



Bilan d'activité
de l'Unité de Cytogénétique des Crustacés
de sa création à 1996

A. Diter



Centre Océanologique du Pacifique

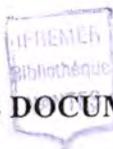
B.P. 7004 TARAVALO - TAHITI - Polynésie Française
Tél. 57.12.74 - Télécopie : (689) 57.24.77

758.1



Bilan d'activité
de l'Unité de Cytogénétique des Crustacés
de sa création à 1996

A. Diter



FICHE DOCUMENTAIRE

Type de rapport : Bilan d'Activité	
Numéro d'identification du rapport : <u>DRV/AQ/TAH 97.30</u> Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> Validé par : Adresse électronique : - chemin UNIX : - adresse WWW :	date de publication Juillet 1997 nombre de pages : 28 bibliographie : Oui illustration(s) : Non langue du rapport Français
Titre et sous-titre du rapport : Bilan d'activité de l'Unité Cytogénétique des crustacés de sa création à 1996.	
Titre traduit :	
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Alain DITER	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER/DRV/RA/COP
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse	
Titre du contrat :	n° de contrat Ifremer
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
Responsable scientifique :	
Cadre de la recherche : Programme :	Convention :
Projet :	Autres (préciser) :
Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	

FICHE DOCUMENTAIRE

Résumé :

Le rapport fait le point des différentes actions de recherche menées par l'Unité Cytogénétique du COP entre 1990 et 1996 :

- crevettes polyploïdes ;
- population monosexue femelle ;
- mécanismes de reproduction ;
- marqueurs hypervariables ;
- cryoconservation.

Les publications, rapports et mémoires sont listés.

Abstract :

Mots-clés : Crevettes, pénéides, cytogénétique, polyploïdes, cryoconservation

Keywords :

Commentaire :

Sommaire

1. Création de l'unité et définition des programmes	3
2. Le programme de production de crevettes polyploïdes	4
2.1. Choix des techniques	5
2.2. Mise au point d'un choc chaud visant à induire la tétraploïdie	6
2.3. L'influence de l'aliment sur le traitement de polyploïdisation	7
2.4. L'apport de la microscopie confocale à balayage laser	7
2.5. Résultat annexe	10
3. Le programme population monosex femelle de crevette	11
3.1. Étude de la croissance en populations monosexes	11
3.2. Essais d'inversion du sexe par opération chirurgicale	12
3.3. Analyse du caryotype	12
3.4. Autres pistes pour l'étude du déterminisme du sexe	14
4. Le programme d'étude des mécanismes de reproduction des crevettes	15
5. Le programme de mise au point de marqueurs hypervariables chez les crevettes	16
6. Les actions de cryoconservation de microalgues et de gamètes et d'embryons animaux	17
6.1. Le sperme de crevette	17
6.2. Les embryons de crevette	18
6.3. Les microalgues	18
6.4. Le sperme de loup tropical	19
7. Conclusion et perspectives	19
8. Les moyens en personnel et en matériel	21
8.1. Le personnel	21
8.2. Le matériel expérimental	22
9. Documents produits par l'unité	22
9.1. Publications et communications	22
9.2. Mémoires scolaires	23
9.3. Rapports internes	24
10. Références (extérieures à l'unité)	24
11. Annexe	25

1. Création de l'unité et définition des programmes

En 1989, le COP a traversé une période de remise en question de ses objectifs. Cette crise, vécue par le département Recherche Aquacole dans son ensemble, a été particulièrement aiguë au COP du fait de sa vocation presque exclusivement zootechnique. En effet, l'ambition de la Direction Générale d'alors était de faire évoluer la recherche vers des disciplines plus en amont de l'aquaculture. Cette orientation plus fondamentaliste de la recherche aquacole devait nécessairement faire appel à des techniques de laboratoire nouvelles pour l'Institut. La politique de la nouvelle direction du personnel, venant en accompagnement de celle de la Direction Générale, s'est donc fermement affichée pour un renouvellement régulier et fréquent du personnel expatrié tout en l'incitant à sa formation dans de nouvelles disciplines de la biologie. La réflexion de l'équipe d'encadrement du COP, non sans l'influence de la récente fusion France-Aquaculture/Sanofi, a abouti à la décision d'ajouter la génétique à la panoplie de ses domaines d'investigation.

Des premiers essais d'induction de la triploïdie avaient débuté fin 1989, menés par un étudiant en DEA sous contrat avec F.-A., Luc Peeters, et un Volontaire à l'Aide Technique, Christophe Ledu, initié à la cytogénétique lors de son stage de BTS au Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins de La Tremblade.

L'Unité de Génétique des Crustacés¹ a été créée en août 1990 avec l'affectation au COP d'Alain Diter, recruté un mois auparavant à l'IFREMER. Deux personnels permanents IFREMER sont venus étayer l'équipe, Vincent Vonau, en octobre 1990, et Loïc Le Déan, en octobre 1992. En novembre 1990, les missions de l'unité ont été définies. Les objectifs prioritaires étaient l'obtention de polyploïdes, la création de populations monosexes femelles, et l'étude de la résistance à l'IHHN (Annexe). Ce dernier point n'a pas été abordé par l'unité de cytogénétique car la phase préalable de vérification de la résistance en milieu infesté n'a débuté qu'en février 1994 avec le démarrage du projet Aquanova au Mexique. Deux programmes à mener en collaboration ont aussi été définis, l'un visant à maîtriser la fécondation *in vitro*, l'autre portant sur l'étude de la variabilité génétique à l'aide de marqueurs moléculaires. Enfin, dès sa création et pendant 3 ans, l'unité a accueilli sous forme d'action annexe le programme de cryoconservation et le personnel (V.A.T.) s'y rattachant.

¹ Elle sera cindée en Unité de Cytogénétique des Crustacés et Unité de Génétique Quantitative en 1993.

2. Le programme de production de crevettes polyploïdes

La découverte de l'induction artificielle de la polyploïdie a pourvu l'atelier du généticien des années trente d'un nouvel outil d'amélioration. La stérilité des plantes, puis celle des animaux (à l'exception toutefois des vertébrés supérieurs), était désormais accessible autrement que par la difficile et aléatoire recherche de gènes de stérilité (Demarly, 1963). La polyploïdie, définie par la présence d'un ou plusieurs jeux entiers de chromosomes supplémentaires, perturbe les mécanismes de reproduction. La sévérité des perturbations induites et le niveau où elles prennent place dans la suite des mécanismes qui composent la gamétogenèse est variable selon les espèces et le niveau de ploïdie. Des règles générales peuvent cependant être édictées. Les organismes triploïdes, qui possèdent trois jeux de chromosomes dans toutes leurs cellules, sont généralement stériles sans que la ou les raisons en aient été clairement élucidées, des contre-exemples venant infirmer les hypothèses communément admises. Les organismes tétraploïdes, avec quatre jeux de chromosomes par noyau, présentent généralement une gamétogenèse moins affectée et peuvent se reproduire entre eux ou avec des congénères diploïdes. Dans le premier cas, la descendance sera tétraploïde et dans le second triploïde, sous certaines hypothèses². La stérilité des triploïdes intéresse l'éleveur car le flux d'énergie normalement absorbé par la maturation sexuelle peut ainsi être dirigé artificiellement vers la croissance somatique. Ce phénomène est effectivement observé chez certains poissons et mollusques d'élevage (Ihssen *et al.*, 1990 ; Beaumont et Fairbrother, 1991). La polyploïdie a d'autres attraits pour le sélectionneur, comme l'attendrissement des cellules végétales (cas du blé tendre), l'élargissement de la diversité allélique ou la reproduction multiparentale, voire multispécifique.

En 1990, la littérature ne comportait aucune donnée concernant la polyploïdie induite chez les Crustacés. Toutefois les données disponibles dans les autres classes animales étaient suffisamment convergentes pour que le COP lance un programme de mise au point de la polyploïdie chez la crevette. Le résultat attendu était la stérilité des triploïdes accompagnée éventuellement d'un gain de croissance. Mais l'objectif premier restait la protection de souche. Il a été jugé plus aisé de mettre au point une technique de polyploïdisation sur une espèce modèle, *Penaeus indicus*, avant de la transposer sur l'espèce cible *Penaeus stylirostris*. En effet, *P. indicus* possède les caractéristiques d'un bon animal de laboratoire de génétique : sa reproduction est naturelle et avec un fort taux de succès dès lors que quelques principes de base sont respectés au cours de la maturation, son élevage larvaire ne présente pas de

² Notamment, la ségrégation équilibrée des chromosomes au cours de la méiose tétraploïde.

difficultés non plus et son intervalle de génération est court (6 mois). Sur chacun de ces points, *P. stylirostris* n'est malheureusement pas aussi avantageuse. De plus, en 1990, la disponibilité de *stylirostris* au COP ne permettait pas d'expérimenter tout au long de l'année.

2.1. Choix des techniques

En tenant compte des essais déjà effectués fin 1989 et début 1990, la première tâche fut de mettre au point une technique de vérification du niveau de ploïdie qui soit aisée, rapide et le plus fiable possible. A l'époque, nous ne disposions pas encore d'analyseur d'images. L'analyse caryologique des nauplii récemment éclos (stade N I ou N II) a été choisie après des tests portant sur tous les stades du développement larvaire. Le principal inconvénient de cette technique réside dans le fait que l'estimation du pourcentage d'individus polyploïdes est directement déduite d'un pourcentage de métaphases polyploïdes provenant d'un échantillon de larves mélangées. Les larves nauplii sont en effet trop petites pour pouvoir être analysées individuellement par caryologie. Le fait de ne pouvoir compter plusieurs métaphases d'un même individu conduit à ignorer d'éventuels aneuploïdes³ ou individus mosaïques⁴. Cette méthode d'analyse n'est donc pas parfaite puisqu'elle recèle un certain nombre de biais inévitables mais elle a donné des résultats satisfaisants chez les mollusques (Diter, 1990).

Dans le même temps, s'est opéré l'amélioration des installations existantes et l'aménagement d'un véritable laboratoire expérimental avec une salle humide et une pièce de microscopie. L'évacuation de l'ancien hall d'élevage de chevrettes et sa transformation en hall d'élevage larvaire de pénéides à des fins de sélection ont été réalisées entre début 1991 et la fin du premier semestre 1992. La conception des installations avait fait l'objet de tests de validation de la méthode d'élevage en volumes petits et nombreux dans un module d'élevage larvaire pilote conçu et réalisé par l'équipe.

L'induction de la polyploïdie consiste à augmenter le nombre de jeux de chromosomes présents dans toutes les cellules d'un individu. Il est évident que la manière la plus simple d'atteindre ce but est de traiter la cellule-œuf, à l'origine de toutes les autres. Supprimer une division cellulaire est aussi une façon très simple d'augmenter artificiellement le nombre de chromosomes présents dans une cellule. C'est pourquoi les traitements de polyploidisation emploient le plus souvent des agents antimitotiques et sont appliqués sur des œufs ou des ovocytes fraîchement pondus. Selon le type de division cellulaire inhibée, division de méiose ou

³ Aneuploïde : individu possédant un jeu incomplet de chromosomes dans toutes ces cellules.

⁴ Mosaïque : individu ayant au moins deux populations cellulaires de niveau de ploïdie différent, par exemple une population de cellules diploïdes et une population de cellules tétraploïdes.

simple mitose, l'individu sera respectivement triploïde ou tétraploïde. De nombreux moyens sont à la disposition du cytogénéticien pour supprimer une division cellulaire. Ce sont des traitements d'ordre chimique ou physique. Pour les crevettes, le choix de la méthode de polyploïdisation par choc thermique s'est imposé de lui-même. En effet, les premiers tests menés par Luc Peeters avec des molécules antimitotiques avaient été infructueux. La caféine avait une rémanence importante à l'intérieur de l'œuf du fait de son élimination difficile (faible solubilité dans l'eau de mer), et la cytochalasine B semblait ne pas pouvoir passer la barrière de l'enveloppe d'éclosion (Peeters, 1990). Les chocs de pression étaient exclus en raison de l'insuffisante disponibilité de la machine appartenant à l'IFREMER et basée à La Tremblade.

2.2. Mise au point d'un choc chaud visant à induire la tétraploïdie

Les premiers essais de polyploïdisation ont porté sur la première division de segmentation de l'œuf pour obtenir des tétraploïdes et sur la seconde division de méiose pour obtenir des triploïdes. En premier lieu, après la définition de conditions de ponte et d'incubation standards (à 29,5 °C), les paramètres d'un choc efficace ont été cernés. Dans la gamme des températures testées, allant de 30,0 à 42,0 °C, celle de 38,0 °C a été retenue car elle offre un bon compromis entre une survie à l'éclosion satisfaisante (1 à 10 %) et un taux de polyploïdes significatif (jusqu'à 50 % de métaphases triploïdes et 100 % de métaphases tétraploïdes). Bien entendu, la température et la durée du traitement interagissent et sont par conséquent indissociables. Ainsi, pour la température de 38,0 °C, la durée efficace est de 2 min 45 s.

Les traitements destinés à produire des triploïdes ont été laissés de côté après environ six mois d'essais. Ils induisaient des déformations sévères chez les rares nauplii éclos interdisant tout espoir de les élever. Des essais portant sur la simple manipulation des œufs avant l'achèvement de la méiose, qui correspond aussi à la fin de la réaction corticale, ont montré que les faibles taux de survie étaient essentiellement dus à cette manipulation. De plus, le traitement ne parvenait pas à produire plus de 50 % de triploïdes parmi les nauplii éclos. C'est pourquoi les efforts de l'équipe se sont concentrés sur la mise au point de la tétraploïdisation.

Les premiers essais d'élevage ont débuté mi 1991. Des post-larves issues des lots traités ont été analysées par caryologie. L'indice mitotique est très faible à ce stade. Cependant, sur une dizaine de post-larves dont le niveau de ploïdie a pu être déterminé, l'une d'elles présentait des métaphases tétraploïdes parmi les diploïdes. Cette post-larve a donc été considérée comme un individu mosaïque diplo-tétraploïde. Rappelons qu'au stade nauplius, la méthode d'estimation du pourcentage de tétraploïdes ne permet pas de discerner un individu mosaïque

diplo-tétraploïde d'un individu entièrement tétraploïde. D'autres élevages larvaires de lots traités ont suivi qui furent infructueux pour des raisons indépendantes du traitement de polyploïdisation.

2.3. L'influence de l'aliment sur le traitement de polyploïdisation

Depuis, le début des essais de polyploïdisation, les performances reproductives des géniteurs (nombre de pontes quotidiennes, taux de fécondation, taille des pontes) n'étaient pas satisfaisantes, compte tenu des caractéristiques de l'espèce. Après avoir testé tous les paramètres comptant pour une bonne maturation, nous avons montré que le facteur incriminé était le granulé monogalTM spécial maturation avec lequel les géniteurs étaient nourris en salle de maturation. L'aspect mais aussi les analyses proximales régulières de chaque fournée ont révélé la grande variabilité de la qualité de cet aliment. Celui-ci était produit au COP. Le remplacement de cette source de variabilité et de mauvaise qualité des pontes par un standard commercial, le Nippai[®] maturation, ne devint possible qu'à la fin de 1992. Les conséquences du changement d'aliment se manifestèrent dès la première semaine. En effet, en une seule journée, le stock de géniteurs produisit autant de pontes qu'au cours des trois mois précédents. Et la taille des pontes passa subitement de 50 000 à 100 000 œufs.

Par contre, la conséquence inattendue de cette amélioration des conditions de maturation fut que les œufs ne répondaient plus de la même façon au traitement de tétraploïdisation. Celui-ci ne produisait plus qu'au mieux 10 % de nauplii tétraploïdes. Une nouvelle optimisation du traitement, toujours basée sur le taux de nauplii tétraploïdes, a donc été nécessaire. Cependant aucune post-larve tétraploïde n'a pu être détectée à l'issue des nombreux élevages larvaires de lots traités avec ce nouveau choc thermique. Il fut donc décidé d'étudier au niveau ultrastructural les effets du choc thermique dans l'œuf pour améliorer son efficacité. Parallèlement, des essais de tétraploïdisation avaient repris avec une nouvelle molécule, la 6-diméthyl-aminopurine (6-DMAP), qui s'était avérée très efficace et bien moins toxique que les cytochalasines chez les mollusques. L'étude de ses effets à l'échelle subcellulaire en comparaison avec ceux d'autres molécules antiméiotiques a été entreprise.

2.4. L'apport de la microscopie confocale à balayage laser

C'est ainsi qu'une collaboration a été mise en place avec l'équipe du professeur Wallis H. Clark, Jr., au Laboratoire de Biologie Marine de l'Université de Californie situé à Bodega Bay (Bodega Marine Laboratory, BML). Cette équipe, spécialisée dans la reproduction des

crevettes marines, travaillait principalement sur l'ultrastructure des gamètes, leur capacitation et leur interaction au moment de la fécondation et sur le développement embryonnaire. L'intérêt du côté américain portait sur la nouveauté de l'espèce étudiée ainsi que sur les mécanismes de polyploïdisation. De notre côté, nous pouvions avoir accès à du matériel et des technologies de pointe, comme la microscopie confocale à balayage laser, ainsi bien sûr qu'à l'expérience de 20 années de recherche fondamentale sur la reproduction des crevettes. L'une des techniques intéressantes ramenées au COP fut l'utilisation de l'aminotriazole (ou ATA) qui empêche le durcissement de l'enveloppe d'éclosion. Lorsque les femelles pondent dans de l'eau de mer contenant de l'ATA, les œufs se développent sans malformation jusqu'à "l'éclosion" (dans ce cas, c'est un abus de langage) et donnent naissance à des nauplii d'aspect normal. L'intérêt de cette technique est de supprimer, très simplement et sans danger pour les œufs, cette barrière imperméable aux molécules antimitotiques et au divers fixateurs et colorants utilisés en microscopie confocale ou électronique que constitue l'enveloppe d'éclosion.

Les deux étudiants en thèse de l'unité, Luc Peeters et Myriam Morelli, ont effectué des séjours de plusieurs mois au BML, totalisant à eux deux plus d'une année de travail à Bodega. Ces travaux ont montré que le choc chaud tel qu'il était appliqué, c'est-à-dire avant le début de la première segmentation de l'œuf, ne pouvait pas conduire à l'induction de la polyploïdie. En effet, le traitement thermique, s'il est effectivement capable d'empêcher la progression du sillon de segmentation, ne permet pas en revanche de supprimer la duplication des centrosomes. Or les centrosomes sont les organisateurs de la mitose et, au cours de la division suivante, ils président au passage direct de la cellule œuf à un embryon de quatre blastomères. Ainsi, bien que la première division soit en apparence inhibée, il n'en est rien au niveau des noyaux qui restent ou retournent à l'état diploïde. L'observation de métaphases tétraploïdes dans les cellules de nauplii résulte d'accidents provoqués par le choc chaud. Les larves étaient probablement des individus mosaïques, comme l'analyse caryologique des post-larves l'a confirmé. En effet, le passage direct d'une à quatre cellules n'est que l'un des mécanismes induits par le choc chaud, beaucoup d'anomalies mitotiques ayant été relevées (fuseau tétrapolaire, absence de migration polaire des chromosomes).

En ce qui concerne les traitements chimiques, les résultats des observations au microscope à balayage laser n'ont pas été plus encourageants qu'avec le choc chaud pour l'induction de la tétraploïdie. La caféine provoque des aneuploïdies sévères qui conduisent très tôt à des développements anormaux voués à l'avortement. Les cytochalasines B et D, aux doses habituellement employées dans les autres classes animales, inhibent de façon irréversible les

divisions cytoplasmiques sans affecter les divisions nucléaires, ce qui conduit à une cellule unique contenant de nombreux noyaux. Le développement d'un tel syncycium a été suivi jusqu'au stade de la gastrulation des témoins. Les noyaux à l'intérieur de la cellule unique se comportent comme s'ils appartenaient à un embryon normal. Ils se divisent de façon synchrone et se situent à la périphérie de la cellule exactement aux mêmes endroits et selon la même orientation que dans les témoins pluricellulaires. A des concentrations plus faibles (inférieures ou égales à 300 mM), les cytochalasines inhibent de façon réversible la cytodivision comme dans les autres classes animales. La duplication des centrosomes n'étant pas perturbée par le traitement sur la première division cellulaire, la seconde division de segmentation de l'œuf produit 4 cellules-filles à partir de la cellule unique binucléée. L'embryon recouvre probablement ainsi son état diploïde. La 6-DMAP inhibe la division cellulaire mais n'est pas capable d'inhiber la duplication des centrosomes. Elle n'est donc pas adaptée non plus à l'induction de la tétraploïdie chez les crevettes. Elle a toutefois permis l'obtention d'une curiosité, des embryons seminuéclés. La première division de ceux-ci a été inégale dans la répartition de l'ADN. Tous les chromosomes sont restés dans l'une des deux cellules-filles. Le déroulement des divisions ultérieures n'a pas été affecté. Ainsi, le blastomère nucléé, et par conséquent tétraploïde, a donné naissance à des cellules-filles tétraploïdes. Le blastomère énucléé s'est divisé en cellules-filles énucléées. De tels embryons semi-nuéclés ont poursuivi leur développement jusqu'au stade 32 cellules, stade auquel les échantillonnages ont cessé. Les résultats ont été très intéressants sur le plan fondamental mais de peu d'utilité sur le plan de l'induction de la tétraploïdie, si ce n'est qu'ils ont permis de réorienter les investigations dans d'autres directions.

En effet, devant les phénomènes nouveaux observés grâce au microscope confocal à balayage laser, la littérature sur la polyploïdie induite chez les Amphibiens, déjà ancienne, a été étudiée en profondeur. Une stratégie nouvelle en a émergé, celle de traiter par choc chaud les embryons au moment de l'interphase précédant la seconde division de segmentation. C'est en triant les œufs à ce stade que des tétraploïdes ont été créés chez le triton (Gaillard et Jaylet, 1975). Des essais ont donc été tentés sur *P. indicus* et ils ont abouti à l'observation d'un phénomène nouveau. Des œufs ainsi traités au stade deux-cellules passent comme les témoins au stade quatre-cellules mais en moins d'une minute retournent au stade deux-cellules jusqu'au moment où les témoins passent au stade huit-cellules. A ce moment, les œufs traités passent, eux, au stade quatre-cellules. Leur développement présente donc une division cellulaire de retard sur les témoins. Ils gardent ce retard au moins jusqu'à la gastrulation. Ces animaux

traités ont été mis en élevage. On a détecté la présence parmi eux de larves, puis de post-larves, beaucoup plus petites que les témoins et possédant une coloration différente. La comparaison des noyaux de leur abdomen avec ceux des témoins a révélé que leur taille correspondait à celle de noyaux tétraploïdes (diamètre 1,5 fois plus grand que celui des témoins diploïdes). Malheureusement, seulement huit post-larves traitées avaient survécu jusqu'au stade de l'analyse, quatre d'entre elles ayant été déterminées tétraploïdes par la méthode d'analyse employée. D'autres élevages ont été lancés dans le but de confirmer l'efficacité de ce traitement pour la production de tétraploïdes. De nombreuses difficultés d'ordre logistique et matériel ont jusqu'à présent ajourné cette confirmation.

2.5. Résultat annexe

Pour comprendre les conséquences des traitements de polyploïdisation sur la division nucléaire et cytoplasmique, il est nécessaire de visualiser simultanément le génome nucléaire et les centrosomes. La nécessité de visualiser ces deux structures subcellulaires en microscopie confocale à balayage laser a conduit à mettre au point une méthode originale de double coloration. Elle utilise un phénomène observé fortuitement par L. Peeters. En effet, si le phénomène de perte de fluorescence des fluorochromes lorsqu'ils sont exposés à la source lumineuse d'excitation est bien connu (dénommé *fading* ou *bleaching* par les anglophones), en revanche, le fait que ces fluorochromes puissent être réexcités dans une autre longueur d'onde était inconnu. Cette découverte permet notamment d'employer des colorants excitables en lumière ultraviolette, qui sont généralement les moins chers des fluorochromes, avec une source d'excitation en lumière visible, qui comporte de nombreux avantages. Parmi ceux-ci, notons la possibilité d'utiliser une source laser en lumière visible d'emploi plus aisé et d'un coût beaucoup plus raisonnable qu'une source laser ultraviolette. La méthode consiste donc à illuminer les préparations traitées avec les colorants fluorescents en lumière ultraviolette (source classique d'un microscope à épifluorescence) jusqu'à l'extinction de la fluorescence, puis à les réexciter en lumière visible (source laser) pour l'observation de la fluorescence secondaire. Ce phénomène met en évidence de nouvelles propriétés des colorants fluorescents dont l'étude approfondie pourrait déboucher sur l'exploitation de nouveaux moyens d'investigation en recherche biologique.

3. Le programme population monosex femelle de crevette

Les crevettes pénéides présentent un dimorphisme sexuel relativement marqué en ce qui concerne la taille et la vitesse de croissance. Les femelles sont toujours plus grosses que les mâles au même âge à partir de la puberté, l'ampleur de la différence dépendant de l'espèce. Tirer parti de cette caractéristique pouvait s'avérer rentable pour l'aquaculteur. Le programme d'étude a donc été planifié en trois phases. La première a consisté à vérifier et quantifier le gain de croissance d'une population monosex femelle par rapport à une population mixte. La poursuite de ce programme a été décidée à la suite des résultats de cette phase d'évaluation. La seconde (qui a cependant débuté en même temps que la première) devait résoudre la question du déterminisme du sexe pour permettre la mise en place de la troisième phase, celle de la création par voie génétique d'une population monosex femelle. L'espèce retenue a été *Penaeus monodon* variété Fidji dont le dimorphisme sexuel était le plus avantageux parmi les 6 espèces et souches dont le COP disposait en 1990.

3.1. Étude de la croissance en populations monosexes

Les données concernant la différence de taille entre mâles et femelles avaient jusqu'alors toutes été recueillies dans des élevages mixtes. Il importait donc d'étudier l'expression du potentiel de croissance de chaque sexe en l'absence de facteurs sociaux du type de ceux rencontrés chez la chevrete *Macrobrachium rosenbergii*.

Deux expériences successives ont été menées, chacune durant cinq mois dans des bassins en béton de 100 m² chacun. La hauteur d'eau était de 1 mètre. Chaque population, à savoir monosex femelle, monosex mâle et témoin mixte, était représentée par 2 réplicats de 3000 individus par bassin. Les animaux ont été sexés et triés à l'âge de 3 mois pour le premier essai et 4 mois pour le second (à une taille d'environ 5 cm).

La constitution de populations monosexes par tri manuel de populations mixtes fut l'occasion de vérifier l'absence de déviation de la sex-ratio dans notre souche. Sur les deux élevages successifs, l'avantage de la population monosex femelle par rapport à la population mixte servant de témoin a été de 10 % en biomasse pour le premier essai et de 20 % pour le second. Dans les deux essais, les populations monosexes mâles ont présenté un déficit d'environ 15 % par rapport au témoin mixte. Les taux de survie ont été comparables (entre 50 et 60%). La dispersion en taille n'a pas été réduite par le tri, ce qui tempère l'intérêt du gain de croissance. Au cours du premier essai, la pollution accidentelle par des animaux de sexe opposé (essentiellement due à des sauts d'un bassin à l'autre lors d'un épisode d'hypoxie) s'est

élevée à 2 à 13 % selon les bassins. Lors du second essai, la pollution a été maintenue en dessous de 3 %, ce qui peut expliquer la différence plus nette entre la population monosexue femelle et le témoin.

3.2. Essais d'inversion du sexe par opération chirurgicale

Le sexe est déterminé chez de nombreuses espèces de Crustacés par la présence de la glande androgène, le sexe par défaut étant, comme dans l'espèce humaine, le sexe femelle. Chez les crevettes pénéides, le déterminisme du sexe est inconnu. L'analyse de la sex-ratio dans les descendance d'animaux sexuellement inversés et croisés avec des animaux du même sexe génétique permet d'appréhender le déterminisme. Une solution prometteuse pour résoudre cette difficile question pouvait donc utiliser l'inversion sexuelle par ablation de la glande androgène chez le mâle et greffe chez la femelle. D'autant que la technique avait été employée avec succès au COP sur les chevrettes. En se basant sur l'expérience du COP et les publications de Nagamine *et al.* (1980a et b), plus de cent crevettes de chaque sexe ont été opérées avec un taux de survie post-opératoire proche de 100 %. Cependant aucun animal opéré n'a présenté de signe incontestable de changement de sexe. Une étude histologique a été entreprise pour confirmer la nature du matériel retiré et greffé. La glande androgène est bien située contre l'ampoule terminale du canal déférent (Grevet, 1992). Par contre, à l'âge de l'opération chirurgicale, la différenciation de la glande n'est pas détectable, ce qui pourrait expliquer l'inefficacité de la greffe et peut-être aussi de l'ablation. La greffe de glande androgène d'adulte n'a pu être menée faute de matériel biologique en quantité suffisante à partir de la fin de 1992. En effet, le COP a rencontré les plus grandes difficultés pour conserver la souche de *P. monodon* variété Fidji en raison d'une maturation difficile des femelles et de leur très rare fécondation.

3.3. Analyse du caryotype

Devant le blocage rencontré avec les opérations chirurgicales, d'autres voies ont été suivies pour tenter de comprendre le déterminisme du sexe chez *P. monodon*. La première a été l'analyse caryotypique. Elle permet d'identifier le sexe hétérogamétique lorsque le caryotype de l'espèce est suffisamment évolué et qu'une paire d'hétérochromosomes s'est différenciée. Le caryotype des crevettes pénéides possède les caractéristiques d'une espèce peu évoluée. Les chromosomes sont nombreux, petits, très peu différents les uns des autres avec un centromère placé préférentiellement en région médiane. La science de l'analyse chromosomique a

développé des techniques et des méthodes peu adaptées au cas des crevettes pénaïdes car elle s'est surtout intéressée aux espèces mammaliennes ou à des animaux moins évolués mais dont le caryotype présentait des facilités d'étude. Les efforts de mise au point de moyens d'investigation caryologique ont surtout porté sur les techniques de coloration des chromosomes.

Nous avons donc logiquement cherché à adapter des protocoles de banding, une technique de coloration des chromosomes qui fait apparaître des bandes contrastées spécifiques de chaque paire. Ainsi l'appariement serait beaucoup plus aisé et la recherche d'une paire d'hétérochromosomes s'en trouverait facilitée. Les premiers essais réalisés par différents étudiants n'ont pas été concluants et l'absence de matériel biologique (sous forme de nauplii, dont l'indice mitotique et la qualité des métaphases sont satisfaisants) a rapidement tari cette voie de recherche.

Sans l'aide du banding, l'établissement du caryotype avec les moyens analytiques classiques, peu évolués, relève de la gageure. Nous nous sommes donc lancé dans la mise au point d'une méthode analytique optimisée utilisant comme seules informations les longueurs des bras chromosomiques. Nous nous sommes inspirés d'un programme développé pour les bivalves qui nous avait été gracieusement fourni par C. Thiriot (CNRS, Villefranche-sur-Mer), mais dont la conception ne convenait pas au cas des crevettes. En particulier, le postulat qu'il n'existait pas de paire hétéromorphe dans les métaphases analysées le rendait caduc.

Une première application a été rapidement mise au point pour mesurer avec l'analyseur d'images les longueurs de chacun des quatre bras de chaque chromosome métaphasique. Elle écarte, en partie seulement car elle requiert l'intervention de l'opérateur, la subjectivité de la mesure classique à l'aide du double-décimètre sur photo.

La seconde application (sous Excel) traite les données brutes des longueurs des petits et grands bras chromosomiques pour proposer un appariement des chromosomes. En réalité, deux applications ont dû être développées selon que l'on recherche une paire de chromosomes sexuels ou que l'on postule qu'ils n'existent pas. Il convient de commencer par chercher une paire d'hétérochromosomes. Le principe de cette première méthode repose sur l'appariement des deux chromosomes dont les dimensions des petits et des grands bras sont les plus semblables. Tous les chromosomes sont ainsi appariés par ordre décroissant de ressemblance, la dernière paire représentant logiquement les chromosomes sexuels, s'ils existent. Si les caractéristiques de cette dernière paire sont constantes d'une métaphase à l'autre (pour l'un des deux sexes), on peut établir l'existence d'hétérochromosomes. Par contre si l'analyse de

plusieurs métaphases de chacun des deux sexes ne met pas en évidence de paire hétérologue, alors le second mode de calcul est employé car il optimise l'appariement en tenant compte de l'ensemble du caryotype. Le principe de ce second mode d'appariement est basé sur une résolution graphique qui minimise le carré de la somme des distances euclidiennes entre les chromosomes homologues. Ces chromosomes sont repérés dans un plan dont les deux dimensions correspondent à la longueur des petits et des grands bras. De nombreux essais et ajustements ont été nécessaires pour obtenir un algorithme satisfaisant qui a été validé *a posteriori* sur des caryotypes très différents de celui des crevettes, ceux de l'homme et de l'huître creuse.

3.4. Autres pistes pour l'étude du déterminisme du sexe

Une autre piste suivie a été l'utilisation de marqueurs hypervariables de type RAPD. Cette technique amplifie des séquences d'ADN réparties de manière aléatoire dans le génome. Les essais menés par le Laboratoire Génome et Population de Montpellier visaient à révéler une séquence spécifique de l'un des sexes. Ainsi le sexe hétérogamétique aurait été identifié. La reproductibilité des RAPD s'est avérée très difficile à établir, les résultats étant très sensibles aux conditions du milieu d'amplification (notamment la stringence). Ce travail, dont la probabilité de réussite reste faible, avait aussi pour objectif de valider sur les crevettes un certain nombre de techniques standards de biologie moléculaire, comme l'extraction d'ADN à partir d'échantillons aussi petits qu'une larve nauplius (ce qui n'avait jamais été fait à l'époque) ou la PCR (Taussat, 1992). Sur ce plan, il a atteint son objectif et a ouvert la voie à la mise au point de locus microsatellites. Celle-ci ne sera pas plus fructueuse puisqu'en 1996, malgré les efforts importants sur le plan humain et matériel, aucun des locus mis au point n'est spécifique du sexe chez *P. monodon*. Il convient cependant de préciser que les locus obtenus sont pour la plupart monomorphes, ce qui est une nouvelle difficulté rencontrée chez les crevettes, taxon qui, à bien des égards, s'écarte des modèles animaux connus.

Parallèlement, une autre collaboration avait été mise en place pour l'analyse de l'ADN mitochondrial des crevettes avec l'Université de Poitiers. L'extraction d'ADN mitochondrial à partir d'échantillons congelés a été mise au point. Une estimation de la distance génétique entre les trois souches de *P. monodon* présentes au COP à cette époque a été réalisée (Bouchon *et al.*, 1992). Elle a guidé l'élimination des souches australienne et malaise lorsque les bassins sont venus à manquer pour le programme d'amélioration génétique par sélection.

Une dernière voie envisagée était l'utilisation de la reproduction uniparentale. En effet, on peut tester des modèles de déterminisme du sexe par l'analyse de la sex-ratio de descendances uniparentales. Le recours à la gynogenèse avait donc été envisagé dans le cas de la crevette. Toutefois, cette manipulation du système de reproduction nécessite la maîtrise préalable de quelques techniques, notamment la fécondation *in vitro*, ou à défaut, l'insémination artificielle. La fécondation *in vitro* requiert la collecte d'ovocytes non fécondés. C'est pourquoi a été mis en place le programme d'accompagnement sur les mécanismes de reproduction.

4. Le programme d'étude des mécanismes de reproduction des crevettes

Ce programme, dont la finalité était la mise au point de la fécondation *in vitro*, a été initié sur le modèle *P. indicus* pour les mêmes raisons que dans le cas de la polypléidie. Il a été conduit par Luc Peeters et représente la première partie de sa thèse.

Les essais préliminaires de maturation des femelles en l'absence de mâles afin d'obtenir des œufs non fécondés ont produit des résultats inattendus. En effet, la maturation des femelles a été très affectée et parfois inexistante. Une série d'expériences a été conçue pour confirmer et comprendre l'origine de ce phénomène d'inhibition de la maturation en l'absence de mâles. Ces travaux ont montré, pour la première fois chez des pénéides, l'influence de l'insémination des femelles par les mâles sur la maturation et bien sûr la ponte, mais aussi sur la longueur du cycle de mue et la croissance.

L'étude des gamètes et de leurs interactions au moment de la fécondation a révélé plusieurs indices étayant l'hypothèse d'une capacitation des spermatozoïdes dans le thélycum de la femelle chez *Penaeus indicus*. En effet, le pH intracellulaire, mesuré par sonde moléculaire fluorescente, des spermatozoïdes prélevés dans le thélycum de la femelle est significativement inférieur à celui de spermatozoïdes témoins échantillonnés avant la copulation. D'autre part, la concentration calcique cytosolique des spermatozoïdes est, comme celle de l'ion H^+ , plus élevée après un séjour dans le thélycum. Ainsi, si ces données sont confirmées, il conviendrait, pour réussir une fécondation *in vitro*, d'employer des spermatozoïdes capités. La capacitation peut être naturelle, si les spermatozoïdes sont prélevés dans le thélycum, ou artificiellement obtenue selon la méthode de chargement ionique mise au point chez la crevette *Sycionia ingentis*.

5. Le programme de mise au point de marqueurs hypervariables chez les crevettes

Les marqueurs génétiques employés avec les outils conceptuels et statistiques puissants de la génétique des populations permettent d'augmenter significativement l'efficacité des méthodes classiques de sélection génétique. Chez les crevettes, la variabilité des marqueurs génétiques classiques (allozymes) est très faible et n'autorise leur utilisation ni pour la génétique des populations ni pour l'aide à la sélection. C'est pourquoi, il était indispensable de disposer de techniques de révélation de marqueurs moléculaires hypervariables. Le programme a vraiment débuté en 1993 après l'essai de 1992 avec les RAPD. Il a porté sur la recherche de séquences de type microsatellite dans le génome nucléaire. Le modèle utilisé initialement, *P. monodon*, a laissé la place à l'espèce cible, *P. stylirostris*, à partir de 1995. Tout ce programme de recherche a été mené grâce à la collaboration étroite avec le Laboratoire Génome et Populations de Montpellier.

Une première banque génomique de *monodon* avait été constituée en 1993. Onze locus microsatellite en avaient été tirés. Les trois d'entre eux qui se sont avérés polymorphes ne possédaient, dans la population du COP, que deux allèles. Les séquences microsatellite de ce type sont réputées très variables dans le monde animal. Sous l'hypothèse que le modèle crevette suit la règle générale, on expliquera donc la très faible variabilité de notre souche de *monodon* (variété Fidji) par une consanguinité importante. Cette constatation n'est pas inattendue, compte tenu du mode de gestion de la souche dans lequel le souci de la taille efficace et de la consanguinité n'est apparu que tardivement. Malheureusement, les mauvaises performances de reproduction de la souche n'ont pas permis d'appliquer les principes d'un maintien de la diversité. Même dans le cas où cela eût été possible, la diversité était déjà probablement trop restreinte pour qu'une gestion optimisée soit intéressante à mettre en œuvre. Notons enfin qu'actuellement, la consanguinité de la souche de *monodon* reste à estimer, le point de référence étant le polymorphisme observé dans une population naturelle. Nous n'avons pas pu nous procurer ces échantillons malgré les demandes répétées à différents organismes de la zone indo-pacifique, notamment à l'Australian Institute of Marine Science, à Townsville, Queensland.

Lorsque l'emploi des marqueurs hypervariables est devenu utile chez *P. stylirostris*, c'est-à-dire lorsque la réflexion et les travaux en sélection ont été suffisamment avancés, les sondes mises au point chez *monodon* ont été testées. Un seul des onze jeux d'amorces disponibles s'est révélé apte à amplifier une séquence microsatellite de *stylirostris*. Devant ce résultat nettement insuffisant, une seconde banque génomique a été créée à partir de la souche de *stylirostris* du

COP (SPR 43). Les locus microsatellites qui ont été obtenus sont malheureusement trop peu polymorphes dans nos souches (celle du COP et celle de Nouvelle-Calédonie) et encore trop peu nombreux pour aider efficacement à la sélection en l'état. Toutefois, la voie des marqueurs liés aux caractères quantitatifs (quantitative trait loci ou QTL) pourrait rentabiliser les efforts investis dans ce domaine.

6. Les actions de cryoconservation de microalgues et de gamètes et d'embryons animaux

Ces différentes actions de recherche, toutes relativement ponctuelles, ont été menées entre septembre 1990 et juillet 1993. Elles ont correspondu au passage de deux V.A.T., Pascal Dumont et François-Xavier Cuende et à l'accueil de trois stagiaires, Catherine Simon, Frédéric Chevallier et Cédric Lo.

6.1. Le sperme de crevette

Le premier travail, et celui dont la portée est la plus importante, a consisté à mettre au point la cryoconservation de boulettes de sperme de *Penaeus vannamei*. Le milieu cryoprotecteur retenu est composé d'eau de mer contenant 15 % (en volume) de glycérol et du saccharose à 0.5 M. Ce milieu n'affecte pas l'adhérence de la boulette, indispensable à une insémination réussie, ni l'intégrité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. La courbe de refroidissement a été optimisée en trois phases. La première refroidit les boulettes, placées vingt minutes auparavant dans le milieu cryoprotecteur, jusqu'à la température de cristallisation en les plaçant dans la chambre de congélation d'un congélateur à azote liquide équilibrée à -12°C. La vitesse de refroidissement calculée dans ces conditions correspond à -1.6°C/min. Lorsque la température des tubes (repérées par une sonde placée dans un tube témoin) atteint la température de la chambre, la cristallisation est induite par choc mécanique. La seconde phase de la courbe est le pallier de vingt minutes à -12°C. Puis la troisième phase consiste à abaisser la température à raison de -5°C/min jusqu'à -20°C puis à plonger les tubes dans l'azote liquide. Des boulettes de sperme congelées dans ces conditions et ayant séjourné 5 mois dans l'azote liquide ont servi à inséminer des femelles. Les taux de fécondation obtenus atteignent environ 40 % de ceux des témoins. Les larves issues de ce sperme congelé n'ont présenté aucune malformation et ont été élevées. Aucune différence de survie ou de croissance n'a pu être mise en évidence par rapport aux élevages témoins. L'élevage a été conduit jusqu'à l'obtention de géniteurs dont les performances de reproduction n'ont différé en rien de celle des

témoins. Les descendants de ces animaux ont été élevés sans qu'il soit décelé la moindre anomalie (AQUACOP *et al.*, 1992a et c).

6.2. Les embryons de crevette

La seconde opération de recherche devait porter sur la mise au point de la cryoconservation d'embryons de crevettes. Le modèle employé a été *P. indicus*. Lors de la première phase du travail on s'est attaché à définir un stade de développement supportant le mieux le contact de l'indispensable milieu cryoprotecteur. Cinq stades de développement ont été testés, du stade 2 cellules jusqu'au nauplius précoce qui apparaît environ 5 h après la fécondation. C'est le stade le plus tardif qui a résisté le mieux à la toxicité des cryoprotecteurs testés. Il n'est pas exclu qu'un stade encore plus tardif, comme le nauplius éclos par exemple, puisse produire de meilleurs rendements. Une difficulté supplémentaire est apparue, l'enveloppe d'éclosion des embryons étant partiellement ou totalement imperméable à la plupart des molécules cryoprotectrices testées. Deux protocoles de perméabilisation ont été mis au point, l'un par digestion enzymatique, l'autre par une attaque modérée à l'ion hypochlorite. Huit milieux cryoprotecteurs ont été sélectionnés pour leur absence de toxicité au stade considéré. La seconde phase, correspondant au protocole de refroidissement, n'a pas été achevée dans le temps imparti. Cependant, la descente jusqu'à -12°C ou -14°C , c'est-à-dire après la cristallisation, suivie d'une remontée à la température ambiante conduit à un taux d'éclosion des embryons décongelés d'environ 50 % du témoin, sans que des malformations soient décelables. Ce sont donc des résultats encourageants qui devraient servir de base à de futurs travaux (Simon, 1991 ; Simon *et al.*, 1994).

6.3. Les microalgues

Des essais de congélation ont été menés sur sept espèces ou souches d'algues unicellulaires d'emploi classique en aquaculture. L'objectif était de mettre au point des techniques très simples notamment pour la décongélation afin qu'elles puissent être utilisées dans les conditions souvent rustiques d'une écloserie de production. Ainsi pour les espèces les plus robustes, une congélation par simple plongée dans l'azote liquide (vitrification) et un réchauffement dans l'eau à température ambiante a montré que la cryoconservation de ces souches est aisée à mettre en œuvre (Chevallier, 1991).

6.4. Le sperme de loup tropical

La congélation du sperme de loup tropical *Lates calcarifer* a été mise au point. Au préalable, des essais de fécondation *in vitro* chez cette espèce ont conduit à des taux d'éclosion d'environ 15 %. La sélection du meilleur milieu cryoprotecteur parmi les six testés a été basée sur la perte de motilité du sperme. L'innocuité du dilueur de sperme utilisé (liquide de Ringer) a été prouvée puisqu'il a permis la conservation du sperme à 4°C pendant 24 heures sans perte de motilité. La congélation en deux étapes a été retenue. Le sperme conservé plusieurs jours dans l'azote liquide a donné des taux d'éclosion identiques à ceux des témoins (Lo, 1993).

7. Conclusion et perspectives

Tous les programmes affichés comme prioritaires en 1990 ont été abordés. Ils ont tous rencontré des difficultés importantes provenant de la biologie particulière des crevettes pénéides. Ces difficultés ont aussi été rapportées par des équipes de recherche fondamentale, comme celles de Laffont (ENS) ou de Goudeau (Université de Jussieu), et les ont conduites à changer de modèle biologique. Le programme le plus important, celui concernant les polyploïdes a abouti au début de 1996 à la production de quelques post-larves très probablement tétraploïdes. La confirmation de la réussite de ce travail n'a pas été obtenue à ce jour. Cependant, les techniques mises au point sont maîtrisées par le personnel en place et des élevages d'animaux traités sont en cours pour leur analyse génétique. Si l'existence de polyploïdes parmi les cheptels élevés se confirme, la poursuite de ce programme nous semble très importante pour l'avenir du COP. L'achèvement du travail consisterait essentiellement en l'étude des performances d'élevage et des caractéristiques biologiques des polyploïdes, en particulier dans le domaine de la reproduction.

Le programme d'étude du déterminisme du sexe n'a pas abouti à la résolution de cette question malgré le faisceau de moyens complémentaires mis en œuvre pour y parvenir. La maîtrise zootechnique, même si elle n'est pas le seul élément en cause, a été le principal frein à l'avancée de ce travail. Toutefois, ce programme a suscité l'émergence d'outils d'investigation qui sont utilisables sur d'autres espèces, notamment la chaîne d'algorithmes d'analyse du caryotype.

L'étude des mécanismes de reproduction et du développement a apporté toute une moisson d'informations originales et allant parfois à l'encontre des dogmes établis jusque dans le

domaine de la biologie cellulaire. La fécondation *in vitro* n'a pas été accomplie mais des pistes ont été tracées pour sa mise au point.

Des succès ont été obtenus dans le domaine de la cryoconservation puisque des spermatozoïdes congelés sont à l'origine de deux générations de crevettes *vannamei*. Le travail prometteur sur les embryons est laissé inachevé. La cryoconservation a toujours été le parent pauvre de l'IFREMER. C'est cependant un domaine stratégique dont la maîtrise assurera une nette avance, dans les autres disciplines de recherche et sur le plan commercial, au laboratoire qui la possédera. Les scénarios qu'on a pu observer chez les mammifères en sont la preuve.

Dans le domaine des marqueurs hypervariables, les résultats semblent ne pas être à la hauteur de ce que l'on était en droit d'attendre (polymorphisme très faible aux locus microsatellites obtenus). Ceci est très probablement la conséquence d'une forte consanguinité de nos souches. La comparaison avec des populations naturelles permettrait de l'affirmer. Si tel est le cas et que la diversité génétique de nos souches n'est pas élargie par l'apport de sang neuf, d'une part l'intérêt des marqueurs, moléculaires ou autres, s'en trouvera nettement réduit, et d'autre part l'amélioration par sélection parviendra rapidement à l'impasse qu'est le plateau de sélection.

Le bilan de la recherche en cytogénétique des crevettes n'est certainement pas à la hauteur de l'optimisme qui a présidé à son lancement. On mesure ici le difficile pari qu'est la recherche, et plus particulièrement la génétique, lorsqu'elle choisit de créer la vie sous des formes originales plutôt que de rendre compte de ses mécanismes établis.

8. Les moyens en personnel et en matériel

8.1. Le personnel

Nom	Fonction	Période
Luc Peeters	stagiaire DEA UFP	octobre 1989 - septembre 1990
Christophe Ledu	VAT génétique	décembre 1989 - mars 1991
Alain Diter	cadre, chef de l'unité	août 1990 - fermeture de l'unité juillet 1996
Pascal Dumont	VAT cryobiologie	septembre 1990 - décembre 1991
Vincent Vonau	technicien supérieur	octobre 1990 - fermeture de l'unité juillet 1996
Yves Jousselin	VAT génétique	décembre 1990 - mars 1992
Catherine Simon	stagiaire DEA UFP	février 1991 - juin 1991
Frédéric Chevallier	stagiaire INTECHMER	avril 1991 - août 1991
Luc Peeters	stagiaire doctorat UFP	avril 1991 - janvier 1996
Lucile Grémy	stagiaire INAPG	juillet 1991 - août 1991
François-Xavier Cuende	VAT cryobiologie	décembre 1991 - mars 1993
Christophe Noiret	VAT génétique	décembre 1991 - mars 1993
Gervaise Grevet	stagiaire INAPG	février 1992 - avril 1992
Joceline Castany	stagiaire DEA UFP	mars 1992 - juillet 1992
Manuel Ducrocq	stagiaire INTECHMER	avril 1992 - août 1992
Myriam Morelli	stagiaire doctorat UFP	octobre 1992 - fermeture de l'unité juillet 1996
Loïc Le Déan	technicien principal	octobre 1992 - fermeture de l'unité juillet 1996
Benoît Thuillier	VAT génétique	décembre 1992 - mars 1994
Sylvain Péresse	stagiaire DEA UFP	février 1993 - juillet 1993
Cédric Lo	stagiaire DEA UFP	février 1993 - juillet 1993
Sylvain Péresse	VAT génétique moléculaire	décembre 1993 - mars 1995
Sidonie Folco	stagiaire DEA UFP	février 1995 - juillet 1995
Yves Vigouroux	VAT génétique moléculaire	avril 1995 - juillet 1996
Sylvain Péresse	cadre en CDD	mai 1995 - juin 1995
Luc Peeters	post-doc Université Française du Pacifique	mai 1996 - mai 1997

8.2. Le matériel expérimental

1) Un laboratoire d'analyse d'images doté d'un microscope à immersion et à contraste de phase relié à un système d'analyse d'image SAMBA de chez TITN - ALCATEL, constitué d'une caméra couleur TriCCD, une unité de réglage vidéo, une unité centrale informatique équipée d'une carte de numérisation, deux moniteurs couleurs et une imprimante à jet d'encre. Dans ce laboratoire, se trouve aussi un percolateur pour extraction de caféine.

2) Un laboratoire de préparation microscopique avec la verrerie adéquate et une hotte aspirante.

3) Un laboratoire d'extraction de l'ADN génomique et de préparation des mélanges pour l'amplification génique par PCR.

4) Un laboratoire de migration et révélation-lecture des gels contenant les amplifiats.

5) Un laboratoire humide équipé d'un système de distribution d'eau de mer filtrée thermorégulée dans des pondoirs. Tous les traitements de polyploïdisation, thermiques comme chimiques, ont été réalisés dans ce laboratoire gréé de multiples bacs, tamis, verrerie, cuve isothermique et thermoplongeurs.

6) Enfin un hall d'élevage équipé de deux modules de 16 bacs d'élevage larvaire de 50 litres chacun et de deux modules de 16 bacs de nurserie de 200 litres chacun. Une salle de ponte et d'incubation dotée de 10 pondoirs de 200 litres et de 10 incubateurs. Deux salles de maturation offrant au total 4 bassins en photopériode contrôlée et 2 bassins en photopériode naturelle. Ces installations ont très peu servi pour les programmes ci-dessus mentionnés car elles étaient surtout dédiées à la sélection génétique.

9. Documents produits par l'unité

9.1. Publications et communications

AQUACOP, Diter A., Dumont P., Simon C., and Cuende F.-X., 1992a. Cryopreservation of sperm and embryos of penaeid shrimps. First Ecuadorian Congress of Aquaculture, Guayaquil, 19-23 October 1992 (communication orale).

AQUACOP, Diter A., Vonau V., Noiret C., Ledu C. and Castany J., 1992b. Production of tetraploid nauplii in the shrimp *Penaeus indicus*. First Ecuadorian Congress of Aquaculture, Guayaquil, 19-23 October 1992 (communication orale).

AQUACOP, Dumont P., and Diter A., 1992c. Cryopreservation of sperm in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. Workshop on Gamete and Embryo Storage and Cryopreservation in Aquatic Organisms, Marly-le-Roy, 16-17 avril 1992 (communication orale).

- Bouchon D., Diter A., Raimond R. and Souty-Grosset C., 1992. Isolation and characterization of the mitochondrial DNA in populations of 2 species of *Penaeus*: *P. japonicus* and *P. monodon*. First European Crustacean Conference, Paris, 31 August-5 September 1992, (communication orale).
- Diter A., Quillet E. and Chourrout D., 1993. Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 42(5) : 777-787.
- Garen P., Cochard J.-P., Moriceau J., and Diter A., 1993. Tolerancia del *Penaeus stylirostris* SPR 43 al bajar la salinidad. Second Ecuadorian Congress of Aquaculture, Guayaquil, 20-25 October 1993 (communication orale).
- Heitzmann J.C., Diter A. and AQUACOP, 1993. Spermatophore formation in the white shrimp *Penaeus vannamei* : dependence on the intermoult cycle. *Aquaculture*, 116(1) : 91-98 .
- Morelli M., Le Déan L., Peeters L., Vonau V. and Diter A. Karyotype of *Penaeus indicus* (Crustacea, Decapoda) established using image analysis system. *Soumis à Marine Biology*.
- Participation pour la partie traitant de génétique à l'ouvrage "L'élevage de la crevette tropicale d'eau douce" par J.M. Griessinger, D. Lacroix & P. Gondouin, IFREMER, 1991.
- Peeters L. and Diter A., 1994. Effects of impregnation on maturation, spawning, and moulting of female shrimp *Penaeus indicus*. *J. Exp. Zool.*, 269 : 522-530.
- Peeters P., Diter A., and AQUACOP, 1993. Effects of impregnation on maturation, spawning, and moulting in the shrimp *Penaeus indicus*. Second Ecuadorian Congress of Aquaculture, Guayaquil, 20-25 October 1993 (communication orale).
- Simon C., Dumont P., Cuende F.X., Diter A. and AQUACOP, 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaeus indicus* embryos. *Cryobiology*, 31 : 245-253.

9.2. Mémoires scolaires

- Chevallier F. 1991. Essais de cryoconservation d'algues unicellulaires d'intérêt aquacole. Mémoire de Brevet de Technicien Supérieur de la Mer, INTECHMER, Cherbourg, 54 p.
- Ducrocq M. 1992. Etablissement du caryotype de la crevette *Penaeus monodon*. . Mémoire de Brevet de Technicien Supérieur de la Mer, INTECHMER, Cherbourg, 31 p.
- Lo C. 1993. Cryoconservation du sperme de Loup Tropical (*Lates calcarifer*). Mémoire de DEA CGMiCLO, Université Française du Pacifique, Papeete, 54 p.
- Pécresse S. 1993. Etudes caryologiques chez la crevette *Penaeus monodon* (Fabricius). Mémoire de DEA CGMiCLO, Université Française du Pacifique, Papeete, 41 p.
- Folco S. 1995. Contribution à la révélation de marqueurs génétiques chez la crevette *Penaeus monodon*. Mémoire de DEA CGMiCLO, Université Française du Pacifique, Papeete, 33 p.
- Castany J. 1992. Induction de la tétraploïdie par choc thermique et contrôle du niveau de ploïdie par cytométrie numérique chez la crevette *Penaeus indicus*. Mémoire de DEA CGMiCLO, Université Française du Pacifique, Papeete, 42 p.
- Peeters L. 1990. Essai d'induction de la polyploïdie par traitement chimique chez la crevette *Penaeus indicus* (M. Edw.). Mémoire de DEA, Université Française du Pacifique, 46 p.
- Peeters L. 1996. Contribution à la connaissance de quelques mécanismes de reproduction et tentatives d'induction chimique de la tétraploïdie chez la crevette *Penaeus indicus* Milne Edwards (Crustacé, Décapode). Thèse de Doctorat de l'Université Française du Pacifique, Papeete, 146 p.

Taussat I. 1992. Recherche de marqueurs hypervariables chez la crevette pénéide. Mémoire de DEA, Université de Paris XI, 40 p.

9.3. Rapports internes

Diter A. 1991. Rapport de mission : IVth International Symposium on Genetics in Aquaculture (Wuhan, Chine). Formation aux techniques de banding (Montpellier), avril-mai 1991, 34 p.

Diter A. et P. Garen. 1993. Compte-rendu de mission au Bodega Marine Laboratory et au Segundo Congreso de Acuicultura. Rapport interne IFREMER, 19 p.

Grémy L. 1991. Initiation à la caryologie et à l'induction de la polyploïdie chez la crevette *Penaeus indicus*. Rapport interne IFREMER, 10 p.

Grevet G. 1992. Recherche de la glande androgène chez *Penaeus monodon*. Adaptation de techniques de coloration sur lames pour l'étude de la ploïdie par analyse d'images. Rapport interne IFREMER, 14 p.

Jousselin Y. 1992. Contribution à l'étude du déterminisme du sexe et des populations monosexes chez *Penaeus monodon*. Rapport interne IFREMER, 10 p.

Pécresse S. 1995. Manuel d'utilisation de la PCR pour l'étude des microsatellites chez les crevettes *Penaeus spp.* Rapport interne IFREMER, 26 p.

Simon C. 1991. Essai de mise au point d'un protocole de congélation d'embryons de crevettes. Rapport interne IFREMER, 43 p.

Vonau V. 1995. Rapport de stage au Laboratoire Génome et Populations (4/09/95 au 4/10/95). Rapport interne IFREMER, 18 p.

10. Références (extérieures à l'unité)

Beaumont A.R. and J.E. Fairbrother, 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J. Shellfish Res.*, 10 : 1-18.

Ihssen P.E., L.R. McKay, I. McMillan and R.B. Phillips, 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: Cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 119 : 698-717.

Demarly Y., 1963. Génétique des tétraploïdes et amélioration des plantes. *Ann. Amél. Plant.*, T. 13, 4 : 307-400.

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 *Chlamys varia*. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, 128 p.

Gaillard G. et A. Jaylet, 1975. Mécanisme cytologique de la tétraploïdie expérimentale chez le triton, *Pleurodeles waltlii* Michah. *Chromosoma*, 51 : 125-133.

Nagamine C., A.W. Knight, A. Maggenti and G. Paxman, 1980a. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapoda, Palaemonidae) with first evidence of induced feminization in nonhermaphroditic decapod. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41: 423-441.

Nagamine C., A.W. Knight, A. Maggenti and G. Paxman, 1980b. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41 : 442-457.

PROPOSITION DE PROGRAMME D'AMELIORATION GENETIQUE DES CRUSTACES

Ce document a été élaboré après une réflexion commune de l'équipe Aquacop et de H. Grizel. Les objectifs, au nombre de six, ont été définis à moyen terme (4-5 ans) et leur priorité (1 ou 2) a été fixée.

Objectifs à priorité 1

1) Obtention de cheptels stériles

La stérilité est recherchée à double titre, pour la protection de souches améliorées et pour le gain de croissance en période de maturation.

Le COP possède une souche de *P. stylirostris* qui a résisté jusqu'à présent aux différentes infestations expérimentales du virus de l'IHHN. Le marché de post-larves d'une telle souche serait considérable. Le développement de l'élevage de la crevette y est même totalement subordonné dans certaines régions comme le Mexique ou Hawaii. La vente de ces post-larves résistantes mais incapables de devenir des géniteurs serait une source de recettes pérenne.

D'autre part, *P. indicus* présente des performances de croissance en élevage intensif peu compatibles avec les impératifs de la production industrielle. Elle mature précocement, dès 7-8 g. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la stérilité sur la croissance chez cette espèce. De plus, ses capacités reproductrices et sa tolérance aux manipulations diverses en font un bon modèle d'expérimentation génétique.

La méthode de stérilisation retenue est l'induction de la triploïdie, pour les résultats satisfaisants qu'elle a apportés à la pisciculture et à la conchyliculture (aux États-Unis). Deux approches seront tentées simultanément pour la production de triploïdes : la suppression d'une division méiotique par un traitement des œufs et le croisement entre géniteurs diploïdes et tétraploïdes. Cette dernière voie est la plus séduisante pour la production de masse mais nécessite la constitution préalable d'un stock de reproducteurs tétraploïdes.

Il est difficile d'estimer l'amélioration subséquente étant donnée l'absence de précédent chez les Crustacés.

Cette étude se composera de 3 phases successives :

1- Mise au point des techniques d'induction de la triploïdie et de la tétraploïdie chez *P. indicus* (1991).

2- Transposition des techniques chez *P. stylirostris* et étude de la fertilité et des performances d'élevage chez les polyplœïdes de *P. indicus* (1992).

3- Même étude chez les polyplœïdes de *P. stylirostris* et vérification que la résistance à l'IHHN est conservée chez ces animaux (1993).

2) Création de populations monosexes femelles

Chez les crevettes péneïdes, la vitesse de croissance et la taille maximale sont généralement plus importantes chez la femelle. Parmi les espèces élevées, *P. monodon* (variété Fidji) est celle qui présente le dimorphisme sexuel le plus marqué. C'est donc pour cette espèce que le gain attendu est le plus fort. Le besoin de populations monosexes chez *P. monodon* est déjà ressenti par les professionnels (Philippines, Indonésie), puisqu'un marché s'ouvre pour les crevettes de grosse taille.

Le déterminisme du sexe est inconnu chez cette espèce. Son analyse constitue un préliminaire indispensable car le choix de la méthode d'obtention de population monosexue en dépend directement. Plusieurs méthodes d'analyse sont envisageables : recherche d'hétérochromosomes, étude de la sex-ratio dans des lignées uniparentales ou dans la descendance d'animaux sexuellement inversés. Elles requièrent des techniques différentes : parthénogenèse ou gynogenèse, androgenèse, opération chirurgicale, traitement hormonal. L'inversion sexuelle par opération chirurgicale (ablation et greffe de la glande androgène) a été retenue pour le démarrage du programme car elle pourra être rapidement maîtrisée en raison des nombreuses références chez divers Crustacés. Par la suite, une technique moins lourde à mettre en œuvre devra lui succéder pour assurer l'entretien de la souche.

Parallèlement, il convient de comparer les rendements de populations monosexes (triées manuellement) et mixtes aux conditions optimales d'élevage.

L'échéancier a été fixé comme suit :

1- Recherche de chromosomes sexuels, comparaison de rendements monosex/mixte et adaptation de la technique chirurgicale d'inversion du sexe (1991).

2- Testage sur descendance et recherche d'une méthode plus efficace que la greffe de glande androgène pour entretenir la souche (gynogenèse, inversion de sexe par traitement hormonal) (1992).

3- Constitution de la souche de géniteurs thélygènes (= engendrant des populations monosexes femelles) (1993).

3) Etude de la résistance à l'IHHN chez *P. stylirostris*

Le déterminisme de cette résistance devra être étudié pour garantir sa conservation. Après la vérification de la résistance de la souche du COP dans les régions d'élevage fortement infestées (1991), des croisements seront réalisés entre individus résistants et sensibles (1992-93). L'analyse de la ségrégation de la résistance dans la descendance apportera des informations sur son déterminisme. S'il est polygénique, un critère de quantification individuel de la résistance (par exemple une caractéristique quantitative de l'hémolymphe) serait précieux pour maintenir une pression de sélection en milieu sain. Une caractérisation du génome de cette souche et une comparaison avec des populations sensibles pourraient aussi s'avérer utile pour la compréhension du phénomène de résistance.

Action annexe

Cryoconservation de spermatophores et d'embryons de crevettes

Une banque de spermatophores et/ou d'embryons permettrait de travailler avec de petites quantités d'animaux de même origine (génétique ou autre), de posséder un témoin identique pour des expériences décalées dans le temps, de sélectionner des géniteurs après leur mort (sélection sur descendance ou massale sur un caractère mesuré après sacrifice), de conserver des génotypes particuliers (mutants), de faire voyager avec un risque limité d'importantes quantités d'animaux, etc...

Le stade embryonnaire le plus tolérant aux cryoprotecteurs a été défini.

L'échéancier suivant a été fixé :

1- Définition d'un éventail de concentrations de cryoprotecteur (DMSO) dans de l'eau de mer à différentes pressions osmotiques autorisant une fécondation correcte (conservation du

pouvoir collant et taux de fécondation satisfaisant) (1990-91). Les essais de congélation seront effectués avec cet éventail de solutions cryoprotectrices.

2- Etude de la perméabilité de l'enveloppe d'éclosion et de la membrane des embryons aux différents cryoprotecteurs testés. Elle permettra de choisir le meilleur cryoprotecteur intracellulaire (1990-91).

3- Définition d'un ou plusieurs mélanges de cryoprotecteurs (intra- et extracellulaire) sans effets délétères sur le développement embryonnaire (1991).

4- Etude des procédures de congélation et de décongélation des embryons et des spermatozoïdes (1991-92).

Objectifs à priorité 2

1) Constitution de souches d'animaux standards

La variabilité génétique individuelle représente une source de variation (souvent incontrôlée) dans les résultats expérimentaux. Ce "bruit de fond" d'origine génétique diminue la puissance des tests de comparaison et peut masquer certains effets que l'on cherche à mettre en évidence. Avoir à sa disposition des animaux standards (des clones) constitue un atout majeur dans nombre d'études tant en génétique (sélection, transfert de gène) qu'en pathologie, en physiologie, etc...

Plusieurs méthodes conduisent à la création de clones homozygotes (série de croisements entre apparentés ou d'autofécondations, gynogenèse, androgenèse) ou hétérozygotes (transfert nucléaire, croisement entre clones différents). A été retenue la création de lignées consanguines (homozygotes) par gynogenèse en raison de son efficacité théorique. La technique d'inactivation génétique du sperme sera travaillée après la mise au point de la fécondation *in vitro* (incitation n°1) et des traitements de suppression de division méiotique et mitotique (programme "triploïdes"). Ce programme sera mené sur l'espèce modèle *P. indicus*, avec l'échéancier suivant :

1- Mise au point d'une technique d'inactivation génétique du sperme (irradiation) et restauration de la diploïdie : création d'individus homozygotes (1992-93).

2- Vérification de l'homozygotie (marqueurs génétiques), sélection des géniteurs homozygotes les plus vigoureux et constitution de lignées pures (clones) (1993-94).

3- Etude des performances de ces lignées pures et valorisation de l'action de recherche (1994-95).

2) Influence de la densité spécifique d'élevage sur la croissance

Des essais d'élevage plurispécifique tendent à montrer que le facteur limitant la croissance d'une espèce est plus la densité de l'espèce considérée que la densité totale de crevettes.

L'objectif serait de mettre en évidence le mécanisme responsable de cette limitation pour l'inhiber.

Des expériences préliminaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse de travail (1991-92). Si la confirmation est apportée, la caractérisation du "signal de surdensité" (hormone, phéromone, ...) sera abordée (1993-95). La stratégie aboutissant à terme à la levée de cette inhibition sera définie alors en fonction des résultats. Les espèces étudiées seraient *P. monodon* et *P. indicus* qui semblent être les plus sensibles à la densité. Une collaboration avec un laboratoire de physiologie est souhaitée pour l'ensemble de ce programme.

Incitations

1) Fécondation *in vitro*

Maîtriser la fécondation *in vitro* permet de mélanger des ovules de plusieurs femelles et de les inséminer par du sperme de plusieurs mâles. Cette pratique accélère la mise au point de traitements de polyploïdisation en améliorant sensiblement la reproductibilité (la variabilité inter-ponte est moyennée au sein de chaque expérience). Elle élargit l'éventail des schémas de sélection applicables tout en augmentant l'efficacité de certains d'entre eux. Elle facilite aussi les essais d'hybridation interspécifique et autorise la reproduction uniparentale.

L'objectif est de concevoir un ou plusieurs milieux dans le(s)quel(s) :

- 1- les ovules puissent être conservés environ 1 heure sans qu'ils subissent de modifications compromettant leur fécondation et leur développement,
- 2- les spermatozoïdes conservent leur pouvoir fécondant,
- 3- la fécondation puisse se faire avec un taux de réussite au moins égal à celui d'une fécondation naturelle.

L'approche consistera à déterminer la composition ionique et éventuellement biochimique des liquides ovariens et testiculaires et à reconstituer des "milieux minimum". Le milieu de fécondation sera mis au point par approches successives en tenant compte de la composition des milieux précédents et de celle de l'eau de mer. Ce travail devrait être mené en 1991 en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie et de Physiologie du Développement, E.N.S., Paris. Le matériel biologique sera *P. indicus*, disponible à la fois au COP et en métropole (COB).

2) Etude du génome

La comparaison des génomes de crevettes *P. stylirostris* résistantes et sensibles à l'IHHN ne pourra pas être réalisée au COP. Une collaboration avec un laboratoire de génétique des populations est donc souhaitée. Ce laboratoire doit maîtriser les techniques d'analyse moléculaire du génome car une recherche de marqueurs génétiques plus variables que les systèmes enzymatiques (par exemple mini-satellites hypervariables) nous serait utile. Il sera en effet nécessaire de s'assurer de l'homozygotie totale des animaux gynogénétiques (besoin de nombreux marqueurs polymorphes). Par ailleurs, des méthodes assez fines d'estimation de la variabilité génétique peuvent s'avérer utiles pour le choix de programmes de sélection (sélection inter- ou intragroupe).

En tenant compte des échéanciers précédemment fixés, l'information apportée par ces techniques sera utile à partir de 1992.

Enfin, un effort minimum de recherche en zootechnie doit être maintenu pour que ces études soient menées dans les meilleures conditions et aboutissent à des produits de qualité, adaptés aux techniques d'élevage de demain.