

AVANCÉES RÉCENTES SUR LA REPRODUCTION DES HUÎTRES

Gérard A.

IFREMER. Laboratoire de Génétique et Pathologie, 17390 La Tremblade - FRANCE

Introduction

Historiquement les recherches sur la reproduction des mollusques à l'IFREMER étaient destinées à l'amélioration des productions en masse en vue de soutenir des activités nouvelles (palourde japonaise par exemple) ou pour pallier à des reproductions naturelles insuffisantes (Ormeau, Coquille St Jacques). De nos jours, la priorité est donnée à la préservation des ressources naturelles et à l'optimisation de la conchyliculture en soutien aux activités fortement représentées par une profession, en particulier l'ostréiculture.

Les recherches engagées dans le domaine de la génétique des huîtres depuis une dizaine d'année ont fait ressortir les limites de nos connaissances en matière de contrôle de la reproduction et la grande sensibilité des élevages de mollusques vis à vis des multiples agressions du milieu extérieur. Pour les besoins des écloséries professionnelles, les pontes en masse de géniteurs sont généralement suffisantes pour assurer la production de naissain. Pour les généticiens, le niveau de finesse dans la maîtrise des processus de reproduction n'est pas le même car bien souvent les croisements doivent se faire sur des individus préalablement identifiés.

Pour essayer de résoudre certaines contraintes liées au développement des programmes de sélection génétique, à savoir la protection des souches vis à vis des agressions du milieu extérieur et le test des performances dans des conditions environnementales rigoureusement identiques, des essais de production d'huîtres en milieu totalement contrôlé sur eau salée souterraine traitée ont été réalisés. Les premiers résultats sont concluants et permettent d'envisager leur application partielle dans les écloséries professionnelles au moins pour la phase larvaire.

Données biologiques

Un groupe de travail sur la "physiologie de la reproduction des mollusques", a été organisé à Nantes en 1995 pour répondre à un besoin de synthèse des travaux effectués dans ce domaine et exprimer les urgences en matière de recherche(1). Le présent document reprend en partie les données présentées lors de ce colloque en se limitant volontairement aux aspects concernant la sexualité, le contrôle de la maturation, l'induction de la ponte, la fécondation et le développement embryonnaire.

Sexualité et déterminisme du sexe

Les bivalves n'ont pas de chromosomes sexuels, ils possèdent potentiellement les deux sexes. Cette bipotentialité se traduit par l'existence d'un hermaphrodisme juvénile, certaines espèces s'orientent ensuite vers un gonochorisme (animaux à sexes séparés : moules, palourdes, coques...), et d'autres, comme les huîtres, présentent diverses formes d'hermaphrodisme (2).

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Ostréidé ovipare) présente un **hermaphrodisme asynchrone**, correspondant à des maturations déphasées des lignées mâle et femelle, et **une sexualité alternative** (gonochorisme apparent masquant un hermaphrodisme alternatif) entraînant un possible changement de sexe chaque année. L'huître plate *Ostrea edulis* (Ostréidé larvipare) présente également un **hermaphrodisme asynchrone** mais avec une **sexualité consécutive rythmique**, plusieurs inversions sexuelles peuvent se dérouler au cours d'une même saison de reproduction (3). La tendance à la protandrie (orientation vers le sexe mâle) est de règle chez les deux espèces au début de leur activité sexuelle.

Les mécanismes physiologiques contrôlant les changements de sexe et les facteurs exogènes pouvant les déclencher (température, nutrition...) sont encore mal connus chez les huîtres et il est difficile de dire si les principaux facteurs sont d'ordre génétique ou biologique (état des réserves, âge des individus...) ou externes (température, nourriture, photopériode...). Les premiers résultats des études engagées depuis 1995 au Centre IFREMER de Brest et à l'Université de

Bretagne Occidentale, montrent qu'il est possible dans certaines conditions d'orienter le sexe des huîtres creuses en agissant sur les facteurs exogènes (température et nourriture). Une température haute de maturation (18 à 21°C) augmenterait la proportion d'huîtres de sexe mâle, tandis que de basses températures (10 à 14°C) inverseraient cette tendance mais favoriseraient l'apparition d'individus hermaphrodites. En agissant sur le facteur nutrition, il semblerait que l'on puisse orienter significativement les huîtres vers le sexe femelle en jouant sur l'abondance du phytoplancton. Enfin, pour étudier la fréquence des inversions sexuelles chez les huîtres creuses dans le milieu naturel, une expérience de suivi de la maturation d'huîtres marquées individuellement est en cours.

En l'absence de protocoles précis permettant de contrôler l'orientation du sexe, diverses stratégies sont actuellement adoptées en fonction des contraintes des expérimentations. Quand un plan de croisement nécessite une maîtrise de la reproduction à l'échelle d'une population, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* le sexe des huîtres est déterminé par observation des gamètes au microscope après scarification de la gonade ("stripping"). Chez l'huître plate *Ostrea edulis*, où un sexage de ce type n'est pas possible (présence simultanée des gamètes mâles et femelles dans la gonade), les pontes sont réalisées en masse dans le bac de maturation. Toutefois la mise au point récente de marqueurs génétiques, permet désormais de connaître avec précision les huîtres qui ont effectivement contribué au croisement en comparant les empreintes génétiques des parents et des enfants. Quand un plan de croisement nécessite une maîtrise de la reproduction à l'échelle de l'individu, le sexage des huîtres creuses peut être réalisé au cours de la maturation, par biopsie de la gonade après anesthésie des huîtres au chlorure de magnésium. Chez l'huître plate, pour contourner les difficultés liées à l'espèce (larvipare, sexage difficile car les lignées mâles et femelles coexistent généralement à l'intérieur de la gonade, induction individuelle de la ponte non maîtrisée), les huîtres sont placées par couple dans de petits aquariums suivant le plan de croisement voulu, en espérant obtenir le maximum de couples mâle-femelle au moment de l'émission des gamètes.

Conditionnement des reproducteurs

Parmi les nombreux facteurs externes ou internes, reconnus comme pouvant influencer le déroulement de la gamétogenèse, il faut distinguer les facteurs **déclenchant** et les facteurs de **contrôle** de la gamétogenèse.

Les facteurs déclenchant la gamétogenèse

L'huître plate *Ostrea edulis* présente une réelle phase de repos sexuel entre le mois de novembre et février. Le facteur déclenchant la reprise de la gamétogenèse semble apparemment indépendant du facteur température, des études doivent encore être menées pour savoir si la photopériode ne joue pas un rôle comme chez la coquille St Jacques (4) L'huître creuse *Crassostrea gigas*, ne présente pas de véritable phase de repos sexuel, la gamétogenèse se déroule à un rythme très ralenti pendant la période hivernal, ce qui permet en écloserie de la réactiver par conditionnement thermique (5). Dans le bassin de Marennes-Oléron, Héral (6) a montré une corrélation négative entre les températures automnales et la reprise de l'activité génitale, et, une quasi-indépendance vis à vis des températures hivernales. Le début de la phase active de la gamétogenèse coïncide généralement avec les plus basses températures hivernales.

Malgré l'absence observée de phase de repos sexuel chez l'huître creuse, les techniques de conditionnement mises en œuvre dans les écloséries, ne permettent pas actuellement d'obtenir de bonnes maturations pendant la période automnale. Des travaux sont actuellement menés au Centre IFREMER de Brest, pour tenter d'expliquer ce point de blocage et lever cette inhibition.

Les facteurs contrôlant la gamétogenèse

Parmi les facteurs qui contrôlent le déroulement de la gamétogenèse, on

distingue habituellement, les **facteurs externes** (influence de l'environnement) et les **facteurs intrinsèques**, bien que ces facteurs soient étroitement liés.

Les facteurs intrinsèques : parmi les facteurs intrinsèques il faut citer d'une part, les facteurs neuroendocriniens dont les modalités d'action sont encore trop mal connues pour espérer une application à court terme au sein des écloseries, et, d'autre part l'état général de l'individu : l'âge, la taille, le niveau des réserves glucidiques et lipidiques. Ce dernier point est important car l'énergie accumulée pendant l'hiver chez les huîtres soutient l'effort de reproduction (7), des travaux sont actuellement menés au Centre IFREMER de Brest pour déterminer dans quel état de réserve doivent se trouver les géniteurs pour mener à bien leur conditionnement en écloserie.

Les facteurs externes les plus couramment décrits dans la littérature sont la température, la nourriture, la salinité et la photopériode. La **température** semble le paramètre le plus important, elle a fait l'objet de nombreuses études dans le milieu naturel et dans les écloseries. Dans le bassin de Marennes-Oléron, il a été montré qu'il existait chez *Crassostrea gigas*, une corrélation positive entre les températures printanières et la cinétique de la gamétogenèse (6). Le conditionnement des géniteurs est, selon les écloseries, effectué entre 18 et 25°C. Sa durée est d'autant plus courte que les géniteurs utilisés sont proches de la maturité sexuelle. A ces considérations purement zootechniques, il ne faut pas oublier les relations entre température et problèmes pathologiques. Les données récentes concernant le facteur température dans la transmission de l'herpès virus (8), militent plutôt en faveur d'un abaissement de la température de maturation.

La **nutrition** exerce un rôle considérable dans la reproduction des mollusques. Pour les huîtres, ce rôle est tout aussi important pendant la phase de stockage hivernal de réserves énergétiques qui sont mobilisées au printemps pour la fabrication des gamètes, que pendant tout le déroulement de la gamétogenèse (9). La nutrition conditionne la fécondité et le recrutement. En écloserie, seul un régime à base d'algues phytoplanctoniques est actuellement fourni, pourtant dans le milieu naturel ces microalgues ne représentent qu'une part des éléments particuliers et nous savons par ailleurs que les éléments dissous et les bactéries sont également une source essentielle de nourriture (6). De nombreux travaux ont été développés sur la coquille St Jacques, les différentes méthodologies mises au point sont désormais utilisées pour apprécier les besoins quantitatifs et qualitatifs des huîtres.

L'action de la **salinité** sur la gamétogenèse est toujours discutée, il semble toutefois admis, que pour les bivalves vivant dans une large gamme de salinités, la reproduction se déroule normalement à l'intérieur des limites létales spécifiques (2). Dans le milieu naturel, sur *Crassostrea gigas*, Héral (6) a montré qu'une forte corrélation existait entre température et salinité pour prédire les bonnes reproductions. Chez *Ostrea edulis*, des problèmes de reprise de la gamétogenèse ont été observés pour des salinités proche de 20‰.

La **photopériode** est un paramètre qui n'a pas fait l'objet d'étude chez les huîtres, mais son rôle accélérateur de la gamétogenèse chez la coquille St Jacques (4) incite au développement d'études dans ce sens chez les huîtres.

Induction de la ponte

Le procédé le plus classiquement utilisé en écloserie est le choc thermique parfois associé à une addition de produits sexuels d'animaux sacrifiés. Cette technique de stimulation donne des résultats variables tant au niveau de la qualité des gamètes que du synchronisme de la ponte. Les recherches menées ces dernières années sur l'induction de la triploïdie ont conduit le développement d'une nouvelle technique d'obtention des gamètes chez *Crassostrea gigas* basée sur la scarification de la gonade ("stripping"). Cette technique présente l'avantage de supprimer toute fécondation incontrôlée, d'obtenir des gamètes à un même stade de développement, de pouvoir contrôler leur qualité au microscope et de programmer précisément le début d'un croisement. Ses

inconvénients majeurs résident dans le sacrifice des géniteurs et dans le manque de contrôle de l'état de maturité des gamètes.

Les huîtres creuses sont les rares bivalves dont les produits génitaux sont fonctionnels après un tel traitement, les croissances et survies larvaires ne semblent pas affectées. Chez l'huître plate, cette technique n'étant pas utilisable, le procédé le plus communément adopté consiste à placer des géniteurs dans un bac qui sert à la fois pour la maturation, la ponte et l'émission des larves. Ces dernières sont recueillies dans un tamis au fur et à mesure de leur émission, il n'y a aucun contrôle du moment de la ponte.

L'utilisation de neuromédiateurs a fait l'objet de quelques essais chez l'huître creuse, la sérotonine s'est avérée être un excellent régulateur de la spermiation comme chez la coquille St Jacques (1). Cette technique d'induction peut présenter un intérêt dans les programmes de génétique où le sacrifice des reproducteurs n'est pas souhaitable, son application est à déconseiller dans les éclosiers de production.

Fécondation et développement embryonnaire.

La fécondation est externe chez les mollusques, elle se déroule dans le milieu extérieur pour les huîtres creuses et dans la cavité palléale pour l'huître plate. Le contrôle quantitatif et qualitatif de la fécondation s'effectue par l'analyse des taux de fécondation et par l'étude du développement embryonnaire précoce en microscopie à épifluorescence.

Afin d'améliorer le synchronisme embryonnaire dans les expériences d'induction de la polyploïdie chez l'huître creuse, l'étude du développement embryonnaire précoce en microscopie à épifluorescence a été d'une grande utilité (10). Grâce à cette technique, la chronologie entre la fécondation et le stade 4 cellules est désormais très bien connue et un ratio optimal de spermatozoïdes par ovocyte (100 spermatozoïdes/ovule) tenant compte d'un taux de polyspermie limité à 10% a été déterminé. Elle a aussi permis de standardiser le temps entre le prélèvement des ovocytes et la fécondation.

En raison du mode larvipare de reproduction de l'huître plate, nos connaissances en matière de qualité des gamètes et de fécondation sont plus limitées que pour l'huître creuse. Toutefois, les expériences d'élevage *in vitro* menées dans le cadre de l'induction de la triploïdie ont permis d'acquérir de nombreuses données spécifiques pour cette huître, en particulier sur son développement embryonnaire précoce très lent.

La qualité des gamètes est souvent à l'origine d'une forte variabilité des croissances et survies larvaires, surtout chez l'huître creuse. Des travaux ont été réalisés sur la qualité du sperme (1), mais très peu de données sont disponibles sur la qualité des ovocytes en relation avec les performances larvaires. Des expériences récentes montrent que dans des croisements biparentaux, une médiocre qualité des gamètes mâles peut être gommée par le ratio de spermatozoïdes par ovocytes au moment de la fécondation (de 100 à 500). Par contre les analyses génétiques réalisées grâce aux marqueurs moléculaires sur des élevages issus d'un mélange de plusieurs reproducteurs, montrent que le succès de l'élevage repose souvent sur la descendance de quelques individus. Des études sont en cours à La Tremblade dans le cadre du projet européen GENEPHYS pour déterminer à quel moment de la vie embryonnaire ou larvaire, ce tri sélectif s'effectue. Cette supériorité de certains reproducteurs peut avoir une origine génétique ou physiologique (qualité des gamètes).

Données zootechniques

L'utilisation de l'eau salée souterraine à des fins aquacoles n'est pas nouvelle, son emploi en tant que vecteur thermique est connu depuis les années 80 dans le domaine piscicole. En conchyliculture, elle est largement utilisée pour la production de phytoplancton (Bouin, Marennes-Oléron).

Les caractéristiques des eaux salées souterraines varient d'un site à l'autre, elles ont en général une température stable tout au long de l'année mais variable selon la profondeur (de 13 à 22°C), il en est de même pour la salinité (de 5‰ à 36‰). Leurs pH sont le plus souvent proche de 7, elles sont limpides et stériles et mais elles ne comportent que très peu d'oxygène dissous et sont généralement riches en gaz carbonique, ammoniacal, fer et manganèse. Ces derniers éléments font qu'elles ne peuvent être utilisées à l'état brut pour l'élevage des poissons ou des mollusques. Des pilotes de traitement biologique de ces eaux salées ont été installés récemment à Bouin et La Tremblade en se basant sur les dispositifs mis au point à la station Aqualive de Noirmoutiers (11). Ceux-ci permettent une désaturation de l'eau en gaz carbonique, son enrichissement en oxygène, sa déferrisation et démanganisation, et, une transformation de l'azote ammoniacal en nitrates.

Les premiers essais menés à Bouin et à La Tremblade montrent qu'il est possible de réaliser des élevages larvaires d'huître creuse entièrement sur eau salée souterraine traitée ainsi que du prégrossissement, mais en petite quantité. Ces résultats prometteurs permettent d'envisager l'élevage de souches génétiques en s'affranchissant complètement des variations de qualité du milieu océanique, et, le possible transfert de cette technologie aux éclosiers de production, pour leurs élevages larvaires.

1. Devauchelle N., Barret J. et Salaun G. 1997. La reproduction naturelle et contrôlée des Bivalves cultivés en France. Rapport du groupe de travail du 14 et 15 novembre 1995 à Nantes. IFREMER - DRV/RA/RST/97-11 Brest.
2. Lubet P., 1991. Reproduction des mollusques. In : Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture - G. Barnabé Coordonateur, Lavoisier (Tec. Doc.) Ed., Paris : 166-210.
3. Marteil L., 1976. La conchyliculture Française. (2ème partie). Biologie de l'huître et de la moule. Rev. Trav. Inst. Pêches Mar., 40 (2). P.149-346.
4. Devauchelle N. et C. Mingant, 1991. Review of reproductive physiology of scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. Aquat. Living Resour., 4, 41-51.
5. Lubet P., 1991. Reproduction des mollusques. In : Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture - G. Barnabé Coordonateur, Lavoisier (Tec. Doc.) Ed., Paris : 166-210.
6. Héral M., 1989. L'ostréiculture traditionnelle. In : Aquaculture - G. Barnabé coordonateur, Lavoisier (Tec. Doc.) Ed., Paris : 348-397.
7. Deslous-Paoli J.M. et M. Héral, 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. Aquat. Liv. Resour., 1, 239-249.
8. Le Deuff R.M., T. Renault et A. Gérard et Y. Naciri, (1995). Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms, 24 : 149-157.
9. Deslous-Paoli J.M., M. Héral, J.P. Berthome, D. Razet et J. Garnier, 1982. Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thunberg dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. Rev.Trav. Inst. Pêches marit., 45, 319-327.
10. Gérard A., Naciri Y., Peignon J.-M., Ledu C. & Phélipot P. (1994). Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture and Fisheries Management, 25, 7, 709-720.
11. Hussenot J. (1985). Les nappes salées souterraines des marais de l'Atlantique et leurs utilisations aquacoles. Colloque aquaculture en milieu de marais. 7-8 novembre 1985 – Noirmoutiers.