le site de La Tremblade sera réalisé à chaque échantillonnage par l'Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie (URGE). Toujours sur le même site une étude histologique de la reproduction sera effectuée par l'URRA associée à l'URGE pour le contrôle de la ploïdie. Tous ces travaux seront accomplis sur le lot témoin diploïde de la pontes 9021 et sur le lot 3N-CB25 dont le taux de triploïdes à l'issue de la phase de prégrossissement est le plus élevé : 66%.

A partir du deuxième lot 3N-CB20 qui ne comporte que 40% d'individus triploïdes, un tri par biopsie et analyse d'image sera opéré par l'URGE afin d'obtenir des lignées triploïdes et diploïdes pures. Ces animaux seront utilisés pour différents tests en laboratoire : bilan énergétique assuré par l'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (UREA), reproduction en écloserie (URGE), résistance aux stress et aux maladies (UREA et URPIGM).

Au début de l'année 1991, un programme similaire sera mis en place pour le suivi des lignées triploïdes de *Ruditapes philippinarum*.

**Fig. 18: CONTROLE DES PERFORMANCES
DES SOUCHES TRIPLOIDES DE
CRASSOSTREA GIGAS**



8 - INDUCTION DE LA TETRAPLOIDIE

Ce chapitre présente une synthèse des travaux effectués au laboratoire par différents stagiaires : A. Diter (1990) dans le cadre de sa thèse de 3ème cycle, C. Dufy (1988) dans le cadre de son DEA et C. Ledu (1989) pour l'obtention de son diplôme d'INTECHMER.

Ces essais d'induction de la tétraploïdie ont été réalisés sur deux espèces : *Crassostrea gigas* et *Ruditapes philippinarum*.

8-1 Tétraploïdie diparentale chez la palourde

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication Diter et Dufy (1990).

D'après l'heure d'apparition du premier clivage, les traitements à la cytochalasine B ont été testés de 0 à 60 mn après l'insémination, au cours de trois expériences successives.

La tétraploïdie a été induite en des proportions variant significativement en fonction du moment d'application ($F = 5,82$; $P < 0,02$) Fig. 19). Le test de Newman-Keuls révèle un optimum pour les traitements débutant de 0 à 10 mn après insémination. Bien que le plus haut pourcentage de tétraploïdes ait été induit par un traitement débutant à 9 mn (80%), la moyenne la plus élevée a été obtenue avec les traitements appliqués à 5 mn ($64,4 \pm 7,8\%$). Les rendements des traitements plus tardifs ne diffèrent pas significativement les uns des autres. Cependant, le moment 45 mn a produit le pourcentage moyen le plus élevé d'entre eux ($28,3 \pm 2,3\%$).

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. 20). 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%). 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 des ébauches de la coquille.

Deux lots traités, l'un précocément (10 mn après l'insémination), l'autre tardivement (45 mn) ont été maintenus en élevage. Ils ont produit respectivement 73,3% et 33,3% d'embryons tétraploïdes, le témoin, ne comportant pas de métaphases polyploïdes.

La croissance du lot témoin n'a pas été significativement différente de celle du lot traité

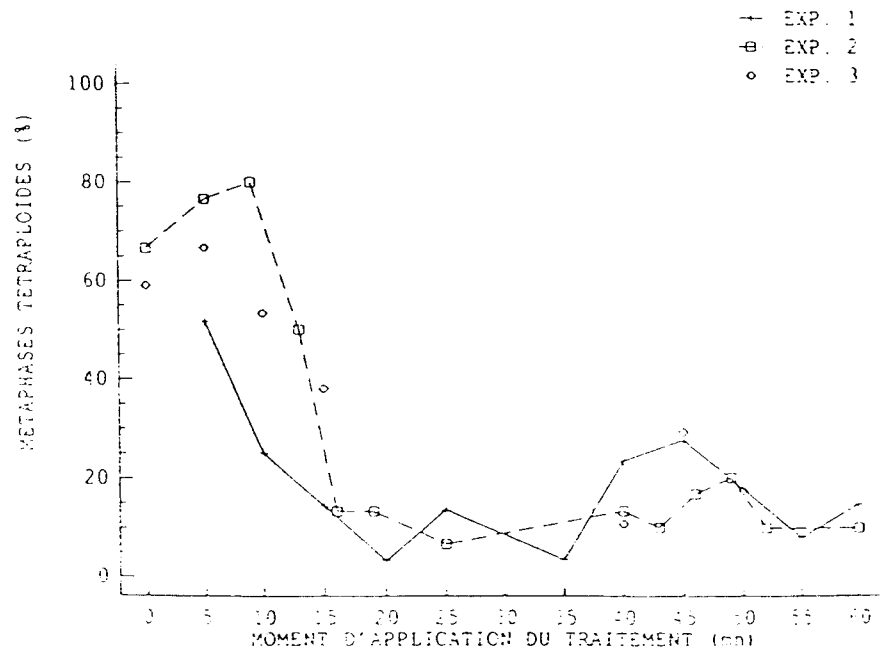


Figure 19 : Pourcentage d'embryons tétraploïdes, chez la palourde, en fonction du moment d'application du traitement (CB). Les résultats de 3 expériences de mise au point sont rapportés. (DITER 1990)

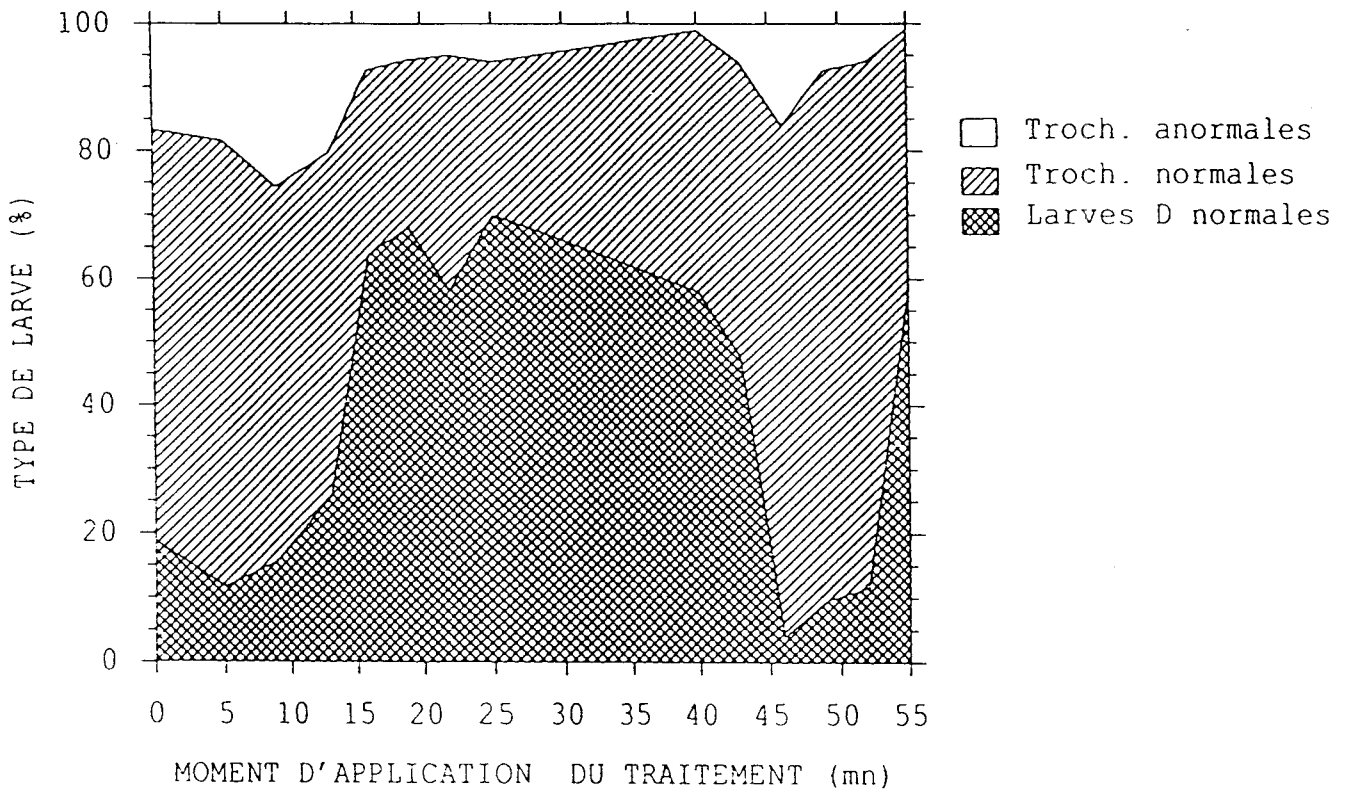


Figure 20 : Pourcentages de larves D normales et trochophores normales et anormales en fonction du moment d'application du traitement (CB). L'observation a été faite sur des larves de palourdes âgées de 26 heures. Le témoin était composé de 84 % de larves D et 16 % de larves trochophores normales. (DITER 1990)

précocement ($F=0,19$; $P >0,60$) ni celle du lot traité tardivement ($F=3,63$; $P >0,05$), entre le 3ème et le 11ème jour. Dans chacun des lots, la métamorphose a débuté au 13ème jour.

La survie moyenne des duplicats, du 1er au 13ème jour, a été de 0,9% dans le lot traité précocement et de 14% dans le lot traité tardivement (34% dans le lot témoin).

Aucun tétraploïde n'a été observé dans le naissain.

8.2 - Tétraploïdie diparentale chez l'huître creuse

Les premières expériences, utilisant des chocs de pressions de 8.000, 9.000 et 10.000 psi, ont été suivies de très fortes mortalités, supérieures à 95% à 24 h. Aucun polyploïde n'a pu être détecté parmi les rares embryons survivants des lots traités à 9.000 et 10.000 psi. Le plus fort pourcentage d'embryons tétraploïdes produit le choc de 8.000 psi (25%) a été obtenu pour le moment d'application 20 mn (Fig. 21). Ce même traitement a aussi induit 50% de triploïdes. Dans le lot traité à 30 mn, 30% de triploïdes ont été observés contre 10% dans le témoin.

Les chocs durant 3 mn à 9.800 psi ont été très peu efficaces. Seul le traitement appliqué 80 mn après la fécondation a produit quelques tétraploïdes (20%). Les traitements plus intenses, durant 5 et 7 mn, ont été plus efficaces. Le moment d'application optimal a été plus précoce (60 mn) et a fourni 30 à 40% de tétraploïdes pour les durées 5 et 7 mn respectivement. La survie de ces lots représentait à 24 h environ 5% de celle du témoin.

Des métaphases triploïdes ont été observées en assez forts pourcentages (36 à 44%) pour le temps 40 mn (9.800 psi - 7 mn) mais aussi pour les temps 60 mn (9.800 psi - 7 mn). Il a aussi été noté dans ces deux dernières expériences (9.800 psi - 5 et 7 mn) une production d'haploïdes (jusqu'à 28%) au temps 50 mn.

Plusieurs tentatives d'élevage de lots à fort pourcentage de tétraploïdes se sont soldées par des échecs, la mortalité étant totale après quelques jours.

8.3 - Gynogenèse chez l'huître

La gynogenèse haploïde a été recherchée en irradiant le sperme par des rayons ultraviolets. La restauration de la diploïdie et l'induction de la tétraploïdie ont ensuite été tentées en traitant les oeufs gynogénétiques avec la cytochalasine B.

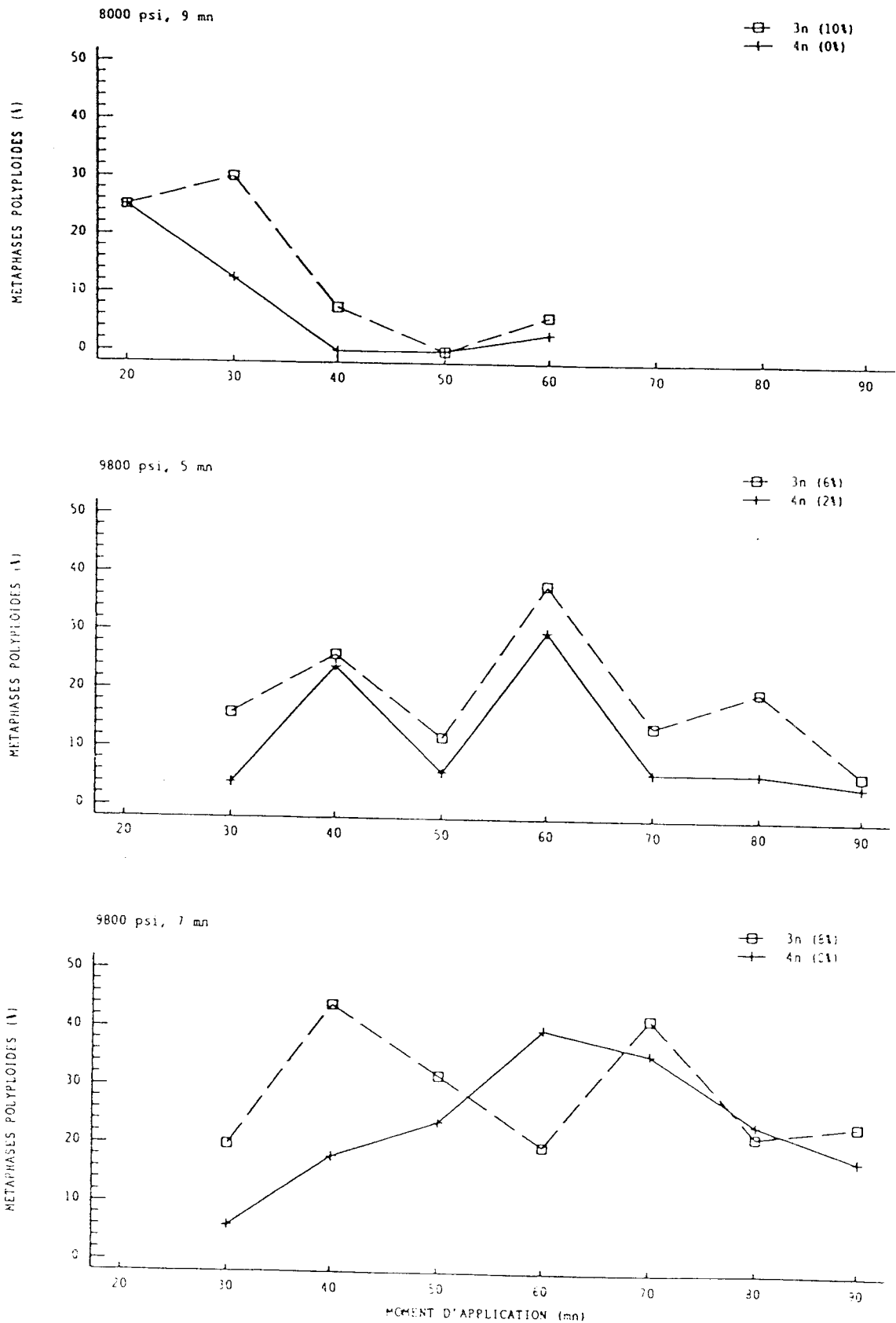


Figure 21 : Pourcentage d'embryons triploïdes et tétraploïdes produits par des chocs de pression de différentes intensités et appliqués à divers moments du développement, chez l'huître. Le taux de triploïdes et de tétraploïdes enregistré dans le témoin est indiqué entre parenthèses pour chaque expérience. (DITER 1990)

8.3.1 - Gynogenèse haploïde

Quelques expériences préliminaires ont permis de déterminer des conditions expérimentales favorables à la mise au point d'une technique fiable d'irradiation du sperme (Diter, 1990).

Dans ces conditions, la perte totale de motilité du sperme, lorsqu'il est de bonne qualité apparaît après environ 240 s d'irradiation. La moitié des spermatozoïdes commence à être affectée pour des durées d'exposition supérieures à 120 s, et il semble qu'une durée de 190 s détruit totalement le génome paternel.

8.3.2 - Restauration de la diploïdie

La restauration de la diploïdie a été tentée par la rétention d'un globule polaire. Le traitement utilisé débutant 25 mn après l'insémination, a induit de très forts pourcentages de diploïdes (82 et 92%) lorsqu'il était appliqué à des oeufs fécondés avec du sperme irradié (Fig. 22). Les témoins "sperme irradié" étaient composés de 92 à 94% d'haploïdes. Le même traitement, appliqué à des oeufs diploïdes (sperme normal) a produit des triploïdes (46 et 72%). Ainsi la diploïdie semble bien avoir été restaurée par rétention d'un globule polaire.

Les deux tentatives d'élevage n'ont pas abouti, mais ces échecs ne peuvent être attribués à la nature gynogénétique des produits puisque tous les lots en élevage, y compris les témoins diploïdes ont subi les mêmes mortalités.

8.3.3 - Induction de la tétraploïdie

D'après les résultats obtenus chez la palourde, la cytochalasine B semble susceptible d'induire la tétraploïdie lorsqu'elle est appliquée précocément à des oeufs diploïdes. Il est possible que l'origine du génome tétraploïde soit maternelle. Dans ce cas, l'application d'un traitement précoce sur des oeufs gynogénétiques doit également produire des tétraploïdes.

Des traitements traditionnels avec la cytochalasine B ont donc été appliqués 5, 10 et 15 mn après fécondation des oeufs par du sperme inactivé (190 s). Parallèlement, les mêmes traitements ont été appliqués sur des oeufs diploïdes témoins.

Des métaphases tétraploïdes ont été observées dans les lots gynogénétiques (Fig. 23). Dans l'expérience I, le traitement le plus efficace a débuté 10 mn après l'insémination. Il a produit, dans les deux expériences, respectivement 34% et 56% de métaphases tétraploïdes. Aucune métaphase de ploïdie supérieure n'a été observée dans les lots gynogénétiques.

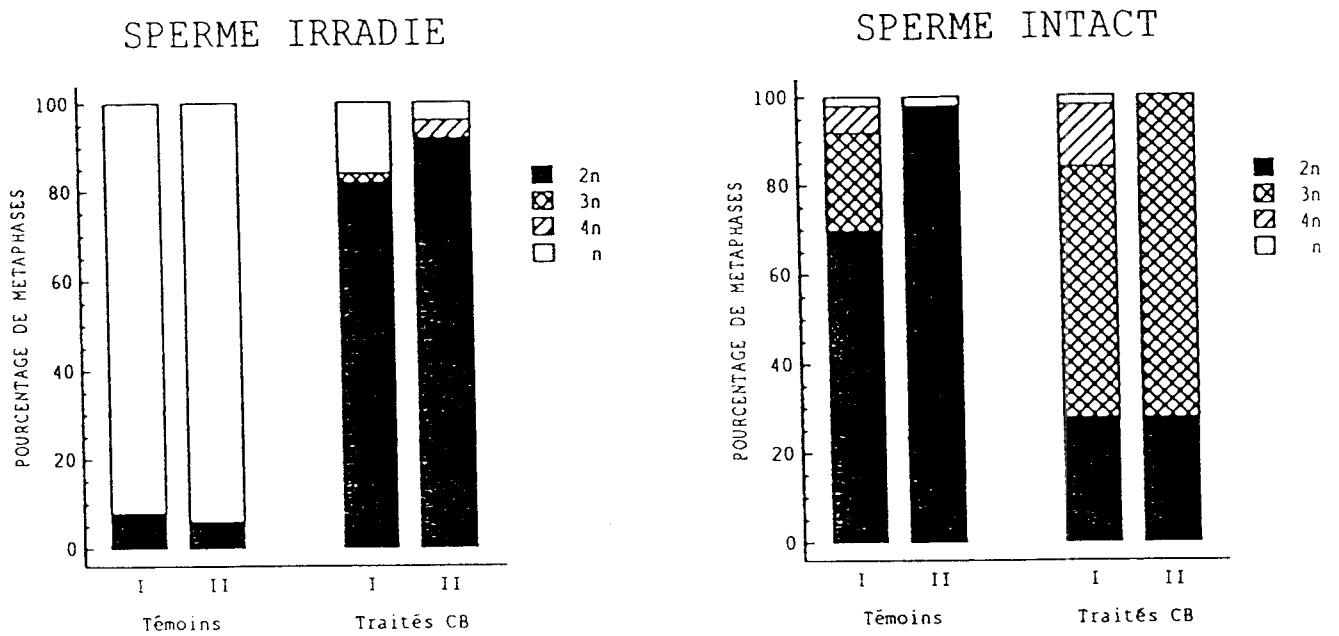


Figure 22 : Résultats caryologiques de deux expériences (I et II) de restauration de la diploïdie après gynogenèse, chez l'huître. Des oeufs fécondés avec du sperme irradié ou intact ont été traités avec la CB à 25 mn pour retenir un globule polaire. (DITER 1990)

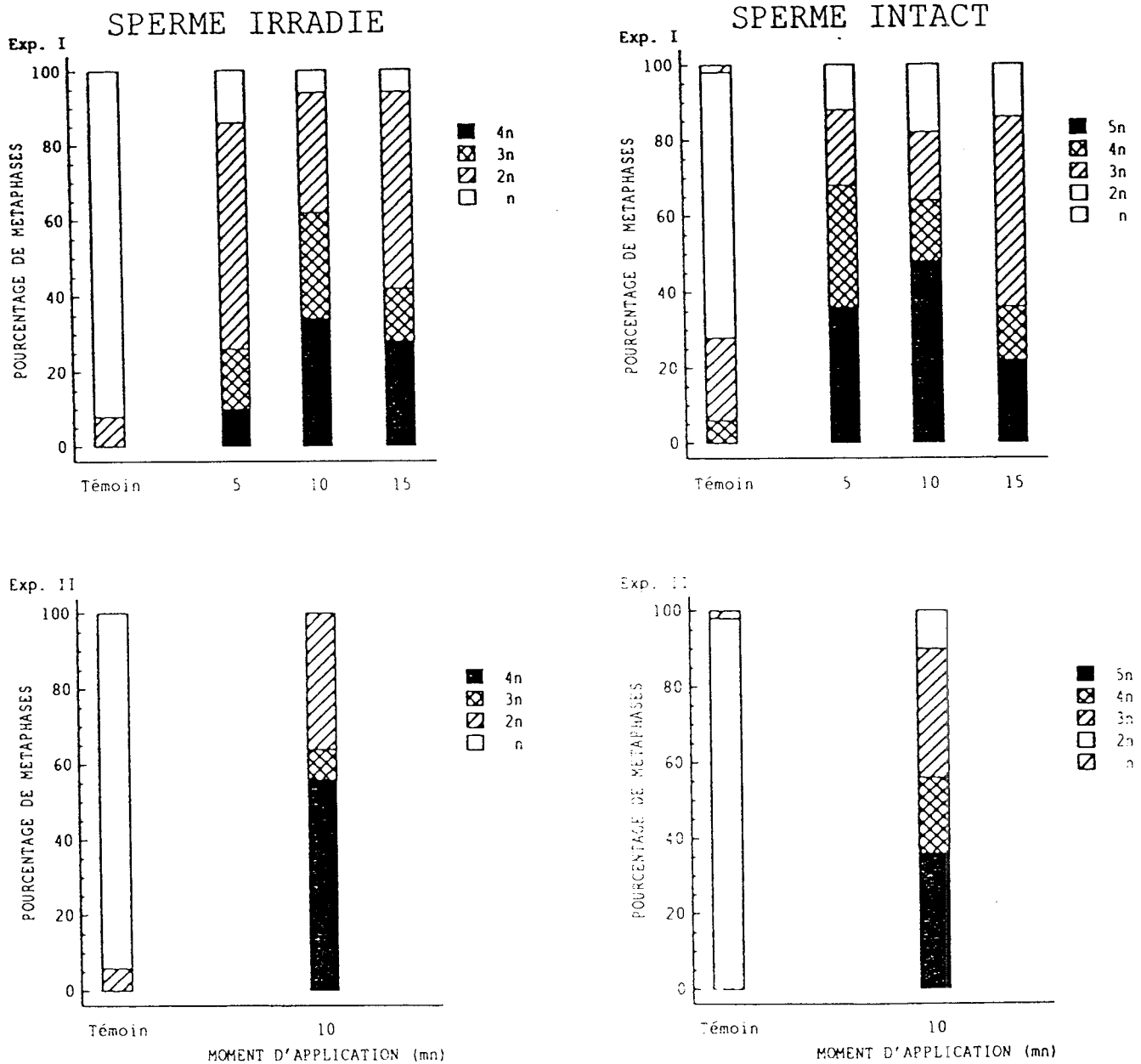


Figure 23 : Résultats caryologiques de deux expériences d'induction de la tétraploïdie dans des oeufs gynogénétiques, chez l'huître. Les oeufs fécondés avec du sperme irradié et ceux fécondés avec du sperme intact (témoin) ont été traités précocement avec la CB. Les pourcentages de métaphases polyploïdes, enregistrés lors de l'expérience I ont varié en fonction du moment d'application du traitement. L'expérience II a confirmé la ploïdie des produits obtenus. (DITER 1990)

Le même traitement débutant 10 mn après la fécondation s'est avéré le plus efficace pour l'induction de la pentaploïdie, lorsqu'il a été appliqué à des oeufs diploïdes (respectivement 46% et 36% pour les deux expériences).

On peut noter aussi la présence de métaphases triploïdes dans les lots gynogénétiques. Parallèlement, chez les oeufs diploïdes traités, ont été comptées des métaphases tétraploïdes.

Après les traitements avec la cytochalasine B, peu d'haploïdes ont subsisté parmi les larves gynogénétiques (6% à 14%). Appliqués 5 à 15 mn après l'insémination, ils ont produit de forts pourcentages de diploïdes, respectivement 60% et 52%. Chez les lots diploïdes traités, les taux d'embryons diploïdes résiduels ont été assez faibles aussi (12% à 18%). Le traitement débutant au temps 15 mn a fourni 50% de triploïdes. Par contre, celui débutant au temps 5 mn n'a produit que 20% de triploïdes.

La survie à 23 heures a été de 12%, 9% et 35% de celle du témoin, chez les lots diploïdes traités respectivement aux temps 5, 10 et 15 mn. Le taux de larves D était alors nul dans les lots 5 et 10 mn et s'élevait à 7% dans le lot 15 mn. Chez les gynogénétiques, la survie dans les lots 5, 10 et 15 mn a été respectivement de 0%, 1,5% et 4%. Le taux de larves D était de 0,8% dans le lot 10 mn et 1,7% dans le lot 15 mn.

Deux élevages larvaires ont été tentés, dans les mêmes conditions que pour les gynogénétiques diploïdes (mêmes pontes). Les échecs sont donc à mettre au compte des mêmes causes et semblent indépendants du type d'individus élevés.

9 - DISCUSSION - CONCLUSION

Au cours de l'année 1990, la reproductibilité des méthodes de triploïdisation élaborées en 1989 a été vérifiée, les techniques améliorées et appliquées à de grandes quantités d'oeufs de deux espèces : *C. gigas* et *R. philippinarum*.

Les difficultés rencontrées dans la production des larves de *C. gigas* ne permettent pas de tirer de conclusions quant aux taux de survie après traitement sur cette espèce, ni sur l'évolution du taux de triploïdes entre le stade embryonnaire et le naissain. Ces paramètres seront à vérifier dès que les problèmes de blocage de la croissance larvaire seront résolus.

Le protocole d'induction de la triploïdie par la cytochalasine B semble parfaitement optimisé pour la palourde du Pacifique (*R. philippinarum*). Les mortalités différentielles constatées par Dufy et Diter (1990) dans les expériences préliminaires, n'ont absolument pas été retrouvées dans les élevages de cette année, ce qui lève le doute qui subsistait dans le rapport de l'an passé. Ces résultats sont conformes aux observations d'Allen (1987) sur les huîtres.

Un des résultats les plus importants obtenu au cours de l'année 1990, a été la mise au point de la technique de contrôle de la ploïdie par imagerie numérique. Avec un tel système de mesure, il sera rapidement possible, après extension de la technique aux larves, de suivre l'évolution des taux de polyploïdes dans les élevages. Ce sera un atout majeur pour les recherches sur les tétraploïdes qui souffraient jusqu'à présent d'absence de moyen de contrôle pour suivre l'évolution des tétraploïdes entre la phase embryonnaire et le naissain de 1 à 2 cm. Autre avantage de ce système de mesure, c'est qu'il va permettre de trier assez facilement des individus adultes en prélevant par biopsie un morceau de branchie, manipulation qui sera indispensable en cas d'obtention de faible taux d'individus tétraploïdes viables.

De nombreux objectifs sont au programme de l'année 1991 :

- Optimisation de la technique d'induction de la triploïdie chez la palourde européenne *R. decussatus*.
- Essais d'obtention de populations significatives di et triploïdes d'huîtres plates et de palourdes européennes.
- Mise en place et organisation du contrôle des performances des populations triploïdes d'huître creuse et de palourde du Pacifique dans le milieu naturel et en laboratoire.

- Extension de la technique de contrôle de la ploïdie par analyse d'image aux phases embryonnaire et larvaire.

- Poursuite des recherches sur l'obtention de tétraploïdes viables.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonymes, 1990.** Rapports internes IFREMER - RIDRV - 90.29 - RA/LA TREMBLADE
- 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.
- Allen, S.K., 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., and Downing, S.L., 1990.** Performance of triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* : Gametogenesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Vol. 47, 1990 : 1213-1222.
- 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.
- Chevassus, B., 1987.** Caractéristiques et performances des lignées uniparentales et de 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 de Paris VI, 60p.
- Diter, A. and Dufy, C., 1990.** Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II - Chemical induction of tetraploid embryos. *Aquat. Liv. Resour.*, 3 : 107-112.
- Diter, A., 1990.** Reproduction uniparentale et polyploïdie induites chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et chez les bivalves *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* et *Clamys varia*. Thèse de doctorat de l'Université de Paris 6.
- 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
- Dufy, C. and Diter, A., 1990.** Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. I - Chemical induction and larval performances of triploids. *Aquat. Liv. Resour.*, 3 : 55-60.
- Dufy, C., 1988.** La Polyploïdie chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* : Induction et influence sur les performances larvaires. Mémoire de DEA, Univ. Aix - Marseille II. 40p.

Heral, M. et Deslous-Paoli J.M., 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesure microcalorimétriques et par dosages biochimiques *Oceanol. Acta*, 1983, 6,2 : 193-199.

Ledu. C., 1989. Applications de méthodes cytogénétiques aux mollusques bivalves. Mémoire de DTSM Intechmer. 30p.

Lucas, D., 1971. Les gamètes des mollusques. *Haliotis*, vol 1, N° 2 : 185-214.

Stanley, J.G., Allen, S.K., Jr. and Hidu, H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cylochalasin 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.