

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité :
GENETIQUE

présentée

par **Alain DITER**

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse :

**REPRODUCTION UNIPARENTALE ET POLYPLOIDIE INDUITES
CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*) ET CHEZ LES
BIVALVES *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum*
ET *Chlamys varia*.**

TOME I (Texte)

Soutenu le 28 mai 1990

devant le jury composé de :

MM. J. GENERMONT	Président
D. CHOURROUT	Rapporteur
P. LUBET	"
D. ANXOLABEHERE	Examineur
H. GRIZEL	"

A Marie-Christine et Arnaud

A tous les miens

AVANT-PROPOS

Ce travail a débuté à l'INRA, au Laboratoire de Génétique des Poissons où j'ai reçu ma formation, et s'est poursuivi à l'IFREMER, au Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins.

Je suis très heureux de pouvoir exprimer ici ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué à ce travail en me prêtant leur compétence et leur soutien.

En premier lieu, je tiens à témoigner toute ma gratitude à Daniel Chourrout, Directeur du Laboratoire de Génétique des Poissons de Jouy-en-Josas. Il présida à ma formation de cytogénéticien et, plus généralement, de chercheur avec autant de rigueur que d'humour. Sa parfaite connaissance du sujet, sa disponibilité et son soutien chaleureux en firent un directeur scientifique remarquable. Je lui voue une profonde reconnaissance et une sincère amitié.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait M. Jean Genermont, Professeur de l'Université Paris XI, en acceptant de diriger ma thèse et de présider ce jury. Son enseignement et nos trop rares entretiens ont toujours été très enrichissants et comptent pour une bonne part dans la passion qu'a suscité en moi la recherche en génétique. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

J'adresse toute ma reconnaissance à Henri Grizel, Directeur du Laboratoire de Pathologie et de Génétique des Invertébrés Marins, pour la grande confiance et tous les moyens qu'il m'a accordés pour mener à bien la partie de ce travail chez les mollusques. En outre, il m'a fait profiter de son expérience et je le remercie vivement pour sa disponibilité et les conseils qu'il m'a prodigués.

Je suis très honoré de la présence parmi nous de MM. P. Lubet, Professeur de l'Université de Caen, et D. Anxolabéhère, Professeur de l'Université Paris VI. Ils apportent ici le regard critique d'un éminent malacologiste et d'un généticien spécialiste des invertébrés. Je leur suis extrêmement reconnaissant de leur travail d'évaluation.

Plusieurs chercheurs, dont les rencontres furent pour moi des plus enrichissantes, ont contribué à divers titres à l'aboutissement de ce travail. Parmi eux, Bernard Chevassus, aujourd'hui appelé à de hautes fonctions à l'INRA, m'a énormément apporté par sa

clairvoyance et ses vastes connaissances. L'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail, sa sollicitude et ses nombreux encouragements furent pour moi d'un grand réconfort. Je souhaite qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je garde un excellent souvenir de mon séjour au sein de cette équipe de généticiens des poissons qui m'a chaleureusement accueilli. J'en remercie chacun de ses membres et tout spécialement René Guyomard, qui guida mes premiers pas dans la recherche, et Edwige Quillet dont les conseils pertinents me furent d'une grande utilité.

Daniel Szöllösi, spécialiste du cytosquelette à l'INRA, est vivement remercié pour l'entretien riche d'enseignement qu'il m'a accordé.

Parmi les chercheurs de l'IFREMER à qui j'adresse ma vive reconnaissance, je retiens particulièrement :

Alain Bodoy, pour sa collaboration fructueuse lors du travail sur le pétoncle et ses encouragements constants et amicaux qui me furent précieux.

Dominique Chagot, dont la compétence en histologie m'a permis d'aborder l'étude de la gamétogenèse. Elle m'a aussi initié avec beaucoup de gentillesse aux techniques de photographie. Je suis très sensible à son soutien amical.

Serge Bougrier, pour son aide à différentes étapes de ce travail, ses conseils avisés, son soutien et une lecture constructive du manuscrit.

Cédric Bacher, pour ses avis pertinents en statistique, ses multiples "dépannages" en informatique et l'accueil toujours agréable qu'il a réservé à mes requêtes.

Ce travail doit aussi beaucoup à la contribution d'excellente qualité de plusieurs étudiants que je remercie vivement : Christian Dufy, Jérôme Baron et Christophe Ledu. Travailler avec eux fut pour moi aussi agréable qu'enrichissant. Je leur souhaite toute la réussite qu'ils méritent dans les nouveaux horizons qui sont désormais les leurs.

A ces remerciements, j'associe également "l'équipe éclosion" de La Tremblade, notamment Thierry Noël, compagnon de la première heure, et Pascal Phelipot pour leur aide efficace et le soutien moral de leur amitié, et l'équipe de la station d'Argenton, particulièrement Philippe Miner pour sa collaboration spontanée et sans réserves.

Sylvie Taillade a assuré la frappe de ce document, tâche ingrate, avec une compétence remarquable. Je lui en suis extrêmement reconnaissant.

Enfin, j'adresse mes vifs remerciements à l'IFREMER pour m'avoir octroyé une bourse de formation qui m'a permis de me consacrer à ce travail dans les meilleures conditions.

*"Qu'aucun oeil n'avait encore contemplées...
Tout le bonheur de la recherche tient en ces simples mots."*

Jean Rostand

RESUME

A des fins d'amélioration génétique, des méthodes d'induction de la gynogenèse, de l'androgenèse et de la polypléidie ont été développées chez la truite arc-en-ciel, l'huître creuse, la palourde japonaise et le pétoncle noir.

Chez la truite :

. l'androgenèse haploïde a été induite par un choc de pression appliqué sur des oeufs diploïdes, probablement au moment de la caryogamie. Leur insémination préalable par du sperme de mâle tétraploïde permet l'obtention directe d'individus androgénétiques diploïdes.

. un choc chaud capable de supprimer la première division mitotique de l'oeuf a été mis au point. Ce traitement permet la création de lignées gynogénétiques homozygotes (vérifiées par électrophorèse enzymatique), lorsqu'il est appliqué à des oeufs fécondés par du sperme irradié aux rayons ultraviolets. Il induit aussi la tétraploïdie lorsqu'il est appliqué à des oeufs diploïdes.

Chez les mollusques :

. L'induction de la triploïdie par un traitement des oeufs à la cytochalasine B a été mise au point chez la palourde et le pétoncle. La triploïdie ne diminue pas la vitesse de croissance larvaire. Elle provoque un retard de la gamétogenèse chez la palourde mais semble sans effet sur la sex-ratio.

. L'induction de la tétraploïdie a été tentée chez l'huître, par l'emploi d'un choc de pression, et chez la palourde, par l'emploi de la cytochalasine B. Les embryons tétraploïdes ainsi obtenus se sont révélés inviables. Cependant, le choc de pression pourrait être encore optimisé.

. La gynogenèse a été induite chez l'huître en inséminant les oeufs par du sperme irradié aux rayons ultraviolets. Un traitement de ces oeufs avec la cytochalasine B a permis la production d'embryons gynogénétiques diploïdes et tétraploïdes dont la viabilité reste à démontrer. Les mécanismes pouvant conduire à la tétraploïdisation d'oeufs gynogénétiques sont discutés.

Induced uniparental reproduction and polyploidy in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the bivalves *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* and *Chlamys varia*.

ABSTRACT : Methods of gynogenesis, androgenesis and polyploidy induction were developed with the aim of genetic improvement in the rainbow trout, the Pacific oyster, the Manila clam and the black scallop.

In the trout :

. haploid androgenesis was induced by means of a pressure shock applied on diploid eggs, probably at the time of karyogamy. Diploid androgenetic individuals were directly produced from eggs fertilized with sperm from tetraploid male.

. a heat shock treatment effective for suppressing the first egg mitosis was developed. This treatment allows the production of homozygous gynogenetic lines (checked using enzyme electrophoresis technique) from eggs inseminated with ultraviolet irradiated sperm. The treatment also induced tetraploidy in eggs normally fertilized by functional sperm.

In the molluscs :

. triploidy was induced by egg treatment with cytochalasin B in the Manila clam and the black scallop. Triploidy did not reduced the growth rate during the larval stages. In the Manila clam, gametogenesis was retarded by triploidy but the sex-ratio remained apparently unchanged.

. tetraploidy induction was attempted in the Pacific oyster using a pressure shock, and in the Manila clam by the use of cytochalasin B. Resulting tetraploid embryos proved to be inviable. However the pressure shock treatment could still be optimized.

. gynogenesis was induced in the Pacific oyster in eggs inseminated by ultraviolet irradiated sperm. Cytochalasin B treatments of these eggs resulted in diploid and tetraploid gynogenetic embryos. The viability of such individuals is not still established. Mechanisms which could lead to the tetraploidization of gynogenetic eggs are discussed.

INTRODUCTION

Les êtres vivants pluricellulaires se reproduisent selon un schéma presque universel : la fusion de deux gamètes haploïdes crée un individu diploïde, semblable à ses parents, et qui à son tour fabriquera des gamètes réduits. Cependant, nombreuses sont les espèces animales et végétales qui s'écartent, systématiquement ou temporairement de ce schéma établi.

Certaines se perpétuent par reproduction asexuée, voie privilégiée chez les végétaux mais empruntée aussi par des animaux inférieurs comme les Cnidaires. La reproduction uniparentale existe aussi chez les animaux plus évolués, sous divers aspects dont la parthénogenèse¹ et la gynogenèse² (Chourrout, 1982b). La polyploïdisation, quant à elle, a joué un rôle non négligeable dans l'évolution et la spéciation (Gorenflot et Raicu, 1980). Dans certains groupes, comme les Salmonidés on peut en déceler encore les traces ancestrales (May, 1980). La polyploïdie à l'état naturel est parfois associée, chez les plantes, les insectes, les mollusques, les poissons ou les amphibiens, à la parthénogenèse ou à la gynogenèse qui concourent à sa préservation (Gorenflot et Raicu, 1980 ; Chourrout, 1982b ; Thiriot-Quiévreux et al., 1989).

La première méthode d'induction d'un développement gynogénétique a été mise au point par Hertwig (1911), chez la grenouille *Rana fusca*. Cet auteur a obtenu des embryons gynogénétiques en inséminant des ovules avec du sperme fortement irradié par une source de radium. Hertwig a ainsi montré qu'un agent mutagène, utilisé à forte dose, peut inactiver totalement le génome d'un spermatozoïde sans altérer sa faculté d'activer le développement de l'oeuf. Cependant, ce type d'activation conduit à un individu haploïde, non viable chez les vertébrés.

Rostand (1934) montra comment produire des crapauds gynogénétiques viables. Il soumit à un refroidissement prolongé des oeufs de *Bufo vulgaris* fécondés par du sperme de *Rana temporaria*. Il obtint ainsi des larves de *Bufo vulgaris* alors que l'hybridation ordinaire est létale. Il en conclut que le choc froid

¹ Développement d'un oeuf sans l'intervention d'un spermatozoïde.

² Développement d'un oeuf sans contribution génétique paternelle, mais déclenché par un spermatozoïde. La gynogenèse et la parthénogenèse sont équivalentes sur le plan génétique.

avait provoqué à la fois l'exclusion du pronucléus mâle et le doublement du stock chromosomique d'origine maternelle. Rostand suggéra que le doublement de la contribution génétique maternelle était dû à la suppression de la seconde division de méiose, comme cela fut confirmé par la suite.

Peu après, la tétraploïdie fut induite chez les plantes par Blakeslee et Avery (1937), grâce à l'action antiméiotique de la colchicine. Depuis, l'arsenal d'agents physiques et chimiques, capables d'inactiver un génome ou de bloquer de façon réversible la division cellulaire, s'est considérablement enrichi. Les individus issus de ces manipulations se sont révélés très intéressants, en particulier pour l'amélioration des plantes, par les caractéristiques entièrement nouvelles dont ils étaient dotés. Ainsi des lignées de clones homozygotes ont été rapidement produites chez des espèces allogames par la voie de la reproduction uniparentale. Des blés plus tendres ont été obtenus grâce à l'augmentation du volume cellulaire dont s'accompagne généralement la polyploïdie. Pour atteindre des niveaux de consanguinité ou des progrès génétiques comparables, la voie classique des croisements dirigés nécessite des efforts et des moyens beaucoup plus importants. De plus, la polyploïdie a ouvert de nouvelles perspectives en accroissant la richesse allélique potentielle et en créant, dans certains cas, des individus stériles. Ainsi, la production de fruits triploïdes sans pépins illustre l'originalité de la contribution de ces manipulations dans le domaine de l'amélioration génétique.

Chez les animaux, les applications ont été plus rares et moins spectaculaires. En effet, chez les oiseaux et les mammifères, principaux animaux d'élevage, la gynogenèse, l'androgenèse³ et la polyploïdie sont létales. Mais, chez les poissons, ces manipulations ont été largement employées pour l'amélioration des performances d'élevage. Les travaux fondamentaux menés chez les amphibiens ont ainsi été remis à jour depuis la fin des années soixante. D'une part, la constitution de cheptels polyploïdes stériles a permis aux éleveurs de s'affranchir des effets indésirables liés à la reproduction. D'autre part, la création de lignées uniparentales a accéléré la production de populations monosexes et la mise en oeuvre de nouveaux schémas de sélection. Chez les mollusques d'intérêt économique, des solutions identiques ont été envisagées pour compléter les méthodes classiques d'amélioration génétique. La triploïdie a été induite dans

³ développement d'un oeuf sans contribution génétique maternelle.

les laboratoires depuis le début des années quatre-vingt. Elle est aussi, depuis quelques années, associée à la production industrielle de larves d'huîtres aux Etats-Unis.

Notre travail, chez la truite comme chez les bivalves, s'inscrit dans deux axes de recherche : d'une part, le contrôle de la reproduction par l'induction de la polyploïdie, d'autre part, la création de lignées consanguines par l'induction de la reproduction uniparentale. Ces essais de manipulations du stock chromosomique ont été conduits chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), l'huître creuse japonaise (*Crassostrea gigas*, Thunberg), la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*, Adams et Reeve) et le pétoncle noir (*Chlamys varia*, L.). Ces différentes espèces sont, sur le plan aquacole, de première importance, à l'exception du pétoncle qui pourrait aussi le devenir.

METHODES GENERALES
D'INDUCTION

Les manipulations du stock chromosomique reposent sur deux types d'opérations, parfois combinées : la destruction sélective d'un génome parental et l'inhibition d'une division cellulaire.

1. DESTRUCTION D'UN GENOME PARENTAL

Les agents conduisant à l'inactivation d'un génome parental sont multiples (rayons ionisants et ultraviolets, mutagènes chimiques) mais leur efficacité est variable.

Les rayons ionisants sont très pénétrants. Cette caractéristique, qui constitue leur atout principal, permet le traitement homogène d'un grand volume de sperme. Ils sont aussi utilisés pour induire l'androgenèse chez certaines espèces, comme les Salmonidés, dont la chromatine des ovocytes est protégée par un chorion opaque et une épaisse couche de vitellus. Toutefois, l'efficacité de ce type d'agent est incertaine. Des fragments de chromatine résiduels ont en effet été détectés, à maintes reprises, dans le caryotype d'individus gynogénétiques et androgénétiques issus de traitements optimisés (Chourrout, 1987).

Les rayons ultraviolets sont souvent préférés aux rayons ionisants en raison de leur facilité de mise en oeuvre et de leur très faible coût d'utilisation. De plus, ils conduisent à une inactivation complète du stock chromosomique. Mais ils possèdent un très faible pouvoir de pénétration. Pour assurer un traitement homogène, il est donc nécessaire de diluer le sperme dans un milieu approprié et de l'irradier en couche mince en l'agitant constamment (Chourrout, 1982b).

Les agents chimiques présentent le double avantage d'être utilisables aisément et de pouvoir traiter un grand volume de sperme. En revanche, ils peuvent inactiver le génome de façon incomplète ou avoir un effet toxique sur le développement des ovules, par l'intermédiaire du sperme traité (Chourrout, 1987).

2. SUPPRESSION D'UNE DIVISION CELLULAIRE

Chez les mollusques, les ovocytes pondus sont bloqués en fin de prophase ou en début de métaphase de méiose I (Longo, 1983). Les deux divisions de maturation sont donc facilement accessibles ainsi que les mitoses qui s'ensuivent. La quasi totalité des vertébrés pond des ovocytes bloqués en fin de seconde

division méiotique. Il est difficile, par conséquent, d'intervenir sur la première division de méiose chez ces espèces.

La rétention du premier ou du second globule polaire (GP1 ou GP2) par traitement antiméiotique conduit théoriquement à deux types de triploïdes ou de gynogénétiques. En effet, l'hétérozygotie, présente chez la mère à un locus donné, est transmise à la descendance lorsque la division réductionnelle pour ce locus est supprimée. Ainsi, par exemple, pour des loci proches du centromère (faible taux de post-réduction), le taux d'hétérozygotie sera théoriquement plus élevé chez les individus issus de la rétention du GP1. Plus généralement, les individus les plus hétérozygotes seront, en théorie, produits par l'inhibition de la première ou de la seconde division méiotique, selon la valeur* du taux moyen de post-réduction de l'espèce.

L'inhibition de la première division de segmentation de l'oeuf double le stock génétique initial en retenant ensemble les deux jeux de chromatides soeurs identiques (aux mutations près). Cette manipulation induit la tétraploïdie à partir d'oeufs diploïdes. Elle permet aussi la création d'individus diploïdes homozygotes à partir d'oeufs haploïdes gynogénétiques ou androgénétiques.

Parmi les nombreux inhibiteurs de la division cellulaire mentionnés dans la littérature, les plus efficaces sont les chocs de pression et de température (chaud ou froid) pour les mollusques et les poissons, et les traitements avec la cytochalasine B pour les mollusques (Allen, 1987a ; Chourrou, 1987b). Les chocs de température et de pression font disparaître le fuseau mitotique, empêchant ainsi la disjonction des chromosomes (Onozato, 1984 ; Hanocq-Quertier et al., 1987). La cytochalasine B (antibiotique d'origine fongique) n'altère pas le fuseau achromatique mais inhibe la cytodierèse en agissant sur l'anneau contractile (Schroeder, 1978).

* Les valeurs théoriques remarquables du taux de post-réduction sont précisées sur la figure 29.

PREMIERE PARTIE:
LA TRUITE

1. MANIPULATIONS DU STOCK CHROMOSOMIQUE CHEZ LES POISSONS

La maturation sexuelle s'accompagne généralement d'un ralentissement de la croissance, de mortalités et d'une diminution de la qualité organoleptique de la chair. La triploïdie a permis, en stérilisant plus ou moins complètement les animaux, d'éliminer ces effets indésirables. Chez les Salmonidés, si les femelles triploïdes conservent toute leur vie un phénotype immature (croissance continue), les mâles triploïdes présentent par contre des caractères sexuels secondaires marqués et les inconvénients qui y sont liés. La production de populations monosexes femelles triploïdes s'est donc avérée nécessaire (Chevassus, 1987).

Chez les poissons, la triploïdie est généralement induite par un traitement antiméiotique appliqué sur les ovocytes inséminés. Bien que ce type de traitement soit simple (choc thermique) et au point, un transfert de technique du laboratoire vers le milieu professionnel est rarement parfait. Les écarts au protocole engendrent des baisses de rendement du traitement et, par suite, un taux significatif d'individus diploïdes résiduels. Pour éviter cet inconvénient, une approche originale chez les poissons a été développée : l'obtention de triploïdes par le croisement de géniteurs diploïdes avec des tétraploïdes (Chourrout et al., 1986). De plus, ces nouveaux triploïdes présentent des performances supérieures ou égales à celles des triploïdes "conventionnels". Enfin, tout comme les diploïdes, les femelles génétiques* tétraploïdes peuvent être masculinisées par l'administration d'hormones stéroïdes. Ainsi, le croisement de ces individus avec des femelles diploïdes ordinaires permet directement la création de populations monosexes entièrement triploïdes.

Pour les schémas de sélection basés sur la variance génétique de dominance (recherche d'une hétérosis), la création préalable de lignées à forte consanguinité peut être nécessaire. En effet, le croisement entre lignées consanguines génétiquement distantes doit théoriquement engendrer des descendants aux performances supérieures à celles de la population de départ (Falconer, 1982). Cependant, ce type de schéma est souvent peu réaliste car les méthodes classiques de production de lignées consanguines sont très lentes : atteindre 95 % d'homozygotie nécessite 10 générations de croisements frère-soeur. La gyno-

* Chez les Salmonidés, le déterminisme génétique du sexe est du type femelle homogamétique (XX). Ces femelles sexuellement inversées sont appelées néomâles.

genèse diploïde obtenue par rétention du second globule polaire peut théoriquement augmenter rapidement la consanguinité. Chez les Salmonidés, cette méthode s'est avérée inadaptée en raison du fort taux d'hétérozygotie résiduelle observé dans les lignées gynogénétiques (Guyomard, 1984, 1986). Par contre, la gynogenèse diploïde induite par l'inhibition de la première mitose de l'oeuf permet d'atteindre 100 % d'homozygotie en une seule génération (Streisinger et al., 1981). L'androgenèse conduit théoriquement au même résultat. Ainsi, grâce à ces méthodes, ce type de schéma de sélection présente désormais un intérêt pratique chez les poissons.

La suppression de la première division mitotique de l'embryon a déjà été mise au point chez la truite arc-en-ciel, en utilisant un choc de pression (Chourrout, 1984 ; Onozato, 1984 ; Parsons et Thorgaard, 1985 ; Foisil, 1986). Cette technique est peu adaptée pour une utilisation à grande échelle car l'appareil, coûteux, ne permet de traiter qu'une faible quantité d'oeufs (de Salmonidés) à la fois. Les chocs de température sont évidemment plus facilement applicables mais se sont montrés jusqu'ici peu efficaces chez les Salmonidés (Thorgaard et al., 1981 ; Chourrout, 1982c ; Thompson et Purdom, 1986). Cependant, les excellents résultats obtenus chez le danio par Streisinger et al. (1981) ont révélé leur efficacité potentielle.

L'androgenèse a été obtenue jusqu'alors chez les Salmonidés en exposant les oeufs à des rayons gamma (revue de Chourrout, 1987a ; Thorgaard et al., 1990). Nous avons vu les inconvénients de ce type d'irradiation. D'autre part les rayons U.V. sont inutilisables car ils ne peuvent pénétrer le chorion et la couche de vitellus. Une méthode originale a été mise au point par Briedis et Elinson (1982), chez les amphibiens. Elle repose sur l'application aux oeufs normalement fécondés d'un choc de pression lors de la migration des deux pronucléus. Cette dernière s'achève normalement par la caryogamie. Le choc de pression endommage les microtubules du spermaste impliqués dans cette migration. Seul le pronucléus mâle participe au développement de l'oeuf. Cette méthode n'a pas encore été testée chez les poissons.

2. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Nos objectifs, qui s'inscrivent essentiellement dans le cadre de la création de lignées homozygotes, sont les suivants :

- supprimer la première division mitotique de l'oeuf à l'aide d'un choc chaud. Ce traitement doit conduire aussi bien à des lignées gynogénétiques homozygotes, dans le cas d'une insémination avec du sperme irradié (aux ultraviolets), qu'à des individus tétraploïdes, dans le cas d'une insémination avec du sperme intact. La mise au point de ce traitement a été entreprise sur la base des travaux préliminaires de Chourrout (1982c) qui avait vraisemblablement agi sur la seconde mitose.

- induire l'androgenèse haploïde en traitant des oeufs diploïdes intacts par un choc de pression au moment de la migration des pronucléus.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Prélèvement des gamètes et insémination

Les gamètes ont été prélevés sur des reproducteurs âgés de 3 ans, lors de leur première ou seconde période de reproduction. Trois souches ont été utilisées : la Gournay-Automnale-Tardive, la Printanière et une souche norvégienne sélectionnée (ponte hivernale). Les deux premières étaient entretenues depuis plusieurs générations à la pisciculture expérimentale de Gournay sur Aronde (Oise). Le dernier mois de gamétogenèse a eu lieu au laboratoire en eau partiellement recyclée. Seules les femelles ayant ovulé depuis moins d'une semaine ont été utilisées. Les gamètes, obtenus par pression abdominale, ont été recueillis dans des récipients secs et conservés sur la glace jusqu'à l'insémination. Des mélanges d'ovules (2 à 11 femelles) et de sperme (3 à 7 mâles) ont été constitués pour chacune des expériences d'optimisation des traitements. Les ovules ont été divisés en lots égaux (environ 300 oeufs) et simultanément inséminés puis recouverts d'un dilueur d'insémination artificielle (Billard, 1974). Dix minutes plus tard, les oeufs ont été plongés dans l'eau, thermorégulée à 10°C et recyclée. Cet instant, qui déclenche le développement, a représenté le temps zéro dans toutes les expériences. La suite de l'incubation s'est déroulée dans les mêmes conditions.

3.2. Irradiation du sperme

Le sperme a été dilué au 1/5ème dans un milieu minimum de liquide séminal (Billard, 1974). Ce diluant conserve le pouvoir fécondant du sperme en inhibant de façon réversible sa motilité. Cette suspension de sperme a été

exposée aux rayons ultraviolets, par fraction de 3 ml, pendant 4 mn, selon le protocole de Chourrout (1982a).

3.3. Choc thermique

Le dispositif expérimental était composé d'un bac de 50 l d'eau thermostatée par un thermoplongeur réglable. Celui-ci était équipé d'une pompe permettant d'homogénéiser en permanence l'eau du bac. Les bains ont ainsi été thermorégulés avec une précision de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Les oeufs ont été plongés, avec leur incubateur en PVC, dans l'eau chauffée à différentes températures, à plusieurs moments du développement et pendant des durées variables, en fonction des protocoles expérimentaux (tableau 1). Les lots ont été replacés en incubation, à 10°C , immédiatement après le traitement.

L'efficacité du choc a été appréciée par plusieurs indices :

a) La survie, déterminée au stade oëillé (environ 2 semaines de développement). Pour comparer plus aisément une expérience à l'autre, la survie des lots traités a été rapportée à celle du ou des témoins diploïdes (oeufs inséminés avec du sperme intact).

$$S = \frac{e}{W} \times \frac{W_T}{e_T} \times 100$$

$$S_T = \frac{e_T}{W_T} \times 100$$

S : survie relative du lot traité par rapport au(x) témoin(s) diploïde(s) (pourcentage).

e : nombre d'embryons vivants du lot traité.

W : nombre d'ovules inséminés du lot traité.

S_T : survie absolue du ou des témoins diploïdes (pourcentage).

e_T : nombre d'embryons vivants du ou des témoins diploïdes.

W_T : nombre d'ovules inséminés du ou des témoins diploïdes.

b) le taux de normalité, déterminé en même temps que la survie.

$$N = \frac{n}{e} \times 100$$

N : taux de normalité d'un lot donné (pourcentage).

n : nombre d'embryons vivants normaux du lot.

e : nombre total d'embryons vivants du lot.

Le taux de normalité n'a pas été rapporté au témoin car, contrairement à la survie, il est très constant dans les témoins d'une expérience à l'autre.

Un embryon a été considéré comme normal lorsqu'il ne présentait pas de "syndrome haploïde" caractérisé par des yeux petits et rapprochés et/ou le réseau sanguin du sac vitellin mal développé.

c) l'analyse caryologique des embryons au stade oeillé. Elle n'a été faite que sur les lots s'avérant intéressants, sur la base des deux précédents critères (survie et taux de normalité élevés). Elle a permis d'estimer la proportion d'individus porteurs d'un stock chromosomique doublé.

d) le taux d'éclosion, déterminé 1 ou 2 jours après l'éclosion. Comme la survie, le taux d'éclosion des lots traités a été rapporté à celui du ou des témoins diploïdes.

$$E = \frac{a}{W} \times \frac{W_T}{a_T} \times 100$$

$$E_T = \frac{a_T}{W_T} \times 100$$

E : taux d'éclosion relatif du lot traité par rapport au(x) témoin(s) diploïde(s) (pourcentage).

a : nombre d'alevins vivants du lot traité.

W : nombre d'ovules inséminés du lot traité.

ET : taux d'éclosion absolu du ou des témoins diploïdes (pourcentage).

aT : nombre d'alevins vivants du ou des témoins diploïdes.

WT : nombre d'ovules inséminés du ou des témoins diploïdes.

Les expériences 1 à 5 (tableau 1) étaient destinées à la mise au point d'un traitement antimitotique efficace sur des oeufs gynogénétiques. L'expérience 6 a été conçue pour s'assurer que le traitement était aussi efficace pour induire la tétraploïdie (sperme intact) que la gynogénèse diploïde (sperme irradié) (fig. 1).

Enfin, au cours des quatre autres expériences, des familles gynogénétiques diploïdes ont été créées à partir de 13 femelles au total, croisées individuellement avec l'un des quatre mâles utilisés. Chaque ponte a été divisée en 4 lots. L'un, inséminé avec du sperme non traité, a servi de témoin diploïde. Les trois autres ont été inséminés par le même sperme irradié. L'un d'eux a subi le choc, plus ou moins optimisé, supprimant la première mitose. Un autre a été traité pendant 20 mn, à 26,5°C, après 25 mn de développement. Ce traitement, mis au point par Chourrout et Quillet (1982), a produit des gynogénétiques diploïdes par rétention du second globule polaire. Le dernier lot, non traité, a servi de témoin (haploïde) pour l'irradiation du sperme. L'homozygotie des gynogénétiques obtenus par le traitement antimitotique a été vérifiée par électrophorèse enzymatique sur la famille présentant le plus de survivants en fin de résorption vésiculaire.

3.4. Choc de pression hydrostatique

L'appareil hyperbare, conçu par l'IFREMER, se compose d'une éprouvette métallique, recevant les oeufs, dans laquelle pénètre un piston ajusté qui transmet la pression d'une pompe hydraulique (fig. 2). La montée en pression, jusqu'à 10 000 psi (1 psi = 0,07 atm), s'effectue en 3 à 4 secondes. La décompression est instantanée. Peu pratique à régler, la pression de travail n'a été changée que d'une expérience à l'autre.

Cinq expériences d'approche d'un traitement induisant l'androgénèse ont été menées. Elles ont couvert des moments d'application allant de 1 h à 2 h 20 après fécondation, pour des pressions de 7 500 à 9 500 psi exercées pendant 2, 4 ou 6 mn (tableau 2). Un témoin haploïde a été constitué avec du sperme irradié et un témoin diploïde avec du sperme normal. Les lots examinés en caryologie ont été choisis en fonction de la survie et du taux d'anomalie ($A = 100 - N$; cf N au

paragraphe 3.3.), autrement dit du pourcentage d'individus porteurs du "syndrome haploïde". Le témoin haploïde a servi de référence pour la reconnaissance de ce syndrome. Le pourcentage d'haploïdes parmi les embryons vivants au stade oeillé, estimé par caryologie, a constitué le critère de réussite du traitement.

La dernière expérience a été conçue pour apporter un argument en faveur de la nature androgénétique des haploïdes obtenus. Les ovules d'une seule femelle (la dernière disponible dans la souche Printanière) ont été répartis en deux séries, inséminées l'une avec un mélange du sperme de 6 mâles diploïdes, l'autre avec un mélange du sperme de 6 mâles tétraploïdes (fig. 3). Chaque lot a été, de plus, divisé en duplicats indépendamment fécondés, traités et incubés. Le choc, durant 6 mn à 7 500 psi, a été appliqué 1 h 40, 2 h ou 2 h 20 après fécondation sur chaque série dupliquée. Les témoins ont été réalisés avec les deux types de spermes non traités.

3.5. Caryologie

Les préparations chromosomiques ont été effectuées à partir d'embryons âgés de 9 à 15 jours, d'après la technique de Chourrout et Happe (1986). Le protocole est détaillé dans le tableau 14. Les pourcentages de polyploïdes ou d'haploïdes ont été estimés en étudiant 10 à 60 individus. Pour chacun d'eux, les chromosomes de 5 à 10 métaphases ont été comptés.

En raison du polymorphisme Robertsonien observé chez la truite arc-en-ciel, le nombre chromosomique varie de 58 à 64 (Thorgaard, 1983 ; Chourrout et Happe, 1986).

3.6. Electrophorèse enzymatique

Cette technique a été employée pour prouver l'origine gynogénétique mais surtout l'homozygotie des alevins issus d'oeufs fécondés avec du sperme irradié et traités par un choc chaud tardif (3 h 40).

Les alevins des familles gynogénétiques ont été sacrifiés en fin de résorption vésiculaire pour l'analyse électrophorétique. Une seule famille a présenté un nombre d'alevins suffisant pour permettre l'étude (18 individus).

Cette famille est issue du croisement entre la femelle n° 2 et le mâle A. Celui-ci a été abattu pour déterminer son génotype aux loci étudiés chez les alevins.

L'analyse des alevins des témoins diploïdes, typés pour les mêmes loci, a permis de déduire le génotype de la mère et, par conséquent, ceux attendus chez ses descendants gynogénétiques. Les alevins ont été analysés à la fin de la résorption vésiculaire, environ 1 mois après l'éclosion. Ils pesaient alors 100 mg.

Un certain nombre de systèmes enzymatiques rencontrés chez l'adulte sont absents ou, du moins, indétectables chez l'alevin. Un précédent travail avait nécessité la recherche de systèmes polymorphes aisément révélables chez le jeune alevin (Diter, 1985). Cinq de ces systèmes ont été étudiés ici : la créatine phosphokinase (CPK), l'isocitrate déhydrogénase (IDH), la malate déhydrogénase (MDH), la phosphoglucomutase (PGM) et la superoxyde dismutase (SOD).

La technique de préparation du gel d'amidon et les protocoles électrophorétiques ont été décrits par Guyomard et Krieg (1983). Les tampons et les conditions de révélation des différents systèmes ont été adaptés de ceux de Allendorf et al. (1977) et de May (1980). Le système uniforme de nomenclature proposé par Allendorf et Utter (1978) a été utilisé pour tous les loci et allèles.

3.7. Analyse des données

Les données ont été traitées et les figures ont été tracées avec le logiciel STATGRAPHICS.

3.7.1. Taux d'hétéroïdes ou de gynogénétiques

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

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

3.7.2. Survie et taux d'anomalie et de normalité

Pour la mise au point de l'androgenèse, chez la truite, les effets de la pression, de la durée et du moment d'application du choc (et des interactions entre ces facteurs) sur la survie et le taux d'anomalie ont été analysés en modèle log-linéaire. La différence entre deux modèles hiérarchiques successifs a été testée par le test G (Sokal et Rohlf, 1981). Le degré d'association entre les deux variables a été mesuré par le coefficient r de corrélation des rangs de Spearman (1904). Dans la dernière expérience, utilisant des mâles diploïdes et tétraploïdes, les effets des traitements et du niveau de ploïdie des mâles ont été étudiés par une analyse de variance à deux facteurs, appliquée aux pourcentages de survie absolue après transformation angulaire classique ($\text{arc-sin} \sqrt{x/100}$).

Dans les autres expériences de mise au point d'un traitement, les survies et les taux d'anomalie ou de normalité ont été comparés par le test de χ^2 .

4. RESULTATS

4.1. Induction de l'androgenèse

Ce travail se divise en deux parties : la recherche d'un traitement hyperbare produisant la plus forte proportion d'individus haploïdes et la démonstration de la nature androgénétique de ces derniers.

4.1.1. Recherche d'un traitement efficace

L'efficacité du traitement a été appréciée par le pourcentage d'haploïdes produits, estimé après examen chromosomique. Cette technique, ne pouvant être appliquée à chacun des lots du plan d'expérience, seuls ceux présentant un fort taux d'anomalie et une survie satisfaisante ont subi l'examen caryologique.

4.1.1.1. Taux d'anomalie et survie

Des taux d'anomalie proches de 100 % ont été enregistrés mais toujours dans le cas de survies très faibles au stade oeillé (environ 5 %, tableau 3). Les valeurs moyennes de ces deux critères semblent évoluer assez régulièrement en fonction de la durée et du moment du choc (tableau 4). Les

chocs durant 6 mn et ceux appliqués 2 h 20 après fécondation sont en moyenne les plus efficaces. L'effet du facteur pression paraît moins net, bien que la valeur 8 500 psi présente un taux d'anomalie moyen double de celui des autres.

Cependant, on ne peut déduire de ces moyennes les paramètres du traitement le plus efficace puisque l'analyse du modèle log-linéaire révèle une interaction hautement significative entre les 3 paramètres étudiés, tant pour le taux d'anomalie ($G = 238,4$; $ddl = 24$; $P < 0,0001$) que pour la survie ($G = 206,2$; $ddl = 32$; $P < 0,0001$).

4.1.1.2. Pourcentage d'haploïdes

Parmi les 72 traitements testés, 18 ont fait l'objet d'une étude caryologique. Neuf de ces derniers ont produit des embryons haploïdes, mais en proportion relativement faible (tableau 5). Deux traitements se sont révélés nettement supérieurs aux autres en induisant près de 40 % d'haploïdes. On observe une certaine concordance des résultats puisque ces optima ont été obtenus par un choc identique de 6 mn à 7 500 psi, appliqué 2 h 00 ou 2 h 20 après fécondation. Ces deux lots ont présenté des survies comparables à celle de leur témoin haploïde (tableau 3).

Des aneuploïdes, presque tous hypodiploïdes (révélateurs de traitements suboptimaux), ont été observés dans la moitié des lots. On peut noter aussi la présence de triploïdes dans des lots traités à 1 h 00 et 1 h 20, notamment dans le lot 9 000 psi-6mn-1 h 00 qui en contenait 86,7 %.

Parmi les 5 lots témoins, seul celui de l'expérience à 7 500 psi contenait des haploïdes (4,1 %).

4.1.1.3. Associations entre taux d'anomalie, survie et pourcentage d'haploïdes

Les deux premiers critères semblaient liés, notamment au vu des moyennes (tableau 4), puisqu'aux taux d'anomalie élevés correspondaient généralement des survies faibles. Leur degré d'association a été mesuré sur 56 couples. Le coefficient de corrélation des rangs, négatif et significativement différent de 0 met en évidence une association inverse entre A et S (tableau 6).

Il était intéressant aussi de connaître le degré d'association entre le pourcentage d'haploïdes (non nul) et le taux d'anomalie ou la survie. Le calcul de r , sur 8 et 9 couples, a montré qu'il n'existe pas de telles associations, ou qu'elles sont trop faibles pour être détectées (tableau 6).

Enfin, une association a été recherchée entre le pourcentage d'haploïdes et une combinaison simple des deux critères : A x S. Elle n'a pas non plus été mise en évidence (tableau 6).

4.1.2. Recherche de l'origine parentale des haploïdes

Le sperme de mâles tétraploïdes a été utilisé parallèlement à celui de mâles diploïdes afin de déduire l'origine des haploïdes précédemment obtenus. Le traitement supposé efficace, durant 6 mn à 7 500 psi, a été appliqué 1 h 40, 2 h 00 ou 2 h 20 après fécondation, aux deux types d'oeufs, chacun divisé en 2 réplicats. Tous les lots ayant subi un examen caryologique, il n'était pas nécessaire de relever le taux d'anomalie, par ailleurs sans objet dans les lots issus de tétraploïdes. Seule la survie a été enregistrée (tableau 7).

4.1.2.1. Survie

L'analyse de variance à 2 facteurs appliquée à la survie (après transformation angulaire) a mis en évidence un effet significatif du niveau de ploïdie paternelle ($F(1,8) = 673,2$; $P < 0,001$) et du moment d'application du traitement ($F(3,8) = 7,38$; $P < 0,025$). Les témoins ont été considérés comme l'une des modalités du facteur moment d'application. De plus, l'interaction entre ces 2 facteurs est significative ($F(3,8) = 7,14$; $P < 0,025$).

Pour expliciter cette interaction, deux analyses de variance à 1 seul facteur (moment d'application) ont été conduites, l'une sur les lots issus des mâles diploïdes, l'autre sur ceux issus des mâles tétraploïdes. Il a été ainsi mis en évidence l'effet significatif de ce facteur dans le cas des pères diploïdes ($F(3,4) = 8,88$; $P < 0,05$) mais pas dans celui des pères tétraploïdes ($F(3,4) = 0,365$; N.S.). Dans le premier cas, les comparaisons individuelles, au risque global de 5 %, ont permis le classement des moments suivants : 2 h 20 < 2 h 00 = 1 h 40 < témoin.

La survie des lots issus de tétraploïdes représente en moyenne 53 % de celle des lots issus de diploïdes.

4.1.2.2. Examen caryologique

Pour les deux types de sperme, les témoins sont conformes aux niveaux de ploïdie attendus (tableau 7).

- Pères diploïdes : un seul embryon haploïde a été trouvé parmi les 90 individus traités. Quelques aneuploïdes hyperdiploïdes ont été observés dans les lots 1 h 40 et 2 h 00. Le traitement à 2 h 20 n'a pas affecté l'état diploïde des oeufs. Aucun triploïde ni tétraploïde n'a été détecté.

- Pères tétraploïdes : seul le traitement à 2 h 00 a produit les diploïdes attendus, mais ceux-ci ne représentaient que 10 % des embryons examinés. Dans ce même lot a été relevé un aneuploïde hypotriploïde. On peut noter la présence d'un tétraploïde dans chacun des deux autres lots traités. Enfin, aucun haploïde n'a été observé.

4.2. Inhibition de la première mitose

L'optimisation du choc chaud inhibant la première mitose de l'oeuf a été réalisée sur des individus gynogénétiques. Cette méthode a permis d'utiliser le taux de normalité et la survie comme premier crible, le critère décisif restant le taux de diploïdisation résultant de l'examen caryologique des lots retenus.

Les traitements les plus efficaces ont ensuite été appliqués, d'une part, à des oeufs normaux diploïdes (tétraploïdisation), d'autre part, aux oeufs gynogénétiques haploïdes (diploïdisation).

Enfin, des familles gynogénétiques ont été produites. L'efficacité du choc et les survies à l'éclosion ont été mesurées. Leur degré d'homozygotie a été estimé par électrophorèse enzymatique.

4.2.1. Mise au point du traitement

Les deux premières expériences étaient destinées à cerner une plage de moments efficaces avec les températures optimales testées jusqu'alors

par Chourrout (1980, 1982c). Pour des températures de 29 à 30°C, l'efficacité a été maximale entre 3 h 20 et 4 h 00 après fécondation (fig. 4). C'est dans cet intervalle qu'ont été optimisés les 2 autres paramètres, température et durée.

Dans l'expérience 1, le lot "3h20-14 mn", semblant le plus intéressant, a été examiné en caryologie. Il contenait 49 % d'embryons diploïdes, contre 5 % dans le témoin gynogénétique (tableau 8). Globalement, 88 % des individus normaux (29/33) et 10 % des anormaux (8/81) étaient diploïdes. La différence de fréquence de diploïdes entre ces deux catégories d'embryons est significative ($\chi^2 = 65,17$; 1 ddl ; $P < 0,001$). Ainsi le taux de normalité semble constituer un bon critère précoce pour apprécier l'efficacité d'un traitement.

L'expérience 3 a montré l'interaction entre les paramètres température et durée. Plus la température est élevée, plus la durée létale est courte (fig. 5). Il semble que les températures efficaces soient supérieures à 29,5°C.

L'expérience 4 a permis de tester les hautes températures (30 à 33°C) avec une durée de 5 mn, choisie d'après les précédents essais. Cette durée semble létale (ou sublétale) pour les températures supérieures ou égales à 32°C (fig. 6a), ce qui confirme les résultats de l'expérience 3. D'une façon générale, la survie décroît quand la température augmente. On note un maximum de survie à 31°C pour les traitements à 3h20 et 3h40. Le taux de normalité augmente avec la température sauf pour les traitements à 4h00. L'étude caryologique des quatre lots présentant les plus forts taux de normalité révèle une efficacité croissante des traitements avec la température (fig. 6b). L'optimum a été obtenu avec le traitement "31,5°C - 3h40" qui a produit 100 % d'individus diploïdes (31/31), avec une survie relative de 50 % au stade oeillé. La légitimité du critère de normalité est confirmée car la proportion de diploïdes est significativement plus élevée parmi les individus normaux que parmi les anormaux ($\chi^2 = 10,01$; 1 ddl ; $P < 0,01$). Des embryons mosaïques haplo-diploïdes ont été produits par les traitements les plus tardifs (4h00). La présence de ce type d'individu peut s'expliquer par la suppression de la seconde division mitotique, dans l'un seulement des deux blastomères de l'embryon.

Les chocs de 32°C, testés dans l'expérience 5, ont été efficaces uniquement pour la durée de 4 mn et quelque soit le moment d'application (3h20 à 4h00). Les survies, 25 à 45 % (fig. 7a), ont été du même ordre que pour les

traitements à 31,5°C pendant 5 mn (fig. 6a). Par contre, les taux de normalité ont été plus élevés : 45 à 80 %. Les pourcentages globaux de diploïdes ont été proches de 100 % sauf pour le moment 3h40 (79 %) où des haploïdes résiduels ont été observés (fig. 7b).

Les taux d'éclosion rapportés au témoin diploïde ont varié de 4 à 20 %, dans les lots issus des traitements les plus efficaces (tableau 9).

4.2.2. Induction de tétraploïdes

Le même traitement (durant 5 mn à 31°C) a été appliqué à 3 h 20, 3 h 40 ou 4 h 00, d'une part à des oeufs fécondés avec du sperme irradié (diploïdisation), d'autre part à des oeufs fécondés avec du sperme intact (tétraploïdisation).

Une ANOVA à 2 facteurs (type de sperme et moment d'application) a été appliquée à la survie relative après transformation angulaire.

Les traitements ont été plus efficaces pour l'induction de la tétraploïdie que pour la diploïdisation des oeufs gynogénétiques. En effet, d'une part, le pourcentage d'embryons dont le génome a été doublé est identique quelque soit le type de sperme employé ($\chi^2 = 2,14$; 3 ddl ; $P > 0,5$) (fig. 8a). D'autre part, la survie des lots issus d'une fécondation avec du sperme intact est supérieure de 33 % en moyenne à celle des autres lots ($F(1,6) = 60,78$; $P < 0,001$) (fig. 8b). Par conséquent, si l'on s'intéresse au pourcentage d'individus dont le génome a été doublé par rapport au nombre initial d'ovules, c'est-à-dire si l'on prend en compte la survie, le rendement est nettement supérieur avec le sperme intact qu'avec le sperme irradié (plus du double, fig. 8a).

On peut noter que le moment d'application a eu un effet significatif sur le rendement du traitement ($\chi^2 = 208,7$; 4 ddl ; $P < 0,001$) alors qu'il n'a pas eu d'effet sur la survie au stade oeillé ($F(2,6) = 1,25$; $P > 0,05$).

4.2.3. Familles gynogénétiques

Le choc chaud tardif a été de 30°C pour les 4 premières familles (mâle A) et de 31°C pour les 9 autres. Dans tous les cas, il a été appliqué 3h40 après la fécondation et a duré 5 mn. Tous les géniteurs appartenaient à la souche

norvégienne. Des lignées gynogénétiques ont été produites parallèlement, par rétention du second globule polaire, pour servir de référence (gynogenèse conventionnelle).

4.2.3.1. Taux d'éclosion

Les taux d'éclosion des lignées "choc tardif" ont été inférieures à 5 % du témoin pour le choc à 31°C et ont atteint 15-16 % du témoin pour le choc à 30°C (tableau 10). Dans tous les cas, ils ont été très inférieurs à ceux des lignées "choc précoce". Ces dernières et les témoins ont présenté des taux d'éclosion plus faibles que ceux habituellement enregistrés dans les autres souches.

4.2.3.2. Examen caryologique

Les pourcentages de réussite des traitements ont été extrêmement variables.

Le choc à 30°C a fourni de 0 à 10 % de diploïdes (fig. 9). Les 26 % enregistrés dans la famille n°3 n'ont pas été pris en compte car 16 % des ovules étaient diploïdes (éclosion d'alevins normaux dans le témoin haploïde de cette femelle et confirmation caryologique de leur diploïdie).

Le choc à 31°C a produit entre 10 et 100 % d'embryons diploïdes (fig. 9). Seulement 3 des 9 familles ont présenté des haploïdes résiduels (26 à 59 %). Quelques tétraploïdes et aneuploïdes hyperdiploïdes, et jusqu'à 31 % de mosaïques haplo-diploïdes ont été observés. Deux autres femelles (n° 8 et n° 11) ont engendré des ovules diploïdes (peut-être non-réduits) mais à une fréquence plus faible que la femelle n° 3 (7 % et 1,3 %). Les tétraploïdes observés dans la famille n° 8 (19 % des embryons, soit 6 % des ovules) pourraient correspondre aux ovules "non-réduits" (7 %). Dans la famille n°11, le pourcentage d'ovules "non-réduits" ne grève pas significativement le pourcentage de réussite du traitement estimé au stade oeilé (100 %). On peut donc prendre en compte ces fratries en ce qui concerne les rendements. Par contre, leur taux d'éclosion étant du même ordre que celui de leur témoin haploïde, ces 2 familles n'ont pu être utilisées pour prouver l'homozygotie de ces individus gynogénétiques.

Les 20 individus examinés dans chacun des 4 lots témoins (1 par mâle) étaient tous haploïdes, ce qui confirme l'irradiation correcte des 4 spermes.

4.2.3.3. Analyse des allozymes

La famille n°2 a été analysée. C'était la seule qui comptait un nombre significatif de survivants à la fin de la résorption vésiculaire (18 seulement).

Cinq systèmes enzymatiques réputés polymorphes et s'exprimant chez les alevins ont été étudiés : CPK, IDM, MDH, PGM et SOD. L'un des loci était homozygote pour le même allèle chez les deux parents (CPK).

La confrontation du génotype paternel avec les fréquences génotypiques observées chez les descendants témoins ont permis de déduire, sans ambiguïté, le génotype de la femelle pour les loci présentés (tableau 11).

Parmi le lot gynogénétique, un individu a présenté, à 2 loci, un génotype hétérozygote identique aux témoins.

Les 17 autres individus, homozygotes pour tous les loci étudiés, n'ont présenté que les allèles présents chez la mère. Leur origine gynogénétique ne fait donc pas de doute.

5. DISCUSSION

5.1. Induction de l'androgenèse

5.1.1. Le traitement

Les résultats sont encourageants dans la mesure où des embryons haploïdes ont bien été produits en soumettant des oeufs diploïdes à un choc de pression. Cependant, les rendements sont assez faibles: au mieux, 40 % des embryons vivants au stade de l'examen sont haploïdes. En outre, les traitements ne sont pas reproductibles puisqu'ils ont été presque totalement inefficaces lors du second test. Cet échec peut être imputé à une différence de sensibilité ou, plus vraisemblablement, à un décalage de la fenêtre de sensibilité entre la souche

utilisée pour la mise au point et celle employée pour le second test. Un effet particulier de l'unique femelle utilisée lors de cette dernière expérience n'est pas non plus à exclure.

La mise au point de ce type de traitement est laborieuse car l'interaction entre les 3 paramètres à optimiser nécessite un plan d'expérience factoriel comportant de nombreux lots. De plus, les 2 critères, taux d'anomalie et survie, pris individuellement ou combinés, constituent un crible peu efficace. Cependant, il est matériellement impossible d'examiner tous les lots en caryologie et ces deux critères macroscopiques représentent le seul crible disponible.

Les paramètres des meilleurs traitements sont aux limites des valeurs testées : durée la plus longue, pression la plus basse, moments les plus tardifs. Il est donc possible que le traitement optimum virtuel se situe au-delà de ces limites. On peut toutefois noter qu'un choc de même intensité (7 500 psi durant 6 mn) s'est révélé être un optimum pour l'inhibition de la première mitose chez la truite arc-en-ciel (Foisil et Chourrout, *in* Chourrout, 1987b).

5.1.2. L'origine parentale du génome haploïde.

Plusieurs méthodes de mise en évidence de l'androgenèse sont envisageables. Des caractères morphologiques à déterminisme génétique de type mendélien ont été largement employés chez les poissons comme marqueurs de gynogenèse (revue par Chourrout, 1987b) ou d'androgenèse (Scheerer et al., 1990). Le gène majeur dominant "golden" responsable d'une dépigmentation chez la truite arc-en-ciel en est un exemple. Un tel gène, à l'état homozygote chez les mères, aurait permis, par sa présence chez les alevins, de déceler une contribution génétique maternelle. Il aurait ainsi constitué à la fois un crible efficace pour l'optimisation du traitement et un argument en faveur de la nature androgénétique des haploïdes produits (si les haploïdes de génotype golden s'avèrent dépigmentés). Cet argument n'est toutefois pas décisif car un seul gène ne saurait représenter l'ensemble du génome. Le nombre de ces marqueurs connus est restreint et aucun géniteur adéquat n'était disponible au moment de l'étude.

L'utilisation de loci enzymatiques polymorphes comme marqueurs de gynogenèse (revue par Chourrout, 1987b) ou d'androgenèse (May et al., 1988 ;

Scheerer et al., 1990) est aussi très répandue. Cette méthode, basée sur le même principe que la précédente, la complète efficacement en étant beaucoup plus informative lorsque les loci sont nombreux et génétiquement indépendants. Cependant, cette technique requiert des individus ayant nettement dépassé le stade de l'éclosion. Elle est aussi relativement laborieuse et ne peut s'appliquer qu'à un nombre limité de descendants.

L'utilisation du sperme de mâle tétraploïdes était originale au moment du travail. Récemment, Thorgaard et al. (1990) ont aussi employé ce type de sperme, pour améliorer la survie d'androgénétiques diploïdes. Ici, cette méthode visait à révéler l'origine parentale des haploïdes précédemment produits. Reposant sur l'analyse caryologique des descendants, elle apporte une réponse beaucoup plus rapidement que les deux premières méthodes et est relativement fiable. Ces spermatozoïdes diploïdes, fécondant des ovules haploïdes, engendrent, sans autre intervention, une descendance triploïde (témoin). Si le traitement induit la gynogenèse (jusqu'alors cette hypothèse n'était pas infirmée), au moins une fraction de la descendance doit être haploïde. S'il induit l'androgenèse, des descendants diploïdes doivent être observés.

Des diploïdes ont bien été produits et aucun haploïde n'a été détecté parmi les descendants de tétraploïdes. Il semble donc qu'un choc hyperbare, appliqué entre la seconde division de méiose et la première mitose de l'oeuf, puisse induire un développement androgénétique chez la truite arc-en-ciel, comme c'est le cas chez la grenouille (Briedis et Elinson, 1982). Cependant, en raison de la faible efficacité du traitement lors de cette expérience (10 % au mieux), cette hypothèse devra être confirmée, grâce à l'emploi de marqueurs enzymatiques, par exemple.

Notons que l'emploi de géniteurs tétraploïdes semble favoriser l'induction de l'androgenèse, chez la truite arc-en-ciel. Le croisement entre femelle diploïde et mâle tétraploïde peut engendrer spontanément des diploïdes dans des proportions comparables à celles que nous avons obtenues (Chourrout et al., 1986). Cependant, dans notre expérience, le lot témoin ne comportait que des triploïdes. Par ailleurs, l'application d'un traitement antiméiotique (choc chaud) sur des ovules de femelles tétraploïdes, inséminés par du sperme de mâles diploïdes ou tétraploïdes, conduit à une forte proportion d'embryons respectivement haploïdes ou diploïdes (environ 30 % en moyenne) probablement d'origine androgénétique (Chourrout et Nakayama, 1987).

5.1.3. Intérêt du sperme de tétraploïde

La survie plus faible des individus issus de mâles tétraploïdes correspond à la chute du taux de fécondation observée par Chourrout et al. (1986) et Blanc et al. (1987). Un certain nombre d'arguments ont permis à ces premiers auteurs d'attribuer ce phénomène à un blocage purement mécanique de la tête trop large du spermatozoïde diploïde dans le canal du micropyle. Cette baisse de rendement n'est cependant pas préjudiciable étant donnée la grande fertilité de ces animaux.

L'intérêt du sperme de tétraploïde, associé à l'androgenèse est multiple. Evitant le traitement de restauration de la diploïdie, il améliore la survie des androgénétiques diploïdes (Thorgaard et al., 1990). En outre, il produit des truites androgénétiques fortement hétérozygotes en raison du mode de ségrégation des tétraploïdes (Diter et al., 1988). Cette originalité autorise la conservation de souches non consanguines par la congélation du sperme. Ceci nécessiterait au préalable la tétraploïdisation des souches à conserver. La ségrégation des déterminants sexuels chez les truites tétraploïdes est telle que leurs descendants androgénétiques devraient être presque exclusivement mâles (Chourrout et al., 1986). Cette fertilité réduite, à l'échelle de la population, peut présenter un inconvénient si l'on cherche à entretenir la souche à partir de ces individus androgénétiques.

5.2. Suppression de la première mitose

5.2.1. Mise au point du traitement

Le traitement a été mis au point en utilisant la gynogenèse. Cette voie, déjà employée pour la rétention du second globule polaire (Chourrout, 1989), a permis une optimisation rapide. Le traitement ainsi retenu est valable, à une nuance près (voir plus loin), aussi bien pour la diploïdisation d'embryons gynogénétiques que pour la tétraploïdisation.

La mise au point a été réalisée par approches successives plutôt que par plan factoriel comme dans le cas de l'androgenèse. Cette méthode semble donner au moins d'aussi bons résultats. Cependant, le crible était ici plus efficace, peut-être parce qu'on recherchait une bonne survie, contrairement à l'androgenèse.

Plusieurs traitements ont la même efficacité. Plus qu'un moment d'application optimal, il semble se dégager une plage de temps d'efficacité maximale (3h20 à 4h00, à 10°C). D'autre part, dans cette fenêtre de sensibilité, plusieurs couples température-durée de choc présentent une efficacité voisine, si bien qu'on peut tracer des courbes d'"iso-efficacité" sur un diagramme température-durée (fig. 10). Ceci illustre l'interaction entre ces deux paramètres.

Des mélanges d'ovules ont été utilisés lors de la mise au point du traitement. Ainsi, l'absence d'un moment d'application optimum précis peut être due à la variabilité interfemelle de la vitesse du développement embryonnaire. Des travaux ultérieurs ont confirmé cette variabilité du moment optimum, dans la plage de temps 3 h 20 - 4 h 00, en fonction de la femelle utilisée (Quillet, 1988, comm. pers.). Streisinger et al. (1981) rapportent que la température optimale et l'efficacité du choc chaud, pour la diploïdisation d'embryons gynogénétiques chez le danio, dépend du génotype de la mère. Ce type d'inconvénient semble être évité avec l'utilisation d'un choc de pression (Chourrout, 1984 ; Onozato, 1984 ; Foisil, 1986).

Les températures efficaces (30 à 32°C) sont plus élevées que la plupart de celles rapportées dans la littérature, pour la suppression de la méiose II ou de la première (ou seconde) mitose de l'oeuf de salmonidés, qui oscillent entre 26 et 30°C (Chourrout, 1980 ; 1982c ; Chourrout et Quillet, 1982 ; Foisil, 1986 ; Thompson et Purdom, 1986 ; Arai et Wilkins, 1987 ; Crozier et Moffett, 1989). Deux études seulement relatent des chocs de haute température (32°C, pendant 5 et 6 mn) efficaces pour l'induction de triploïdes chez le saumon atlantique et la truite fario (Sutterlin et al., 1987 ; Arai et Wilkins, 1987). Dans toutes ces études, la température d'incubation, paramètre à ne pas négliger, était comprise entre 7 et 10°C.

La seule production de gynogénétiques par choc chaud inhibant la première mitose chez la truite arc-en-ciel a été rapportée par Thompson et Purdom (1986). Leur moment d'application est proche du nôtre (4h30 - 5h30 à 9°C, ce qui équivaut à 4h00 - 5h00 à 10°C) mais leur traitement est moins fort (28°C - 10 mn). L'absence de données de survie, de rendement et de précisions sur les traitements testés laisse à penser que l'efficacité a dû être assez faible ; ceci est clairement suggéré par certains de nos résultats.

Les survies à l'éclosion des gynogénétiques obtenus ici par choc chaud (jusqu'à 20 % des oeufs traités) sont du même ordre que celles des gynogénétiques résultant d'un choc hyperbare chez la truite arc-en-ciel (8 %, Chourrout, 1984 ; autour de 20 %, Foisil, 1986) ou le danio (6 % en 1ère génération, Streisinger et al., 1981). Les chocs de pression et de température optimisés n'ont été comparés que chez le danio par Streisinger et al. (1981) qui ont conclu à la supériorité de ces derniers pour l'inhibition de la première mitose. Toutefois, il est possible que les performances de survie soient peu informatives sur l'efficacité du traitement employé, en raison de la présence de gènes létaux récessifs dans le génome homozygote. En effet, la survie des gynogénétiques homozygotes peut être améliorée au cours des générations successives (et bien qu'on utilise le même traitement) par sélection des individus les plus vigoureux, et donc probablement aussi par l'élimination des gènes létaux ou délétères (Streisinger et al., 1981).

Jusqu'à présent, chez les poissons, les lots tétraploïdisés par choc chaud contenaient des diploïdes résiduels (Chourrout, 1982c ; Bidwell et al., 1985) contrairement à ceux tétraploïdisés par choc de pression (Chourrout, 1984 ; Foisil, 1986). Les diploïdes résiduels étant viables, le choc chaud semblait ne pas convenir pour l'obtention de populations tétraploïdes pures. Nos résultats pourraient remettre à l'ordre du jour ce type de traitement, par ailleurs très pratique.

Ainsi, pour la production de tétraploïdes où la pureté du lot est requise, on choisira les chocs chauds les plus intenses, induisant des survies plus faibles parmi les gynogénétiques, mais 100 % de génomes doublés (fig. 10).

Par contre, pour la production de gynogénétiques diploïdes on préférera les traitements plus doux, au rendement un peu moins élevé mais dont les effets semblent moins délétères puisqu'ils produisent en moyenne les meilleurs taux d'éclosion (31°C - 5 mn ou 30°C - 5 mn).

5.2.2. Homozygotie des gynogénétiques et suppression de la première mitose

L'inhibition de la seconde division de méiose conduit à l'homozygotie des loci liés à leur centromère. Par conséquent, l'homozygotie, vérifiée à quelques loci seulement chez des individus gynogénétiques, ne

constitue pas la preuve que leur diploïdie résulte de la suppression d'une mitose. Il est nécessaire de s'assurer que ces loci sont génétiquement distants de leur centromère.

Chez la truite arc-en-ciel, les taux de recombinaison génétique entre divers loci enzymatiques et leur centromère (ou taux de post-réduction*) sont extrêmement élevés (Guyomard, 1984). Le locus *Idh-3*, hétérozygote chez la femelle utilisée ici, a un taux de post-réduction de 0,60 (Guyomard, 1984). Les ségrégations observées dans notre étude ne s'accordent pas avec l'hypothèse de restauration de la diploïdie par rétention du second globule polaire ($\chi^2 = 30,7$; 2 ddl ; $P < 0,001$) mais concordent avec celle de l'inhibition d'une mitose ($\chi^2 = 2$; 1 ddl ; $P > 0,10$). Ces résultats ont été confirmés par une étude ultérieure beaucoup plus étendue, incluant l'analyse de familles gynogénétiques témoins obtenues par l'inhibition de la méiose II (Quillet, 1988, comm. pers.).

L'induction de la tétraploïdie parallèlement à celle de la gynogénèse constitue un argument supplémentaire en faveur de l'action antimitotique de notre traitement.

Enfin, Chourrout (1989) a observé que la première division de l'oeuf s'achève à 7 h, soit environ 3 h après notre traitement. Il est donc plus probable que le traitement agisse sur la première mitose que sur la seconde.

Nous pouvons donc conclure qu'un choc chaud, débutant de 3h20 à 4h00 après la fécondation, inhibe la première mitose de l'oeuf chez la truite arc-en-ciel.

* Le taux de post-réduction peut être estimé, pour un locus donné, par la proportion d'individus hétérozygotes à ce locus, chez des individus gynogénétiques diploïdisés par l'inhibition de la méiose II.

SECONDE PARTIE:
LES BIVALVES

1. MANIPULATIONS DU STOCK CHROMOSOMIQUE CHEZ LES MOLLUSQUES

La maturation sexuelle s'accompagne, chez les mollusques, des mêmes effets indésirables pour l'élevage que chez les poissons. C'est pourquoi les efforts des expérimentateurs ont, jusqu'à présent, porté presque exclusivement sur la triploïdie. Des traitements d'induction ont été mis au point chez une quinzaine d'espèces (revue par Allen, 1987a, tableau 17). La cytochalasine B et les chocs de température semblent, pour le moment, des agents antiméiotiques plus efficaces que les chocs hyperbares.

La triploïdie induit une stérilité, plus ou moins marquée selon le sexe et l'espèce, qui se manifeste sous l'apparence d'un retard de gamétogenèse (Allen, 1987b). Cette stérilité gonadique, même partielle (certains triploïdes pourraient pondre), est avantageuse, la croissance des triploïdes dépassant largement celle des diploïdes lors de la première saison de reproduction (Allen et Downing, 1986). Leur qualité organoleptique est, en outre, stable toute l'année, rendant caduque le proverbe "mois sans r, huître amère".

L'une des originalités des mollusques par rapport aux poissons est d'offrir la possibilité de produire deux types de triploïdes (voir Méthodes générales d'induction, 2.). Ceux-ci diffèrent par leur taux d'hétérozygotie individuelle, cependant toujours supérieur ou égal à celui des témoins diploïdes. Les adultes triploïdes les plus hétérozygotes (issus de l'inhibition de la méiose I) présentent des croissances ou des survies supérieures à celles des autres triploïdes et des témoins diploïdes (Stanley et al., 1984 ; Arai et al., 1986).

Malgré des essais répétés d'induction, par agent chimique, de la tétraploïdie chez les bivalves, aucun tétraploïde adulte n'a été rapporté dans la littérature à ce jour (Allen, 1987a ; Stephens et Downing, 1989). On sait pourtant que la tétraploïdie peut être induite avec succès chez les invertébrés : chez le ver à soie, par exemple, des tétraploïdes induits ont engendré, par croisement avec des diploïdes, des descendants triploïdes stériles (Astaurov, 1969).

De la même façon, quelques rares travaux relatent l'induction de la gynogenèse haploïde (létale) : aucun ne rapporte pourtant formellement la production de mollusques gynogénétiques diploïdes (revue par Allen, 1987a).

2. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Notre travail s'inscrit dans le cadre général de l'amélioration de la croissance des mollusques d'élevage. Deux voies ont été retenues pour atteindre cet objectif : la suppression de la reproduction (par la polyploïdisation) et la création de lignées consanguines destinées aux schémas de sélection (par l'induction de la gynogenèse).

2.1. La triploïdie

Nous nous sommes attachés à optimiser, chez la palourde japonaise, un traitement à la cytochalasine B puis à en élever les produits triploïdes détectés aux stades embryonnaires. Leur présence a été recherchée dans le naissain et l'effet de ce traitement sur leur gamétogenèse a été étudié.

Le pétoncle noir (dont l'évaluation en tant qu'espèce d'élevage est en cours à l'IFREMER) devait essentiellement servir à montrer que la technique de triploïdisation par la cytochalasine B pouvait être transférée rapidement sur une espèce nouvelle, moyennant un effort méthodologique limité.

2.2. La tétraploïdie

Deux agents ont été testés pour l'induction de la tétraploïdie : la cytochalasine B chez la palourde, et le choc de pression, chez l'huître creuse. L'élevage des individus résultant de ces traitements a été tenté.

2.3. La gynogenèse

Les essais d'induction de la gynogenèse ont été menés chez l'huître creuse. Les rayons ultraviolets ont été retenus pour l'inactivation génétique du sperme. La restauration de la diploïdie a été tentée en utilisant la cytochalasine B.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Récolte des gamètes et insémination

3.1.1. L'huître et la palourde

Les huîtres, âgées de 2 ans, proviennent toutes d'une exploitation locale (Y. Papin, La Tremblade). De février à juin, les gamètes ont été produits par des géniteurs ayant mûri au laboratoire (*cf.* Mise au point de quelques méthodes de travail chez l'huître, 1.). De juin à fin août, les géniteurs y ont été apportés la veille de l'expérimentation.

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

Les mêmes protocoles de stimulation de ponte (*cf.* Mise au point de quelques méthodes de travail chez l'huître, 2.), de récolte des gamètes et d'insémination ont été appliqués aux deux espèces. A toutes les étapes, depuis la stimulation jusqu'à la fin de l'élevage larvaire, l'eau de mer utilisée a été préalablement filtrée à 1 μm et stérilisée aux UV. Les animaux ont été stimulés ensemble dans un même bac. Chaque géniteur commençant à pondre a été retiré du bac. Sa cavité palléale a été rincée et il a été isolé dans un bécher pour terminer sa ponte. Le bac de stimulation a été vidé et rincé après chaque début de ponte pour diminuer le risque de contamination des femelles par du sperme (fécondation incontrôlée). Cette précaution a limité le taux de fécondation incontrôlée à 3 %. Le sperme non motile et les ovules atrésiques (clairs, polyédriques) ou immatures (très allongés) ont été éliminés. Des mélanges de gamètes provenant de 3 à 10 géniteurs de chaque sexe, pour les huîtres, et 10 et 15 pour les palourdes ont été constitués. Les gamètes ont été débarrassés des impuretés et des fèces par tamisage. Les ovules ont été dénombrés par comptage de 2 ou 3 échantillons (100 μl dans 1 ou 2 l). Un témoin (2 ml) a été prélevé avant l'insémination pour estimer, 1 à 2 h plus tard, le taux de fécondation incontrôlée.

L'insémination (temps 0 du développement) a été pratiquée avant la division du mélange d'oeufs en lots égaux destinés à recevoir des traitements différents. Après vérification du nombre optimum de spermatozoïdes par ovule, de l'ordre de 10 selon Gruffydd et Beaumont (1970), le mélange d'oeufs a été divisé en volumes égaux, plus ou moins nombreux selon les protocoles expérimentaux.

3.1.2. Le pétoncle

Des adultes ont été récoltés par dragage dans le bassin de Marennes-Oléron. Ils ont achevé leur maturation en aquarium de 20 l (10 animaux par aquarium) pendant 2 semaines environ. L'eau de mer était changée tous les jours et du phytoplancton cultivé y était ajouté à raison de 10^9 cellules par animal.

La ponte a été ici stimulée par une injection de 0,05 ml de sérotonine 5mM dans la glande génitale. Des mélanges d'ovules et de spermatozoïdes ont été constitués. Le nombre de spermatozoïdes par ovule a été estimé à environ 5. Le moment de l'insémination a été considéré comme le début du développement (temps 0). La ponte et l'insémination, comme ensuite les traitements, ont été effectuées à 20°C.

3.2. Irradiation du sperme

Pour l'induction de la gynogenèse, le matériel génétique du sperme a été inactivé par exposition aux rayons ultraviolets.

L'inactivation génétique du sperme d'huître a été mise au point selon le même principe que chez la truite. Cependant, il est beaucoup plus aléatoire avec les bivalves qu'avec les poissons de récolter du sperme pur et par conséquent d'effectuer une dilution standard. Or les UV étant peu pénétrants, il est indispensable de diluer le sperme selon un protocole rigoureusement reproductible.

Le sperme concentré (émis dans un faible volume d'eau) a été dilué en se référant à sa densité optique à une longueur d'onde de 265 nm, proche de celle de l'irradiation, 255 nm. Cette méthode a l'avantage de prendre en compte la turbidité de l'eau, variable selon la saison et le lieu. La densité optique est

mesurée, par définition, à travers un milieu d'1 cm d'épaisseur. Or l'épaisseur de la couche de sperme irradiée est beaucoup plus faible (moins de 2 mm). C'est pourquoi, la densité optique a été mesurée sur une dilution au 1/10ème de la suspension irradiée. La concentration du sperme traité a toujours été ajustée de sorte que sa dilution au 1/10ème ait une densité optique de 0,55 à 265 nm.

Le sperme a été irradié par fractions de 3 ml regroupées ensuite. Ce volume, déposé dans le fond d'une boîte de Pétri (4,5 cm de diamètre), a été placé sur un agitateur magnétique sous une lampe germicide à UV de 30 W (fig. 11). La puissance du rayonnement au niveau de la surface du liquide s'est stabilisée à environ 700 mW/cm², après un temps de chauffage de 20 mn. La suspension a été constamment et lentement agitée à l'aide d'un barreau magnétique très fin. Le paramètre optimisé a été le temps d'irradiation. La gynogenèse haploïde a été mise au point en se basant sur la motilité du sperme irradié, le taux de fécondation (rapport du nombre d'oeufs en cours de segmentation sur le nombre d'ovules inséminés), le taux de larves D (rapport du nombre de larves D sur le nombre d'ovules inséminés) et les résultats de caryologie.

3.3. Traitement avec la cytochalasine B

Le traitement a été appliqué selon le protocole de Downing et Allen (1987) légèrement modifié. Il s'effectue en deux temps par l'immersion des oeufs dans une solution de cytochalasine B (CB) puis dans une solution de rinçage. Presque tous les paramètres du traitement ont été identiques pour les deux espèces (tableau 12). Les lots témoins des expériences de mise au point ont été immergés dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) de même concentration que les lots traités, pendant 30 mn. Les témoins des productions de masse n'ont pas été mis en contact avec le DMSO. A l'issue du traitement, les oeufs ont été placés en incubation pendant 24 h, à 25°C et à une densité de 100 ind/ml, soit en mini-jarre (1,5 l) lors des expériences de mise au point, soit directement en jarre d'élevage (150 l) lors des productions. Dans les deux cas, l'eau a été aérée par un léger bullage. Dans chacun des lots traités et des témoins, un échantillon d'environ 50 000 individus, destiné à l'examen caryologique, a été prélevé 6 h après la fécondation.

Pour *R. philippinarum*, trois expériences, comportant chacune une série de lots traités à différents moments (0 à 60 mn après fécondation), ont été menées en vue de définir un traitement induisant un fort taux de triploïdes et un

autre induisant des tétraploïdes (fig. 12). Ensuite, les traitements les plus efficaces ont été réemployés pour deux productions de ces individus à plus grande échelle.

Pour *C. gigas*, le traitement de Downing et Allen (1987) retenant un globule polaire a été affiné par C. Ledu au laboratoire (non publié). Il a été ainsi appliqué aux oeufs 25 mn après leur insémination par du sperme irradié pour tenter d'induire la gynogenèse diploïde (fig. 12). D'autres traitements ont été appliqués 5, 10 et 15 mn après fécondation des oeufs par du sperme irradié pour tenter d'obtenir des huîtres gynogénétiques tétraploïdes (mécanismes proposés en discussion).

Pour *C. varia*, une expérience de mise au point du moment d'application a été suivie d'une seconde production de triploïdes destinés à l'élevage larvaire.

3.4. Choc de pression hydrostatique

Nous avons employé, pour tenter de supprimer la première division de segmentation chez l'huître, le même appareil hyperbare que dans le cas de la truite (fig. 2).

La recherche d'un traitement antimitotique efficace a été conduite à travers 6 expériences. Pour chacune d'elles, l'intensité du choc, c'est-à-dire sa pression (8 000 et 10 000 psi) et sa durée (3 à 9 mn), a été fixée et le moment d'application a varié de 25 à 90 mn après fécondation (tableau 13). La gynogenèse n'étant pas encore disponible au moment de ces expériences, le traitement a été appliqué sur des oeufs diploïdes (fig. 13). En conséquence, le principal critère d'efficacité du choc a été le pourcentage de tétraploïdes, estimé par caryologie sur des embryons de 6 à 8 h. La survie des larves D a été également prise en compte.

3.5. Chronologie des premières divisions de l'oeuf de palourde

Afin de déterminer les moments d'apparition des deux globules polaires et des deux premiers clivages, des échantillons de 300 individus ont été prélevés, à intervalles réguliers, dans un mélange d'oeufs maintenu à 25°C par un bain-marie. Les échantillons ont été immédiatement fixés dans un mélange

(acide acétique 1 : éthanol 3). Leur examen au microscope a permis d'enregistrer les fréquences des différents stades présents dans chaque prélèvement.

3.6. Caryologie

Les chromosomes métaphasiques ont été préparés selon la technique de la suspension cellulaire, aussi bien pour les embryons que pour le naissain.

La technique employée pour les embryons de bivalves est dérivée de celle de Chourrout et Happe (1986) pour les embryons de truites. Les différences de technique entre les truites et les bivalves ont porté sur des détails mineurs (tableau 14). Un point seulement présente une différence importante. La suspension cellulaire a été obtenue chez les embryons de bivalves à partir d'un groupe de plusieurs dizaines de milliers d'individus au lieu d'un seul. Cette différence, due à la taille réduite et au faible nombre de cellules d'un embryon de quelques heures, introduit dans l'estimation du taux d'hétéroplôides un certain nombre de biais (détaillés en discussion).

Chez les embryons de bivalves, les taux d'hétéroplôides ou de diploïdes gynogénétiques ont été estimés en comptant 30 à 50 métaphases par lot traité.

Pour le naissain de palourde, ces taux ont été estimés en étudiant 19 à 36 individus. Pour chacun d'eux, 5 à 10 métaphases ont été comptées.

Le nombre de chromosomique est de 20 chez l'huître (Thiriote-Quiévreux et Ayraud, 1982) et 38 chez le pétoncle et la palourde (Beaumont et Gruffydd, 1974 ; Gérard, 1978).

3.7. Elevage

A la suite du traitement polyploïdisant, chaque lot (traité et témoin) a été dupliqué pour l'élevage larvaire. Les larves ont été élevées en bac cylindro-conique de 150 l selon une technique classique (Loosanoff et Davis, 1963). Pour les premières 24 h, la densité a été fixée à 100 larves/ml. Ensuite, elle a été maintenue à 10 larves/ml jusqu'à la métamorphose en ajustant le volume d'eau à chaque renouvellement. La température a été maintenue à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pour les pétoncles et à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pour les deux autres espèces. La nourriture a été distribuée tous les jours, à la même concentration dans tous les bacs, à raison de

50 à 100 cellules/ml selon l'âge des larves. Elle se composait d'*Isochrysis galbana* (clone T. iso), seule (pour les palourdes) ou avec *Chaetoceros calcitrans* (pour les huîtres et les pétoncles). Tous les deux jours, l'eau de mer, filtrée à 1 μm et stérilisée aux UV, a été renouvelée en évitant aux larves tout changement de température. Au cours de cette opération, l'effectif de chaque lot a été estimé par comptage de 3 échantillons (représentant chacun 1/10 000ème ou 1/20 000ème de la population totale) et la taille moyenne a été calculée d'après les mesures de 30 larves par lot (diamètre de la coquille mesuré parallèlement à sa charnière). Des antibiotiques ont été ajoutés à l'eau neuve, alternativement du chloramphénicol (10 mg/l) et du sulfate de gentamycine (5 mg/l) ou de la furazolidone (5 mg/l). Deux échantillons d'eau par bac ont été quotidiennement prélevés et déposés sur deux milieux de cultures différents. Ce contrôle a permis de quantifier la flore bactérienne totale, sur le milieu 2216 E de Oppenheimer et Zobell (1952), et la flore de vibrions présumés, sur le milieu sélectif TCBS de Kobayashi et al. (1963).

Seuls les élevages de palourdes ont pu être menés au-delà de la métamorphose. Lorsque 50 % d'un lot a atteint le stade pédivéligère, ses larves ont été transférées sur un tamis (maille carrée de 60 μm) en eau courante. Le naissain a été nourri par les algues du milieu naturel, présentes dans l'eau courante filtrée à 40 μm , et, quand elles étaient disponibles, par des algues cultivées (*Chaetoceros calcitrans* ou *Tetraselmis suecica*).

3.8. Observation de la gamétogenèse chez la palourde

Des animaux d'un an (60 provenant du lot traité et 30 du témoin de la première production de triploïdes) ont été sacrifiés vers la fin de la période normale de maturation sexuelle (le 20 juin). Les palourdes ont été laissées une nuit dans une solution de colchicine (0,2 g/l), puis les branchies ont été disséquées et traitées selon le protocole de caryologie décrit précédemment. Le reste de l'animal a été fixé dans du liquide de Carson (formaldéhyde : 4 % ; NaOH : 5g/l ; NaH_2PO_4 : 23,8 g/l ; pH 7,4) et inclus dans un bloc de paraffine. Des coupes longitudinales de 3 μm d'épaisseur ont été pratiquées au niveau de la gonade, déposées sur une lame, colorées à l'hématoxyline (d'Ehrlich) et à l'éosine et recouvertes d'une lamelle, montée à l'Eukitt.

Après examen des préparations au grossissement 400x, les individus ont été classés selon leur sexe et leur degré de maturation d'après Morriconi et Calvo (1979) :

Pour les mâles :

- stade I : série spermatique sans spermatozoïde,
- stade II : série spermatique avec spermatozoïdes,
- stade III : spermatozoïdes uniquement,
- involution : lyse des spermatozoïdes et présence d'hémocytes.

Pour les femelles :

- prolifération : petits ovocytes et ovogonies,
- maturation : grands ovocytes attachés à la lame basale des acini,
- maturité : grands ovocytes situés dans la lumière des acini,
- involution : ovocytes lysés et hémocytes.

3.9. Analyse des données

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

3.9.1. Taux d'hétéroplôïdes ou de gynogénétiques

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

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

3.9.2. Croissance larvaire

Les tailles individuelles moyennes, pendant l'élevage larvaire, au sein de différents lots (traité, témoin) ont été comparées grâce à une analyse de

variance à deux facteurs. L'un de ces facteurs a été l'âge des larves, l'autre, le type de lot (traité, témoin). La variable analysée a été la longueur de la coquille en μm , transformée en Log pour remplir la condition d'homogénéité des variances. La collecte de ces données est détaillée plus haut au paragraphe 3.7..

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

4. RESULTATS

4.1. Mise au point de quelques méthodes de travail chez l'huître

A notre arrivée, le laboratoire entamait ses recherches dans le domaine des manipulations chromosomiques. Il a été nécessaire de définir des méthodes de travail de base en s'appuyant sur la mise au point de quelques techniques (maturation hors saison, stimulation de la ponte, caryologie) et sur l'observation du matériel biologique (vieillessement des ovules).

Ce paragraphe est relativement secondaire par rapport aux résultats de manipulation du stock chromosomique. C'est pourquoi, le lecteur trouvera ici, avec les résultats, quelques points de méthode et de discussion qui n'ont pas leur place dans les chapitres correspondants.

4.1.1. Maturation hors saison

Le cycle naturel de maturation sexuelle débute sous nos latitudes à la fin de l'hiver. Le début de la gamétogenèse s'accompagne d'une transformation du glycogène, accumulé dans la gonade à l'automne, en lipides, indispensables à la formation des gamètes (Gabbott, 1983). Les huîtres sont aptes à pondre dès juin mais les pontes naturelles interviennent généralement en juillet et août. Dans ces conditions, la saison de reproduction dure seulement 3 mois, ce qui apparaissait insuffisant pour un travail continu de cytogénétique expérimentale.

Avancer la maturité de quelques mois semble ne pas poser de difficultés particulières. Deux années consécutives, des huîtres, pourvues d'importantes réserves de glycogène, ont été transférées du milieu naturel au

laboratoire, à partir de début janvier. Elles sont passées progressivement de la température extérieure (8 à 15°C) à la température de maturation, 22°C (pour certaines 24°C) à raison d'environ +5°C/j. La nourriture distribuée en continu, a été variée (*Isochrysis galbana*, *Pavlova luteri* et *Chaetoceros calcitrans* la première année, *C. calcitrans* et *Tetraselmis suecica* la seconde) et abondante (environ 7.10^8 Cell.j⁻¹.ind⁻¹). L'eau a été renouvelée quotidiennement et les bacs nettoyés hebdomadairement. Les animaux ont été conditionnés à une densité de 50 ind/100 l.

Un mois dans ces conditions a suffi pour rendre les huîtres aptes à pondre des oeufs capables de se développer normalement.

Cette technique simple a permis de disposer d'ovules et de sperme de février à mai-juin, l'approvisionnement étant ensuite assuré jusqu'en août par des géniteurs prélevés dans le milieu naturel.

Il semble par contre que la maturation soit beaucoup plus difficile à obtenir en automne. Plusieurs tentatives en ce sens se sont révélées infructueuses (fig. 14). Les huîtres destinées à être matures en novembre, décembre ou janvier ont terminé leur période de conditionnement aussi "maigres" (parfois plus) qu'au début, malgré, dans l'un des protocoles (n° 1), une accumulation de réserves prometteuse mais passagère. Des facteurs autres que la température et la nourriture jouent peut-être un rôle important dans la maturation des huîtres (par exemple la photopériode).

Une autre approche fut tentée qui semble moins incertaine. Un lot (200 huîtres) provenant du milieu extérieur fut placé de mars à fin septembre en eau réfrigérée à 11°C et renouvelée faiblement mais en continu pendant 20h/24h. Outre la nourriture, non quantifiée, provenant du milieu extérieur, les animaux avaient à leur disposition environ 2.10^8 Cell.j⁻¹.ind⁻¹. Parmi les animaux régulièrement sacrifiés, certains, en nombre non négligeable, étaient immatures mais la majorité (environ 60 %) est parvenue à maturation. La qualité des gamètes n'a cependant pu être appréciée car une panne du cryostat a provoqué la ponte massive de ces géniteurs, de toute évidence matures, à la fin du mois de septembre.

4.1.2. Stimulation de la ponte

Un certain nombre de stimuli essayés (chocs chauds et froids, émergence à 4°C, ajout de gamètes tués par congélation) se sont révélés peu efficaces. La méthode suivante a été retenue.

Les géniteurs sont émergés pendant la nuit à 18°C - 20°C. Ils sont ensuite réimmergés à 22°C - 25°C et des gamètes frais mais détruits par ultra-sons ou de l'eau de mer ayant contenu des ovocytes sont ajoutés dans l'eau. Les géniteurs matures pondent dans l'heure qui suit la réimmersion.

L'avantage de ce procédé est double : il n'implique pas l'administration de substances artificielles aux animaux et évite toute fécondation incontrôlée.

4.1.3. Effet du conditionnement des géniteurs sur le vieillissement des ovules

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

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

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

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

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

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

4.1.4. Estimation de la proportion de polyplœides induits

C'est l'examen chromosomique qui a été choisi pour estimer le taux de polyplœides induits. Cette technique requiert du temps mais est fiable et peu coûteuse en matériels et produits.

Pour optimiser rapidement un traitement d'induction de la polyplœidie, il est nécessaire de connaître le plus tôt possible son efficacité puisque les protocoles expérimentaux sont établis d'après les résultats des essais précédents. Les auteurs américains (Tabarini, 1984 ; Chaiton et Allen, 1985) réalisaient jusqu'en 1989 (Stephens et Downing, 1989) l'estimation du taux de polyplœides au plus tôt à la fin de l'élevage larvaire. Ceci nécessite de mener jusqu'à ce terme la totalité des lots traités et leur(s) témoin(s). Une telle méthode est longue et risquée, notamment dans une éclosion neuve. Cependant, d'autres

auteurs ont déterminé la proportion de polyploïdes induits en examinant des caryotypes d'embryons de quelques cellules (Quillet et Panelay, 1986) ou de larves trochophores (Arai et al., 1984). Il a donc été choisi d'estimer les taux d'induction de polyploïdes avant le stade larve D (apparition de la coquille), atteint environ 24 h après fécondation chez la plupart des bivalves. La première étape a été de déterminer le meilleur moment du développement pour l'analyse caryologique.

Aux stades embryonnaires précoces (quelques cellules), le cytoplasme est chargé de lipides vitellins dont la coloration intense masque les chromosomes. Une extraction de ces lipides était nécessaire. La méthode décrite par Longwell et Stiles (1968) a été employée. Elle a nécessité la fabrication d'une installation miniature, adaptée aux larves, sur le principe de l'appareil de Soxhlet. Cette technique s'est révélée efficace pour visualiser les chromosomes. Cependant, les plaques métaphasiques n'étaient pas "lisibles" car les chromosomes de cellules adjacentes se superposaient. En effet, les 5 premières divisions de l'oeuf (0 à 5 h) sont synchrones (Verdonk et Van den Biggelaar, 1983).

Les larves trochophores semblaient un matériel intéressant : elles sont dépourvues de coquille, leurs cellules ne sont plus chargées de vitellus et n'entrent plus en division de façon synchrone. La technique caryologique mise au point après l'optimisation de divers paramètres (durée d'incubation dans la colchicine, durée et intensité du choc hypotonique, composition de la solution hypotonique, durée de la fixation) a permis la visualisation des chromosomes. Cependant, les caryotypes ne se sont avérés analysables que sur des cellules dissociées. Plusieurs techniques ont été testées pour la dissociation des cellules : écraser la suspension de larves (le "squash"), laisser tomber de haut des gouttes de cette suspension (le "dropping"), utiliser de l'acide acétique dilué. C'est cette dernière qui a été retenue.

La dissociation des cellules en travaillant larve par larve, a été tentée sans succès du fait de leur petite taille (70 μm).

Nous avons donc opéré sur des mélanges de larves, les lames analysées pouvant présenter des métaphases de plusieurs milliers d'individus différents. Le choix des métaphases comptées s'est fait en fonction de leur qualité.

4.2. Triploïdie chez la palourde*

Le traitement efficace, mis au point dans la première partie du travail, a été employé pour deux productions à plus grande échelle de palourdes triploïdes. Le taux de triploïdes dans le naissain a été estimé à l'âge de 4 mois. Enfin, la gamétogenèse a été observée dans une population traitée et son témoin, sur des animaux d'un an en fin de maturation.

4.2.1. Induction par la cytochalasine B

Trois expériences récurrentes ont permis de tester des moments d'application compris entre 0 et 60 mn après l'insémination. Les pourcentages de triploïdie parmi les embryons sont significativement différents d'un traitement à l'autre ($F = 10,32$; $P < 0,001$) mais pas d'une expérience à l'autre ($F = 0,68$; $P > 0,50$) (fig. 16). Le pourcentage moyen le plus élevé a été produit par les traitements débutant à 20 mn ($75,8 \pm 5,7$ %). Il n'est cependant pas significativement différent de celui produit par les traitements appliqués 15 mn après insémination. Aucune différence significative n'a été détectée entre les 4 pourcentages de triploïdie obtenus aux temps 19 ou 20 mn après insémination ($\chi^2 = 6,32$; 3 ddl ; $P > 0,05$).

Les pourcentages de larves anormales (âgées de 7 heures) sont, dans tous les lots traités à la CB, significativement supérieurs à ceux des témoins traités seulement avec le DMSO (fig. 17).

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

4.2.2. Performances larvaires

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

* L'induction et les performances larvaires ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Aquatic Living Resources*, 1990 (3 (1) : 55-60) sous le titre "Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I - Chemical induction and larval performances of triploids".

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

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

La taille moyenne des larves traitées a été significativement inférieure à celle des témoins, depuis le 3^{ème} jour jusqu'à la métamorphose, dans l'élevage I ($F = 46,3$; $P < 0,0001$) (fig. 18b). Par contre, dans l'élevage II, aucune différence significative de taille n'a été détectée entre les lots traités et les témoins ($F = 0,12$; $P > 0,70$). Pour l'élevage I, le taux de croissance des lots traités a été comparé à celui des témoins. Une analyse de covariance a montré que les pentes des droites de régression étaient égales ($F = 0,84$; $P > 0,5$) et que leurs ordonnées à l'origine étaient différentes ($F = 24,6$; $P < 0,05$). Les droites sont parallèles et montrent que les individus traités ont conservé leur retard pendant tout l'élevage larvaire, en gardant un taux de croissance égal à celui des témoins.

4.2.3. Evolution de la proportion de triploïdes dans les populations traitées

Les deux élevages ont différencié sur ce point. Dans l'élevage I, la différence de pourcentage de triploïdes entre le stade embryonnaire et le stade naissain (4 mois) n'est pas significative (tableau 15). Dans l'élevage II, le pourcentage de triploïdes a changé significativement en chutant de 90 à 32 % en moyenne sur les deux réplicats. Cette dernière estimation, sur le naissain, paraît fiable puisque les duplicats ne diffèrent pas significativement l'un de l'autre (tableau 15). On peut estimer la mortalité différentielle des triploïdes (au sein du lot traité) à $\frac{90\% - 32\%}{90\%} = 64\%$, dans l'élevage I.

90 %

4.2.4. Etude de la gamétogenèse

La ploïdie des individus étudiés ici n'a pu être déterminée à cause d'un indice mitotique nul dans l'organe prélevé (branchies). Les différences entre individus triploïdes et diploïdes n'ont donc pu être relevées. Cependant les résultats de l'observation de la gamétogenèse ont été rapportés car leur interprétation au niveau de la population traitée présente tout de même un intérêt.

Le pourcentage d'individus indifférenciés dans la population traitée, près de 30 %, est supérieur à celui du témoin, 10 % (tableau 16). La différence est significative ($\chi^2 = 3,95$; 1 ddl ; $P < 0,05$). De plus, on constate un certain retard dans la maturation des individus traités. En effet, d'une part, les individus en phase de prolifération (planches 2 et 3) sont en proportion significativement plus importante dans la population traitée que dans le témoin ($\chi^2 = 13,1$; 1 ddl ; $P < 0,001$). D'autre part, on enregistre, parmi les individus traités, significativement moins d'animaux parvenus à maturité ($\chi^2 = 5,36$; 1 ddl ; $P < 0,025$) ou en phase d'involution ($P = 0,038$; calculé selon la méthode exacte décrite par Schwartz, 1969) que dans le témoin (planches 1 et 2). Les proportions d'individus en cours de maturation (planches 1 et 3) ne sont pas significativement différentes ($\chi^2 = 0,3$; 1 ddl ; $P > 0,50$).

Le déséquilibre de la sex-ratio, constaté dans le lot traité (16 mâles, 27 femelles), n'est pas significatif ($\chi^2 = 2,81$; 1 ddl ; $P > 0,05$) ni différent de celui du témoin ($\chi^2 = 0,36$; 1 ddl ; $P > 0,50$). On ne constate pas non plus de déséquilibre significatif de la sex-ratio pour chaque stade de maturation chez les individus traités, bien que celui observé pour la phase de prolifération soit proche du seuil de signification.

Enfin, 5 des 16 mâles répertoriés dans la population traitée ne présentent que des figures de maturation atypique (planche 3). Celles-ci se caractérisent par la présence simultanée de stades très précoces (cellules goniales en phase de multiplication) et de spermatozoïdes.

4.3. Triploïdie chez le pétoncle*

La première expérience a permis de choisir le traitement le plus efficace parmi les trois testés. Les traitements débutant 10, 20 et 30 mn après insémination ont produit respectivement 44,7 %, 78,5 % et 25,9 % d'embryons triploïdes. Dans ces lots, les taux de survie à 24 heures s'élevaient respectivement à 50 %, 87,5 % et 75 % de ceux du témoin (50 % des oeufs). Les différences de pourcentage de triploïdes et de taux de survie entre les lots traités ont été significatives ($\chi^2 = 19,98$; 2 ddl ; $P < 0,001$ et $\chi^2 = 8,82$; 2 ddl ; $P < 0,02$, respectivement). Aucune métaphase triploïde n'a été observée dans le témoin (0/25).

La seconde expérience était destinée à produire du naissain triploïde. Le meilleur traitement, débutant 20 mn après insémination, a été réemployé. Il a produit 72,4 % d'embryons triploïdes, ce qui ne diffère pas significativement du pourcentage précédent ($\chi^2 = 0,36$; 1 ddl ; $P > 0,50$). Le témoin ne contenait pas de métaphase triploïde (0/30).

Le taux de survie absolue du lot traité a diminué continuellement au cours de l'élevage alors que celui du témoin s'est stabilisé à partir du 5ème jour autour de 20 %. A la fin de l'élevage larvaire, la survie du lot traité représentait 18 % de celle du témoin (fig. 19a). Les différences de survie entre les deux groupes ont été significatives ($F = 18,07$; $P < 0,001$).

La vitesse de croissance du lot traité n'a pas été différente de celle du témoin ($F = 2,415$; $P > 0,10$). Une droite de régression a donc été ajustée aux données groupées des deux lots (fig. 19b).

* Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Aquaculture*, 1989 (77 : 103–111) sous le titre "Triploidy induction in the black scallop (*Chlamys varia* L.) and its effect on larval growth and survival".

4.4. Tétraploïdie diparentale chez la palourde*

4.4.1. Etude préliminaire de la chronologie du développement précoce

Les moments d'apparition des 2 globules polaires (GP1 et GP2) et des 2 premiers clivages de l'oeuf ont été enregistrés à 25°C, et sont présentés sous forme de fréquences relatives cumulées de chaque stade (fig. 20). Notons que pour le GP2, difficile à distinguer du GP1, une seule fréquence a pu être déterminée.

Les deux globules polaires commencent à apparaître 10 et 25 mn après l'insémination. Les deux premiers clivages apparaissent en moyenne 50 et 70 mn après l'insémination.

Le premier clivage de l'oeuf, chez *R. philippinarum*, s'effectue sans formation de lobe polaire, contrairement à l'huître *C. gigas*, mais cependant de façon inégale pour le cytoplasme. Ainsi, des territoires présomptifs sont déterminés dès cet instant (Verdonk et Van Den Biggelaard, 1983).

4.4.2. Mise au point du traitement avec la cytochalasine B

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

La tétraploïdie a été induite en des proportions variant significativement en fonction du moment d'application ($F = 5,82$; $P < 0,02$) (fig. 21). Le test de Newman-Keuls révèle un optimum pour les traitements débutant de 0 à 10 mn après l'insémination. Bien que le plus haut pourcentage de tétraploïdes ait été induit par un traitement débutant à 9 mn (80 %), la moyenne la plus élevée a été obtenue avec les traitements appliqués à 5 mn ($64,4 \pm 7,8$ %). Les rendements des traitements plus tardifs ne diffèrent pas significativement les uns des autres. Cependant, le moment 45 mn a produit le pourcentage moyen le plus élevé d'entre eux ($28,3 \pm 2,3$ %).

* Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Aquatic Living Resources*, 1990 (3 (2), 107-112) sous le titre "Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II - Chemical induction of tetraploid embryos".

Dans les lots traités précocement, quelques métaphases hypertétraploïdes ont été relevées.

L'observation des lots traités a montré que les pourcentages de larves D, 26 heures après la fécondation, variaient selon le moment d'application du traitement (fig. 22). Pour les traitements appliqués de 0 à 13 mn et de 46 à 52 mn, les pourcentages de larves D ont été les plus faibles (4 à 26 %) et les larves trochophores anormales les plus nombreuses (5 à 25 %). Le témoin était composé de 84 % de larves D et 16 % de larves trochophores normales. Les larves trochophores anormales étaient soit grosses, translucides et entièrement recouvertes de cils, soit atteintes de malformations des ébauches de la coquille.

4.4.3. Elevage larvaire

Deux lots traités, l'un précocement, l'autre tardivement, ont été maintenus en élevage. Les deux traitements réemployés ici ont été choisis avant de connaître la totalité des résultats des trois précédentes expériences. Ils ont débuté 10 et 45 mn après l'insémination, et ont produit respectivement 73,3 % et 33,3 % d'embryons tétraploïdes. Le témoin ne comportait pas de métaphases polyploïdes.

La croissance du lot témoin n'a pas été significativement différente de celle du lot traité précocement ($F = 0,19$; $P > 0,60$) ni de celle du lot traité tardivement ($F = 3,63$; $P > 0,05$), entre le 3^{ème} et le 11^{ème} jour. Dans chacun des lots, la métamorphose a débuté au 13^{ème} jour.

La survie moyenne des duplicats, du 1^{er} au 13^{ème} jour, a été de 0,9 % dans le lot traité précocement et de 14 % dans le lot traité tardivement (34 % dans le témoin). Aucune prolifération bactérienne n'a été détectée dans l'eau des jarres d'élevage. Le nombre total de bactéries a varié de 0 à 104/ml et celui des vibrions présumés n'a pas dépassé 10/ml, ce qui dénote une flore peu abondante.

Aucun tétraploïde n'a été observé dans le naissain (30 individus examinés par lot).

4.5. Tétraploïdie diparentale chez l'huître

Les premières expériences, utilisant des chocs pressions de 8 000, 9 000 et 10 000 psi, ont été suivies de très fortes mortalités, supérieures à 95 % à 24 h. Aucun polyploïde n'a pu être détecté parmi les rares embryons survivants des lots traités à 9 000 et 10 000 psi. Le plus fort pourcentage d'embryons tétraploïdes produit par le choc de 8 000 psi (25 %) a été obtenu pour le moment d'application 20 mn (fig. 23). Ce même traitement a aussi induit 50 % de triploïdes. Dans le lot traité à 30 mn, 30 % de triploïdes ont été observés contre 10 % dans le témoin.

Les chocs durant 3 mn à 9 800 psi ont été très peu efficaces. Seul le traitement appliqué 80 mn après la fécondation a produit quelques tétraploïdes (20 %). Les traitements plus intenses, durant 5 et 7 mn, ont été plus efficaces. Le moment d'application optimal a été plus précoce (60 mn) et a fourni 30 à 40 % de tétraploïdes pour les durées 5 et 7 mn respectivement (fig. 23). La survie de ces lots représentait à 24 h environ 5 % de celle du témoin.

Des métaphases triploïdes ont été observées en assez forts pourcentages (36 à 44 %) pour le temps 40 mn (9 800 psi - 7 mn) mais aussi pour les temps 60 mn (9 800 psi - 5 mn) et 70 mn (9 800 psi - 7 mn). Il a aussi été noté dans ces deux dernières expériences (9 800 psi - 5 et 7 mn) une production d'haploïdes (jusqu'à 28 %) au temps 50 mn.

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

4.6. Gynogenèse chez l'huître

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

4.6.1. Gynogenèse haploïde

Quelques expériences préliminaires ont permis de déterminer des conditions expérimentales favorables à la mise au point d'une technique fiable

(voir Matériels et méthodes, 2.). Dans ces conditions, la perte totale de motilité du sperme, lorsqu'il est de bonne qualité apparaît après environ 240 s d'irradiation (fig. 24). La motilité des spermatozoïdes commence à être affectée pour des durées d'exposition supérieures à 120 s.

Le taux de fécondation a varié entre 58 et 80 % de celui du témoin pour des durées d'irradiation allant jusqu'à 190 s. La survie absolue à 21 heures a décliné en fonction de la durée d'irradiation, jusqu'à être nulle pour 250 s (fig. 25). Elle correspond au taux de fécondation, lui-même dépendant de la motilité. Le témoin était composé, à 21 heures, de 94 % de larves trochophores "âgées" (stade précédent l'apparition de la coquille) de 6 % de trochophores "jeunes" ou anormales. Dans les lots traités, n'ont été observées que des larves trochophores "jeunes" ou anormales. A 45 heures, le témoin était composé presque exclusivement de larves D (97,4 %), alors qu'aucune n'était présente dans les lots traités, ne comptant que quelques larves trochophores anormales.

L'analyse caryologique a montré une disparition progressive des métaphases diploïdes avec l'augmentation de la durée d'irradiation (fig. 26). Il semble qu'une durée de 190 s détruise totalement le génome paternel (planche 4). Les quelques métaphases diploïdes observées pour les durées 175 et 190 s pourraient provenir d'ovules diploïdes comme le suggère la présence de triploïdes dans le lot témoin et dans celui résultant d'une irradiation durant 130 s.

De nombreux fragments de chromatine et des aberrations chromosomiques (fusions, chromosomes circulaires, etc...) ont été observés pour les durées d'irradiation suboptimales, notamment 130 et 145 s.

Les expériences ultérieures ont confirmé l'efficacité d'une durée d'irradiation de 190 s, essentiellement par des arguments de nature caryologique.

4.6.2. Restauration de la diploïdie

La restauration de la diploïdie a été tentée par la rétention d'un globule polaire. Le traitement utilisé (au cours de deux expériences successives) a été mis au point par Downing et Allen (1987) et affiné par C. Ledu au cours de son stage au laboratoire. Débutant 25 mn après l'insémination, il a induit de très forts pourcentages de diploïdes (82 et 92 %) lorsqu'il était appliqué à des oeufs fécondés avec du sperme irradié (fig. 27). Les témoins "sperme irradié" étaient

composés de 92 et 94 % d'haploïdes. Le même traitement, appliqué à des oeufs diploïdes (sperme normal) a produit des triploïdes (46 et 72 %, planche 4). Ainsi la diploïdie semble bien avoir été restaurée par rétention d'un globule polaire.

Lors d'une tentative d'élevage (expérience I de la fig. 27), les survies du lot gynogénétique diploïde et du lot triploïde à 23 heures ont été, respectivement, de 5 % et 36 % du témoin diploïde. Les taux de larves D s'élevaient alors, respectivement, à 4 % et 8 % de celui du témoin diploïde. Le témoin haploïde présentait une survie de 8 % de celle du témoin diploïde et ne comportait que des larves trochophores anormales. L'expérience II a donné des résultats comparables.

Deux tentatives d'élevage n'ont pu aboutir. L'échec de la première (expérience I) est dû à une mauvaise qualité d'eau lors d'un renouvellement : tous les lots, duplicats témoins compris, sont morts le même jour. L'échec de la seconde tentative (non rapportée ici) est dû à des gamètes de mauvaise qualité : entre autres indices, le taux de larves D a été très faible et la survie a chuté très vite dans le témoin diploïde comme dans tous les autres lots.

4.6.3. Induction de la tétraploïdie

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

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

Des métaphases tétraploïdes (planche 5) ont été observées dans les lots gynogénétiques (fig. 28). Dans l'expérience I, le traitement le plus efficace a débuté 10 mn après l'insémination. Il a produit, dans les deux expériences, respectivement 34 % et 56 % de métaphases tétraploïdes. Aucune métaphase de ploïdie supérieure n'a été observée dans les lots gynogénétiques.

Le même traitement (débutant 10 mn après la fécondation) s'est avéré le plus efficace pour l'induction de la pentaploïdie (planche 5), lorsqu'il a été appliqué à des oeufs diploïdes (respectivement 46 % et 36 % pour les deux expériences).

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

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

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

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

5. DISCUSSION

5.1. Triploïdie

Le traitement optimal mis au point chez la palourde semble reproductible puisque les pourcentages de triploïdes induits au cours de 4 expériences successives ne sont pas significativement différents. Le travail sur le pétoncle noir a prouvé la rapidité de transposition de la technique à d'autres espèces. A partir de l'observation du développement précoce de ce pectinidé, et en

nous basant sur les observations et les résultats obtenus chez la palourde, nous avons très rapidement mis au point un traitement satisfaisant, après un effort méthodologique limité. L'optimisation des traitements a pu être menée rapidement grâce aussi au choix de la méthode d'estimation précoce du rendement. Cette méthode possède, en revanche, sur le plan méthodologique et technique, les inconvénients suivants.

5.1.1. Réserves sur la méthode d'analyse caryologique employée

L'estimation précoce de l'efficacité des traitements n'est intéressante que dans la mesure où le classement des traitements testés ne change pas au cours de l'élevage. Il n'existe pas de travaux permettant d'affirmer que ce classement reste inchangé jusqu'au moment de la commercialisation. Cependant, l'optimisation, par C. Ledu, du traitement de triploïdisation chez l'huître *C. gigas*, sur la base d'une estimation précoce, a confirmé les résultats de Downing et Allen (1987), basés sur une estimation plus tardive sur du naissain âgé de deux à trois mois.

Par ailleurs, la technique employée peut engendrer quelques biais dans l'estimation des pourcentages d'hétéroplœides. Ces pourcentages s'estiment classiquement en déterminant individuellement la ploïdie d'un certain nombre d'animaux échantillonnés. Ici, l'estimation a été basée sur la fréquence de cellules hétéroplœides au sein d'une population de cellules émanant d'un certain nombre d'individus échantillonnés. Cette estimation est aussi fiable que la traditionnelle sous les hypothèses suivantes :

- tirage aléatoire des métaphases comptées,
- égalité du nombre de cellules en mitose chez des embryons ou des larves trochophores diploïdes et hétéroplœides au même âge,
- probabilité identique pour des métaphases diploïdes et hétéroplœides d'être comptables. Or, plus le nombre de chromosomes est important, plus la lecture est difficile (la probabilité de superposition augmente).

Sans connaître l'importance de ce biais, il est impossible d'apprécier la justesse de cette méthode d'estimation. Par contre, les estimations étant reproductibles, cette méthode autorise les comparaisons entre traitements, et donc leur optimisation.

5.1.2. L'efficacité des traitements dans la littérature

Trois types de traitements, la cytochalasine B, le choc thermique (chaud ou froid) et le choc hyperbare, ont été utilisés chez les bivalves et gastéropodes marins d'intérêt commercial. Les meilleurs traitements (plus ou moins optimisés) de chaque étude donnent de 25 % à presque 100 % d'embryons triploïdes, la plupart en produisant de 60 % à 80 % (tableau 17). La cytochalasine B semble avoir une efficacité comparable à celle des chocs thermiques, et un peu supérieure à celle des chocs de pression. Nos résultats sont, sur ce point, tout à fait comparables à ceux rapportés dans la littérature.

Il est cependant assez difficile de tirer des conclusions de ces comparaisons, notamment lorsqu'elles sont basées sur l'analyse d'embryons ou de larves. En effet, chaque équipe emploie une technique d'estimation qui lui est propre (cytofluorimétrie, microfluorimétrie, caryologie, comptage de globules polaires), et appliquée à des stades variés (depuis le moment du traitement jusqu'à plusieurs semaines de développement).

Les pourcentages de triploïdes semblent en général plus élevés dans le naissain ou chez les adultes que chez les larves. Il a été observé dans l'un de nos élevages une baisse du taux de triploïdes entre le stade embryonnaire et le stade naissain. On ne peut toutefois tirer des conclusions car Allen et Downing (1986) ont montré par ailleurs que ce pourcentage augmentait entre le stade naissain et le stade adulte.

5.1.3. Les types de triploïdes induits

Chez les mollusques, chacun des deux globules polaires peut être retenu. L'hétérozygotie globale est en théorie plus élevée si l'on retient le GP1, sous réserve d'un taux moyen de post-réduction inférieur à 2/3 (fig. 29).

Par ailleurs, de nombreux travaux, parmi lesquels ceux de Fujio (1982) et de Diehl et Koehn (1985), ont montré la corrélation positive entre le taux d'hétérozygotie et les performances de survie ou de croissance. La rétention du GP1 peut donc *a priori* sembler plus avantageuse et être recherchée.

Plusieurs comparaisons de survie ou de croissance, réalisées à divers stades chez *C. virginica*, *Haliotis discus hannai*, *C. gigas* et *Mytilus edulis*,

ont montré la supériorité des triploïdes "GP1" sur les triploïdes "GP2" et les témoins diploïdes (Stanley et al., 1984 ; Fujino et al., 1987 ; Yamamoto et al., 1988 ; Beaumont et Kelly, 1989). Les études où l'hétérozygotie globale a été estimée (5 ou 6 loci étudiés) ont montré que les triploïdes "GP1" possédaient une hétérozygotie supérieure à celle de leurs frères "GP2" (Allen et al., 1982 ; Stanley et al., 1984 ; Mason et al., 1988).

Les résultats de nos expériences d'induction ne permettent pas d'observer une distribution bimodale des pourcentages de triploïdes. La distribution obtenue est unimodale parce que la durée du traitement (15 mn) est égale au temps séparant les deux divisions de maturation. Les durées de traitement employées sur l'ormeau par Arai et al. (1986), sur l'huître creuse par Yamamoto et al. (1988) ou sur l'huître plate par Gendreau (1988) sont nettement plus courtes que l'intervalle de temps entre les expulsions des deux globules polaires. Ainsi, ils ont observé deux moments d'application distincts induisant la triploïdie.

Chez la palourde, d'après l'observation des moments d'apparition des globules polaires, les triploïdes produits par notre traitement optimal résultent probablement en partie de la rétention du GP1. Etant données les différences de survie entre les deux types de triploïdes, observées chez d'autres espèces, on peut s'attendre à une modification de cette proportion au cours de l'élevage.

5.1.4. Les performances larvaires des triploïdes

Des mortalités importantes sont systématiquement observées, au début de l'élevage larvaire, chez les individus traités avec la cytochalasine B, puis elles cessent après quelques jours (Allen, 1987a). Dans nos élevages, des mortalités ont été enregistrées presque jusqu'au moment de la métamorphose. Ce phénomène est peut-être à mettre au compte de notre manque d'expérience dans le domaine de l'élevage larvaire. Il n'existait notamment pas de protocole d'élevage publié pour le pétoncle et nous n'avons pas bénéficié d'une mise au point préalable comme pour la palourde (Dufy et Diter, 1990). La survie initiale peut être améliorée en réduisant la concentration de cytochalasine B (Stanley et al., 1981 ; Tabarini, 1984 ; Beaumont et Kelly, 1989). Par ailleurs, Beaumont et Contaris (1988) ont montré qu'une concentration de 0,5 mg/l de cytochalasine B n'est pas moins efficace que 1 mg/l pour l'induction de la triploïdie chez la

palourde japonaise. Cependant, il faut garder à l'esprit que la grande fertilité des bivalves d'intérêt commercial rend l'importance des mortalités enregistrées relativement mineure.

Le taux de croissance des lots triploïdisés n'a pas été différent de celui des témoins, pour la palourde comme pour le pétoncle. Cependant, dans l'un des élevages de palourdes, les individus traités ont conservé une taille moyenne plus faible jusqu'à la métamorphose. Un retard de ce type, qui peut être attribué à l'effet délétère du traitement, a aussi été constaté chez *C. gigas* par Allen (1987a) et Yamamoto et al. (1988). Notons que les triploïdes "GP1" rattrapent ce retard et dépassent même les témoins à la fin de l'élevage larvaire (Yamamoto et al., 1988 ; Beaumont et Kelly, 1989). Ainsi, en aucun cas, la triploïdie ne diminue la vitesse de croissance larvaire. Enfin, le taux de métamorphose ne semble pas non plus être affecté par la triploïdie (Allen, 1987a).

5.1.5. La gamétogenèse

La gamétogenèse de la palourde est clairement retardée dans le lot traité. Chez les mâles, elle est, de plus, altérée, comme l'attestent les figures de maturation atypique observées. L'échec de l'analyse caryologique (indice mitotique nul) a empêché momentanément de préciser davantage l'effet de la triploïdie sur la gamétogenèse. L'estimation de la ploïdie par microfluorimétrie permettra de combler cette lacune.

Chez toutes les autres espèces de bivalves étudiées, *Argopecten irradians*, *M. arenaria*, *C. gigas*, *C. virginica* et *Chlamys nobilis*, la gamétogenèse est retardée par la triploïdie (Tabarini, 1984 ; Allen et al., 1986 ; Allen et Downing, 1986 ; Allen, 1987b et Komaru et Wada, 1989). Dans les trois dernières espèces, la maturation est moins avancée chez les femelles que chez les mâles. La sex-ratio peut aussi être modifiée. Chez *C. nobilis*, il semble y avoir moins de femelles que de mâles (Komaru et Wada, 1989). Chez *M. arenaria*, on n'a observé aucun mâle (Allen et al., 1986).

Dans notre étude, la sex-ratio n'est pas déséquilibrée de façon significative.

5.2. Tétraploïdie diparentale

5.2.1. Choc hyperbare chez l'huître

L'un des traitements (durant 9 mn à 8 000 psi) a conduit, de façon assez surprenante, à de nombreux tétraploïdes (25 %) lorsqu'il a été appliqué très précocement (20 mn). Arai et al. (1986) ont rapporté un résultat similaire chez l'ormeau japonais, sans chercher à l'expliquer. Etant appliqué environ 10 mn avant l'expulsion du GP1, le traitement inhibe probablement la première division méiotique. On peut imaginer plusieurs voies pouvant conduire à la tétraploïdie dans ces conditions :

- la non participation à la seconde division méiotique du stock chromosomique diploïde qui a été retenu dans l'oeuf par l'inhibition de la méiose I. Le génome tétraploïde serait constitué ainsi de trois jeux de chromosomes d'origine maternelle et d'un jeu d'origine paternelle.

- l'inhibition simultanée de la participation du génome mâle (gynogenèse) et de la seconde division méiotique (par un effet rémanent du choc). Dans ce cas le génome tétraploïde serait constitué de quatre jeux chromosomiques d'origine maternelle.

Nous n'avons pas poursuivi nos investigations sur ce phénomène, préférant concentrer nos efforts sur l'inhibition de la première mitose.

Le plus fort pourcentage de tétraploïdes obtenu ne dépasse pas 40 %. Ceci peut paraître relativement faible mais les points de comparaison manquent chez les mollusques. Stiles et al. (1983) ont observé, chez l'huître américaine, qu'un choc de pression est capable de supprimer une division lorsqu'il est appliqué au début ou au milieu du clivage. Or, les deux traitements les plus efficaces ont été appliqués au moment du premier clivage. Les tétraploïdes induits ici pourraient donc être produits par l'inhibition de la première mitose. Il est difficile de l'assurer, car chez les amphibiens et les poissons, les chocs de pression efficaces sont appliqués pendant la métaphase (Reindschmidt et al., 1979 ; Streisinger et al., 1981).

Le traitement appliqué à 40 mn a produit des triploïdes probablement par rétention du GP2, normalement expulsé peu après (Downing et

Allen, 1987). Par contre, il est peu vraisemblable que la triploïdie ait pu être induite au moment du premier clivage. Ainsi, les métaphases apparemment triploïdes, enregistrées aux temps 60 et 70 mn, pourraient soit refléter un artéfact de la préparation caryologique (perte de chromosomes de métaphases tétraploïdes), soit provenir de réels aneuploïdes (hyperdiploïdes). En effet, des chocs hyperbares suboptimaux peuvent induire des aneuploïdes par rétention incomplète de l'un des jeux de chromosomes, chez les poissons (Chourrout, 1989).

Une forte proportion d'haploïdes a été observée lorsque le traitement était appliqué à 50 mn, soit après l'expulsion du GP2 et avant le premier clivage. Peut-être s'agit-il d'un indice pour l'induction de l'androgenèse comme dans le cas de la truite ou de la grenouille (Briedis et Elinson, 1982). Par ailleurs, il a été montré, chez l'oursin, qu'un choc de pression est capable de supprimer, comme chez la grenouille, la migration du pronucléus mâle (Zimmerman et Silberman, 1967).

Les élevages de tétraploïdes n'ont pas abouti. On ne doit pas en conclure pour autant que les chocs de pression sont inadaptés à l'induction de la tétraploïdie chez l'huître. En effet, les traitements employés ici ne peuvent être considérés comme réellement optimisés.

5.2.2. Traitement par la cytochalasine B chez la palourde

Les traitements qui ont produit les plus forts pourcentages d'embryons tétraploïdes (0 à 10 mn et 45 mn après insémination) ont, parallèlement, produit les pourcentages les plus bas de larves D et les plus importants de larves trochophores anormales. De plus, la survie des larves véligères a été très faible. Ces éléments et l'absence de naissain tétraploïde suggèrent que la tétraploïdie induite par ces traitements classiques avec la cytochalasine B est létale, au moins chez la palourde (Diter et Dufy, 1990).

5.2.2.1. La tétraploïdie chez les autres bivalves

Chez les huîtres *C. virginica* et *C. gigas*, aucun tétraploïde n'a été détecté dans le naissain, malgré l'observation antérieure d'embryons tétraploïdes (Stanley et al., 1981 ; Downing et Allen, 1987). Cependant les traitements n'étaient pas spécialement optimisés pour l'induction de la tétraploïdie. Ces auteurs ont testé des traitements espacés par des intervalles de

15 mn qui pouvaient, par conséquent, ne pas inclure l'optimum. Des intervalles plus courts ont été utilisés ici (3 ou 5 mn). Il était ainsi peu probable de ne pas tester le traitement optimal.

Chez la palourde, Beaumont et Contaris (1988) n'ont pas rapporté l'existence d'embryons tétraploïdes, à la suite de traitements très proches des nôtres (1 mg/l de CB, 0 - 15 mn, 23°C). De même Gosling et Nolan (1989) n'en ont (apparemment) pas observé, mais les moments d'application de leurs traitements ne sont pas indiqués.

Par contre, Yamamoto et Al. (1988) ont observé chez *C. gigas* jusqu'à 40 % d'embryons tétraploïdes, produits par leur traitement le plus précoce (1 mg/l de CB, 10 - 30 mn, 19°C). Ce lot présentait la survie la plus faible de tous ceux traités : 3,2 % à 24 h. Chez cette même espèce, Stephens et Downing (1989) ont produit un fort pourcentage de larves D tétraploïdes (91 % à 24 h). Ils ont traité les oeufs au moment de la formation du GP1. Grâce à la cytofluorimétrie, et en travaillant eux aussi sur un mélange d'individus, ils ont pu observer la disparition progressive des tétraploïdes au cours des 15 premiers jours de l'élevage larvaire.

5.2.2.2. Mécanismes impliqués dans l'induction de la tétraploïdie

La nature euploïde des embryons tétraploïdes produits ici ne peut être certifiée, puisque notre technique d'estimation de la ploïdie ne permet pas de détecter les individus mosaïques ou aneuploïdes.

La tétraploïdie a été induite à deux moments bien différents du développement, et donc probablement par deux mécanismes différents. Le traitement tardif appliqué pendant le premier clivage a produit un faible pourcentage de tétraploïdes (au mieux 33 %). Ceux-ci sont probablement de vrais tétraploïdes, résultant de l'inhibition de la première division mitotique de l'oeuf.

Plus surprenante a été l'induction des très forts taux de tétraploïdie par les traitements les plus précoces. Débutant lors de l'insémination ou peu après, ces traitements précèdent ceux qui induisent la triploïdie. D'après nos observations (fig. 20) et celles de Beaumont et Contaris (1988) et de Gosling et Nolan (1989), ces traitements (0 - 15 mn à 10 - 25 mn) sont censés retenir une

certaine proportion de GP1, mais pas le GP2 qui se forme après le temps 25 mn. Stephens et Downing (1989) ont effectivement observé que des traitements similaires retenaient le GP1 mais pas le GP2, chez *C. gigas*. Par ailleurs, il a été démontré, par l'analyse des allozymes chez *C. virginica* et *M. arenaria*, que l'inhibition de la méiose I par la cytochalasine B produit des triploïdes (Stanley et al., 1984 ; Mason et al., 1988). Par conséquent, un mécanisme supplémentaire (s'ajoutant à l'inhibition de la méiose I) est supposé intervenir pour produire ce type de tétraploïdes.

Ce mécanisme pourrait être la suppression (ou le retard) de la caryogamie suivie d'une inhibition de la première mitose, comme étant les conséquences d'un retard de la pénétration du spermatozoïde dans l'oeuf. En effet, la cytochalasine B, appliquée au moment de la fécondation ou peu après, est capable d'inhiber la pénétration du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'oeuf, sans supprimer l'activation du développement, chez divers invertébrés marins dont le bivalve *Spisula solidissima* (Gould-Somero et al., 1977 ; Longo, 1978 ; Schatten et Schatten, 1981). Quand la cytochalasine B est retirée, "l'internalisation" du spermatozoïde reprend normalement (Gould-Somero et al., 1977). Chez les invertébrés, le sperme apporte, outre le pronucléus mâle, les centrioles autour desquels se forme le spermaster, impliqué dans la migration des pronucléus et la caryogamie (Schatten et Schatten, 1981 ; Longo, 1983 ; Sawada et Schatten, 1988, 1989). Le spermaster participe aussi à l'élaboration des asters mitotiques nécessaires au premier clivage (Vogel et Angenmann, 1967 ; Sawada, 1988 ; Sawada et Schatten, 1989). Ainsi un retard de pénétration du spermatozoïde, causé par la cytochalasine, pourrait retarder la formation de l'appareil mitotique. Ce dernier ne serait pas opérationnel au moment normal de la disjonction mitotique qui, par conséquent, ne se produirait pas.

A ce moment, seraient présents dans l'oeuf 1 jeu de chromosomes d'origine paternelle et 4 jeux d'origine maternelle, ceux-ci résultant donc de l'inhibition de la méiose I et de la première mitose.

Le retard provoqué par la cytochalasine B serait aussi long que la durée du traitement, soit 15 mn (Gould-Somero et al., 1977). Ainsi, le fuseau mitotique serait en place pour la mitose suivante qui s'achève environ 20 mn après la première (fig. 20).

Différents génomes (pentaploïde, mosaïque tétra-pentaploïde ou haplo-tétraploïde, tétraploïde gynogénétique) peuvent résulter d'un tel mécanisme, en fonction de l'élimination ou de la fusion du pronucléus mâle haploïde avec le noyau femelle tétraploïde et du moment où elle s'opère. Dans les lots issus des traitements précoces, des métaphases hypertétraploïdes, pouvant provenir de cellules aneuploïdes ou pentaploïdes, ont été observées. Yamamoto et al. (1988) ont aussi noté la présence de cellules pentaploïdes produites par des traitements similaires.

Des éléments pourraient être apportés par l'analyse histologique des oeufs traités. L'inactivation sélective de l'un des génomes parentaux permettrait aussi de déduire l'origine du génome tétraploïde observé. C'est pourquoi des traitements précoces avec la cytochalasine B ont été appliqués à des oeufs gynogénétiques (chez *C. gigas*).

5.3. Gynogenèse chez l'huître

La gynogenèse induite a été très peu explorée chez les mollusques. Il existe quelques études de mise au point de l'inactivation génétique du sperme mais aucune ne rapporte l'obtention d'animaux viables par restauration de la diploïdie.

5.3.1. Inactivation génétique du sperme

L'inactivation génétique du sperme a été réalisée essentiellement sur la base de la motilité du sperme et de l'analyse caryologique. Il n'a pas été recherché d'effet Hertwig ou de "pseudo effet Hertwig" observé chez la truite avec les UV (Chourrout, 1982a). Il n'a pas non plus été utilisé de marqueur génétique visible de gynogenèse, on n'en connaît pas encore chez les bivalves* (Allen, 1987a). Enfin, la gynogenèse a été recherchée avec du sperme homologue.

* Une recherche dans ce sens avait été initiée chez la palourde où un motif particulier avait été observé sur des coquilles dans des proportions variant nettement d'une ponte à l'autre. Malheureusement, la mauvaise qualité d'eau de l'été 1989 a interrompu les élevages.

La décroissance progressive du nombre chromosomique des embryons avec l'augmentation de l'irradiation du sperme plaide en faveur de la nature gynogénétique des haploïdes obtenus. De plus, la dose efficace représente au moins les 2/3 de celle qui immobilise le sperme, comme c'est souvent le cas chez les amphibiens et les poissons (Jaylet et Ferrier, 1978 ; Chourrout, comm. pers.).

Les rayons X ont été utilisés chez *C. virginica*, mais semblent avoir une efficacité réduite du fait de la persistance des fragments chromosomiques d'origine paternelle (Stiles, 1978 ; Allen, 1987a). Comme chez la plupart des vertébrés (revue de Chourrout, 1982b), les rayons UV se sont révélés efficaces chez les mollusques *C. virginica* (Stiles et al., 1983), *H. discus hannai* (Arai et al., 1984), *Mulinia lateralis* (Scarpa, 1985, in Allen, 1987a) et *C. gigas* (résultats non publiés, in Allen, 1987a).

Les irradiations rapportées dans la littérature sont difficilement comparables étant donné le nombre de paramètres entrant en ligne de compte (puissance du rayonnement au niveau de la surface de la suspension de sperme, hauteur du liquide irradié, concentration du sperme, etc...). Aucune des publications ne donne la totalité des informations avec précision.

D'après Allen (1987a), la viabilité des haploïdes semble ne pas dépasser le stade trochophore chez *C. gigas*. Chez *C. virginica* et *H. discus hannai*, il n'est pas précisé à partir de quel stade l'haploïdie est létale (Stiles, 1978 ; Arai et al., 1984). Nos observations concordent avec celles d'Allen (1987a), puisqu'aucune larve D n'a été observée dans les lots haploïdes.

5.3.2. Restauration de la diploïdie

Le traitement avec la cytochalasine B, retenant un globule polaire, semble très efficace pour la restauration de la diploïdie. Il n'a pas été observé de fragments de chromatine ou d'aberrations chromosomiques dans ces métaphases diploïdes. De même, il est intéressant d'avoir observé des larves D, même en taux assez faibles. Si ces larves s'avéraient viables, il serait alors possible d'en vérifier l'origine parentale grâce notamment à des marqueurs enzymatiques.

Outre les effets cumulés des deux traitements, la consanguinité peut être la cause des faibles taux de larves D observés. Elle mène classiquement à des diminutions multiples de performances chez les espèces allogames. Cependant, l'élimination des gènes létaux et délétères au cours des générations successives de gynogenèse peut permettre une nette amélioration des performances (Streisinger et al., 1981).

5.3.3. Induction de la tétraploïdie

Des résultats comparables à ceux obtenus chez la palourde ont été enregistrés chez l'huître avec du sperme normal. Un traitement précoce avec la cytochalasine B induit des tétraploïdes et des pentaploïdes. Toutefois, les métaphases pentaploïdes ont été beaucoup plus nombreuses chez l'huître. Ces résultats se rapprochent des observations de Yamamoto et al. (1988) chez cette même espèce.

Parallèlement, des métaphases tétraploïdes (et aucune de ploïdie supérieure) ont été enregistrées avec les oeufs gynogénétiques. Ceci soutient l'hypothèse de l'origine maternelle du génome tétraploïde observé avec le sperme normal (voir Discussion 5.2.2.2.). Cependant ce résultat n'apporte pas d'information supplémentaire sur les mécanismes impliqués dans l'apparition de ce génome.

Il semble qu'Allen ait tenté, chez *C. gigas*, de supprimer les deux divisions de méiose par un bain de caféine après une activation gynogénétique de l'oeuf (résultats non publiés, *in* Allen, 1987a). Il aurait ainsi obtenu des larves tétraploïdes gynogénétiques qui se seraient rapidement révélées inviabies.

L'arrêt prématuré de nos élevages nous prive d'une intéressante comparaison.

CONCLUSION

1. ANDROGENESE

Les résultats montrent qu'un choc de pression peut induire l'androgénèse lorsqu'il est appliqué sur des oeufs intacts, mais un effort d'optimisation est nécessaire pour disposer d'un traitement fiable. Cette méthode a encore l'atout de l'originalité chez les poissons. Elle possède des avantages pratiques évidents sur la méthode classique d'irradiation des ovules (rayons gamma). Et sur le plan génétique, elle s'affranchit, sous réserve d'un traitement optimisé, du risque de la persistance de fragments chromosomiques d'origine maternelle.

L'utilisation du sperme de mâle tétraploïde pour l'obtention directe d'androgénétiques diploïdes semble être compatible avec cette technique d'induction. Ainsi, associée à la technique de congélation du sperme, elle permettrait la conservation de souches hétérozygotes.

La nature androgénétique des produits obtenus demande à être confirmée, bien que des arguments aient été apportés en sa faveur.

2. GYNOGENESE ET TETRAPLOIDIE

Le choc chaud semble désormais aussi efficace que le choc de pression pour supprimer la première mitose chez la truite arc-en-ciel. Les traitements les plus intenses, qui s'accompagnent de faibles survies, sont en effet capables d'induire le doublement du génome chez 100 % des embryons. On pourrait ainsi produire des populations entièrement tétraploïdes. Des traitements plus modérés ont un rendement plus faible mais induisent des survies plus élevées, comparables à celles résultant des chocs de pression. Des lignées gynogénétiques peuvent donc être créées par cette technique, comme l'a confirmé ultérieurement E. Quillet (comm. pers.). La grande variabilité de rendement observée entre les pontes individuelles peut, d'une part, réduire assez fortement le nombre de lignées produites, et d'autre part, introduire un facteur de sélection supplémentaire, différent des gènes létaux ou délétères. Ceci pourrait réduire la variance interlignée recherchée. L'homozygotie des gynogénétiques induits par ces traitements a été confirmée. Enfin, la méthode de mise au point du traitement s'est révélée efficace et rapide.

Chez l'huître, l'inactivation génétique du sperme par les UV est relativement aisée à mettre au point, moyennant quelques précautions. Cette

technique devrait être aisément transposable chez d'autres espèces. Les haploïdes sont anormaux et n'atteignent pas le stade larve D. La diploïdie peut être efficacement restaurée en retenant un globule polaire grâce au traitement classique par la cytochalasine B. L'utilisation de sperme hétérologue approprié comme marqueur de gynogenèse apporterait une confirmation élégante de la nature gynogénétique des larves D obtenues. La viabilité des gynogénétiques diploïdes n'a pu être démontrée, pas plus que leur nature inviable. Si la gynogenèse est létale, l'autofécondation peut se présenter comme la voie privilégiée d'augmentation de la consanguinité chez les espèces hermaphrodites protandres, comme l'huître creuse, grâce à la congélation du sperme (Lannan, 1971).

La tétraploïdisation d'oeufs gynogénétiques haploïdes peut se révéler une voie prometteuse. Elle est originale chez les animaux d'élevage. Chez les amphibiens, des tétraploïdes gynogénétiques ont été obtenus accidentellement, probablement par un effet rémanent, sur la première mitose, du choc de température appliqué lors de l'achèvement de la méiose II (Jaylet et Ferrier, 1978). Les mécanismes qui conduisent à la gynogenèse tétraploïde chez l'huître ne sont pas élucidés. Cependant, l'étude de la littérature concernant les diverses actions de la cytochalasine B nous a amené à formuler une hypothèse pouvant expliquer son origine (voir Discussion 5.2.2.2. et 5.3.3.). Des analyses histologiques de l'oeuf doivent être entreprises afin de la tester.

Comme pour la gynogenèse diploïde, ni la létalité, ni l'innocuité de la gynogenèse tétraploïde n'ont pu être démontrées.

Une autre voie intéressante d'obtention de tétraploïdes pourrait être la rétention des deux globules polaires après activation gynogénétique de l'oeuf. Ce schéma conduirait à des individus possédant, à l'état tétraploïde, le même génome (aux recombinaisons près) que la mère diploïde.

La production d'embryons tétraploïdes est possible chez l'huître grâce à un choc de pression inhibant la première mitose d'oeufs diploïdes. Une optimisation plus poussée de ce type de traitement est nécessaire avant de pouvoir conclure à la nature inviable de ces génotypes.

Si les tétraploïdes sont viables, il ne seront intéressants pour l'éleveur que s'ils s'avèrent fertiles et qu'ils produisent des gamètes diploïdes équilibrés.

3. TRIPLOIDIE

L'induction de la triploïdie par la cytochalasine B ne pose pas de difficultés particulières chez les bivalves. La technique peut d'ailleurs être rapidement transposée à d'autres espèces (cas du pétoncle). Pendant l'élevage larvaire, le taux de croissance des lots triploïdisés est identique à celui des témoins. Cependant, la taille moyenne des larves des lots traités peut être inférieure à celle des témoins. La survie des lots traités est toujours plus faible que celle des témoins (environ 20 %). Cependant, la grande fertilité de la plupart des mollusques d'élevage autorise une mortalité importante, même pour une production en éclosion privée.

Une chute du pourcentage de triploïdes peut intervenir pendant l'élevage entre le stade embryonnaire et le stade juvénile (naissain).

Chez la palourde, une étude préliminaire a montré que la gamétogenèse était retardée dans les lots triploïdisés. La spermatogenèse peut, de plus, être atypique. L'effet bénéfique de cette maturation perturbée sur la croissance devra être montré.

4. CONCLUSION GENERALE

Les méthodes de manipulations chromosomiques développées chez les poissons ne sont pas toutes aisément transposables chez les mollusques bivalves. Nos essais d'induction de la tétraploïdie illustrent ces difficultés. Cependant, les travaux rapportés ici ne sont que préliminaires pour la plupart. Ils proposent quelques voies possibles pour l'obtention de génomes nouveaux, intéressants notamment (mais pas exclusivement) dans le cadre de l'amélioration génétique.

Malgré la variété des techniques de manipulation et des génomes qui en résultent, on peut s'attendre encore à quelques nouveautés dans ce domaine. L'induction de la tétraploïdie associée à la gynogenèse (à partir de femelles diploïdes) en est un exemple. L'observation inattendue de tels phénomènes pourrait être à l'origine d'applications plus larges en révélant l'existence de mécanismes cellulaires qui restent à explorer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen, S.K., Jr., 1987a. Genetic manipulations : critical review of methods and performances, shellfish. *In Proc World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May 1986, Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, pp. 127-144.*
- Allen, S.K., Jr., 1987b. Gametogenesis in three species of triploid shellfish : *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. *In Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May 1986, Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, pp. 207-218.*
- Allen, S.K., JR. and Downing, S.L., 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 102 : 197-208.
- Allen, S.K., Jr., Downing, S.L., Chaiton, J. and Beattie, J.H., 1986a. Chemically and pressure-induced triploidy in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57 : 359-360.
- Allen, S.K., Jr., Gagnon, P.S. and Hidu, H., 1982. Induced triploidy in the soft-shell clam. Cytogenetic and allozymic confirmation. *J. Heredity*, 73 : 421-428.
- Allen, S.K., Jr., Hidu, H. and Stanley, J.G., 1986b. Abnormal gametogenesis and sex ratio in triploid soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Biol. Bull.*, 170 : 198-210.
- Allendorf, F.W., Mitchell, N., Ryman, N. and Stahl G., 1977. Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.) : detection and interpretation from population data. *Hereditas*, 86 : 179-190.
- Allendorf, F.W. and Utter F.M., 1978. Population genetics of fish. *In Fish Physiology*, vol. 8., W.S. Hoar, D.J. Randall and J.R. Brett Eds., Academic Press, New-York, pp. 407-454.

- Arai, K., Naito, F. and Fujino, K., 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52 : 417-422.
- Arai, K., Naito, F., Sasaki, H. and Fujino, K., 1984. Gynogenesis with ultraviolet ray irradiated sperm in the Pacific abalone. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 50 : 2019-2023.
- Arai, K. and Wilkins, N.P., 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. *Aquaculture*, 64 : 97-103.
- Astaurov, B.L., 1969. Experimental polyploidy in animals. *Annu. Rev. Genet.*, 3 : 99-126.
- Baron, J., Diter, A. and Bodoy, A., 1989. Triploidy induction in the black scallop (*Chlamys varia* L.) and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture*, 77 : 103-111.
- Beaumont, A.R., 1986. Genetic aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Aquaculture*, 57 : 99-110.
- Beaumont, A.R. and Contaris, M.H., 1988. Production of triploid embryos of *Tapes semidecussatus* by the use of cytochalasin B. *Aquaculture*, 73 : 37-42.
- Beaumont, A.R. and Gruffydd, Ll. D., 1974. Studies on the chromosomes of the scallop *Pecten maximus* (L.) and related species. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 54 : 713-718.
- Beaumont, A.R. and Kelly, K., 1989. Production of triploid *Mytilus edulis* larvae and heterotic effects on their growth. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 132 : 69-84.
- Billard, R., 1974. L'insémination artificielle chez la truite *Salmo gairdneri* Richardson. 4 : Effet des ions K et Na sur la conservation de la fertilité des gamètes. *Bull. Fr. Pisc.*, 256 : 88-100.

- Blakeslee, A.F. and Avery, A.G., 1937. Methods of inducing chromosome doubling in plants by treatment with colchicine. *Science*, 86 : 408.
- Blanc, J.M., Chourrout, D. and Krieg, F., 1987. Evaluation of juvenile rainbow trout survival and growth in half-sib families from diploid and tetraploid sires. *Aquaculture*, 65 : 215-220.
- Briedis, A. and Elinson, R.P., 1982. Suppression of male pronuclear movement in frog eggs by hydrostatic pressure and deuterium oxide yields androgenetic haploids. *J. Exp. Zool.*, 222 : 45-57.
- Chaiton, J.A. and Allen S.K., Jr., 1985. Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, 48 : 35-43.
- Chevassus, B., 1987. Caractéristiques et performances des lignées uniparentales et des polyploïdes chez les poissons d'eau froide. *In Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, Bordeaux 27-30 May, 1986. Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, pp. 145-161.
- Chevassus, B., Devaux, A., Chourrout, D. and Jalabert, B., 1988. Production of YY rainbow trout males by self-fertilization of induced hermaphrodites. *J. Heredity*, 79 : 89-92.
- Chourrout, D., 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reprod. Nutr. Develop.*, 20 : 727-733.
- Chourrout, D., 1982a. Gynogenesis caused by ultraviolet irradiation of salmonid sperm. *J. Exp. Zool.*, 223 : 175-181.
- Chourrout, D., 1982b. La gynogenèse chez les vertébrés. *Reprod. Nutr. Develop.*, 22 : 713-734.
- Chourrout, D., 1982c. Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.*, 22 : 569-574.

- Chourrout, D., 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout : production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36 : 111-126.
- Chourrout, D., 1986. Use of grayling sperm (*Thymallus thymallus*) as a marker for the production of gynogenetic rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Theor. Appl. Genet.*, 72 : 633-636.
- Chourrout, D., 1987. Genetic manipulations in fish : review of methods. *In Proc. World Symp. Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture.*, Bordeaux 27-30 May 1986, Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, pp. 111-126.
- Chourrout, D., 1989. Gynogenèse, polyplôidie et transfert de gènes chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Thèse de Doctorat de l'université Paris VI, 60 p.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G. and Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females. Potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.*, 72 : 193-206.
- Chourrout, D. and Happe, A., 1986. Improved methods of direct chromosome preparation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 52 : 255-261.
- Chourrout, D. and Nakayama, I., 1987. Chromosome studies of progenies of tetraploid female rainbow trout. *Theor. Appl. Genet.*, 74 : 687-692.
- Chourrout, D. and Quillet, E., 1982. Induced gynogenesis in the rainbow trout : sex and survival of progenies. Production of all-triploid populations. *Theor. Appl. Genet.*, 63 : 201-205.
- Crozier, W.W. and Moffett, I.J.J., 1989. Application of an electrophoretically detectable genetic marker to ploidy testing in brown trout (*Salmo trutta* L.) triploidised by heat shock. *Aquaculture*, 80 : 231-239.

- Diehl, W.J. and Koehn, R.K., 1985. Multiple-locus heterozygosity, mortality, and growth in a cohort of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 88 : 265-271.
- Diter, A., 1985. Etude de la ségrégation des gènes chez des mâles tétraploïdes induits de truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* R.). Mémoire de DEA, Univ. Paris VI, 26 p.
- Diter, A. and Dufy, C., 1990. Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II - Chemical induction of tetraploid embryos. *Aquat. Liv. Resour.*, 3 : 107-112.
- Diter, A., Guyomard, R. and Chourrout, D., 1988. Gene segregation in induced tetraploid rainbow trout : genetic evidence of preferential pairing of homologous chromosomes. *Genome*, 30 : 547-553.
- Downing, S.L. and Allen, S.K., Jr., 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61 : 1-15.
- Dufy, C. and Diter, A., 1990. Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. I - Chemical induction and larval performances of triploids. *Aquat. Liv. Resour.*, 3 : 55-60.
- Falconer, D.S., 1982. Introduction to quantitative genetics. Longman Ed., New-York.
- Foisil, L., 1986. Inhibition de la méiose II chez la truite fario et de la première division de mitose chez la truite arc-en-ciel. Mémoire de DEA, Univ. Paris-Sud, 28 p.
- Fujino, K., Okumura, S. and Inayoshi, H., 1987. Temperature tolerance differences among normal diploid and triploid Pacific abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 15-21.
- Fujio, Y., 1982. A correlation of heterozygosity with growth rate in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J. Agri. Res.*, 33 : 66-75.

- Gabbott, P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. *In the Mollusca*, vol. 2, K.M. Wilbur Ed., Academic Press, New-York, pp. 165-217.
- Gendreau, S., 1988. Fécondation *in vitro* et induction de la polyploïdie chez l'huître plate larvipare, *Ostrea edulis*, L. Mémoire de DEA, Univ. Bret. Occi., Brest, 30 p.
- Gérard, A., 1978. Recherches sur la variabilité de diverses populations de *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* (Veneridae, Bivalvia). Thèse de Doctorat 3ème cycle, Univ. Bret. Occid., Brest, 149 p.
- Gorenflot, R. et Raicu, P., 1980. Cytogénétique et évolution. Masson, Paris, 181 p.
- Gosling, E.M. and Nolan, A., 1989. Triploidy induction by thermal shock in the Manila clam, *Tapes semidecussatus*. *Aquaculture*, 78 : 223-228.
- Gould-Somero, M., Holland, L. and Paul, M., 1977. Cytochalasin B inhibits sperm penetration into eggs of *Urechis caupo* (Echiura). *Dev. Biol.*, 58 : 11-22.
- Gruffydd, Ll. D. and Beaumont, A.R., 1970. Determination of the optimum concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* (Mollusca, Lamellibranchia). *Helgoländer Wiss. Meeresunters*, 20 : 486-497.
- Guyomard, R., 1984. High level of residual heterozygosity in gynogenetic rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *Theor. Appl. Genet.*, 67 : 307-316.
- Guyomard, R., 1986. Gene segregation in gynogenetic brown trout (*Salmo trutta* L.) : systematically high frequencies of post-reduction. *Genet. Sel. Evol.*, 18 : 385-392.
- Guyomard, R. and Krieg, F., 1983. Electrophoretic variation in six populations of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Can. J. Genet. Cytol.*, 25 : 403-413.

- Hanocq-Quertier, J., Baltus, E. and Brachet, J., 1987. Cytological effects of heat-shocks on *Xenopus* oocytes and eggs. *Develop. Growth Differ.*, 29 : 25-35.
- Hertwig, O., 1911. Die radiumkrankheit tierischer keimzellen. *Arch. Mikr. Anat.*, 77 : 1-97.
- Jaylet, A. and Ferrier, V., 1978. Experimental gynogenesis in the newt species *Pleurodeles waltlii* and *P. poireti*. *Chromosoma (Berl.)*, 69 : 65-80.
- Kobayashi, T., Enomoto, R., Sakasaki, R. and Kuwuhura, S., 1963. A new selective isolation medium for pathogenic vibrios : TCBS agar. *Jpn. J. Bacteriol.*, 18 : 387-391.
- Komaru, A., Uchimura, Y., Ieyama, H. and Wada, K.T., 1988. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture*, 69 : 201-209.
- Komaru, A. and Wada, K.T., 1989. Gametogenesis and growth of induced triploid scallops *Chlamys nobilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 : 447-452.
- Lannan, J.E., 1971. Experimental self-fertilization of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, utilizing cryopreserved sperm. *Genetics*, 68 : 599-601.
- Lannan, J.E., Robinson, A. and Breese, W.P., 1980. Broodstock management of *Crassostrea gigas*. II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*, 21 : 337-345.
- Longo, F.J., 1978. Effects of cytochalasin B on sperm-egg interactions. *Dev. Biol.*, 67 : 157-173.
- Longo, F.J., 1983. Meiotic maturation and fertilization. *In* *The Mollusca*, vol. 3, K.M. Wilbur Ed., Academic Press, New-York, pp. 49-89.
- Longwell, A.C. and Stiles, S.S., 1968. Removal of yolk from oyster eggs by Soxhlet extraction for clear chromosome preparations. *Stain Techn.*, 43 : 63-68.

- Longwell, A.C. and Stiles, S.S., 1973. Gamete cross incompatibility and inbreeding in the commercial American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Cytologia*, 38 : 521-533.
- Loosanoff, V.L. and Davis, M.C., 1963. Rearing of bivalve mollusks. *Adv. Mar. Biol.*, 1 : 1-136.
- Lou, Y.D. and Purdom, C.E., 1984a. Diploid gynogenesis induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Biol.*, 24 : 665-670.
- Lou, Y.D. and Purdom, C.E., 1984b. Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Biol.*, 25 : 345-351.
- Mason, K.M., Shumway, S.E., Allen, S.K., Jr. and Hidu, H., 1988. Induced triploidy in the soft-shelled clam *Mya arenaria* : energetic implications. *Mar. Biol.*, 98 : 519-528.
- May, B., 1980. The salmonid genome : evolutionary restructuring following a tetraploid event. Ph. D. Thesis. Pennsylvania State University.
- May, B., Henley, K.J., Krueger, C.C. and Gloss, S.P., 1988. Androgenesis as a mechanism for chromosome set manipulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 75 : 57-70.
- Morriconi, E. et Calvo, J., 1979. Ciclo reproductivo y alternancia de sexos en *Ostrea puelchana*. *Physis*, A, 38 (95) : 1-17.
- Muranaka, M.S. and Lannan, J.E., 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas* : environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, 39 : 217-228.
- Onozato, H., 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. *Aquaculture*, 43 : 91-97.

- Oppenheimer, C.H. and Zobell, C.E., 1952. The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.*, 11 : 10-18.
- Parsons, J.E. and Thorgaard, G.H., 1985. Production of androgenetic diploid rainbow trout. *J. Heredity*, 76 : 177-181.
- Quillet, E. and Panelay, P.J., 1986. Triploidy induction by thermal shocks in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 57 : 271-279.
- Reindschmidt, D.C., Simon, S.J., Volpe, E.P. and Tompkins, R., 1979. Production of tetraploid and homozygous diploid amphibians by suppression of first cleavage. *J. Exp. Zool.*, 210 : 137-143.
- Robinson, A.M. and Breese, W.P., 1984. Gonadal development and hatchery rearing techniques for the Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). *J. Shellfish Res.*, 4 : 161-163.
- Rostand, J., 1934. Gynogenèse du crapaud par refroidissement de l'oeuf. *C.R. Soc. Biol., Paris*, 115 : 1680-1681.
- Sawada, T., 1988. The mechanism of ooplasmic segregation in the ascidian egg. *Zool., Sci.*, 5 : 667-675.
- Sawada, T. and Schatten, G., 1988. Microtubules in ascidian eggs during meiosis, fertilization and mitosis. *Cell Motil. Cytoskel.*, 9 : 219-230.
- Sawada, T. and Schatten, G., 1989. Effects of cytoskeletal inhibitors on ooplasmic segregation and microtubule organization during fertilization and early development in the ascidian *Molgula occidentalis*. *Develop. Biol.*, 132 : 331-342.
- Schatten, G. and Schatten, H., 1981. Effects of motility inhibitors during sea urchin fertilization. *Exp. Cell Res.*, 135 : 311-330.
- Scheerer, P.D., Thorgaard, G.H. and Allendorf, F., 1990. Genetic analysis of androgenetic rainbow trout. *J. Exp. Zool.*, (sous presse).

- Schwartz, D., 1969. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes, 3ème éd., Flammarion Ed., Paris, 318 p.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J., 1981. Biometry. 2ème éd. W.H. Freeman and Company Ed., New-York, pp. 747-765.
- Spearman, C., 1904. General intelligence objectively determined and measured. Am. J. Psych., 15 : 88.
- Stanley, J.G., Allen, S.K., Jr. and Hidu, H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. Aquaculture, 23 : 1-10.
- Stanley, J.G., Hidu, H. and Allen, S.K., Jr., 1984. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. Aquaculture, 37 : 147-155.
- Stephens, L.B. and Downing, S.L., 1989. Inhibiting first polar body formation in *Crassostrea gigas* produces tetraploids, not meiotic I triploids. J. Shellfish. Res., 7 : 550.
- Stiles, S.S., 1978. Conventional and experimental approaches to hybridization and inbreeding research in the oyster. In Proc. 9th Annu. Meet., World Mariculture Society, J.W. Avault Ed., pp. 577-586.
- Stiles, S.S., Choromanski, J. and Longwell, A.C., 1983. Cytological appraisal of prospects for successful gynogenesis, parthenogenesis and androgenesis in the oyster. I.C.E.S., Mariculture Committee, papier F : 10, 14 p.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. and Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature, 291 : 293-296.
- Sutterlin, A.M., Holder, J. and Benfey, T.J., 1987. Early survival rates and subsequent morphological abnormalities in landlocked, anadromous and hybrid (landlocked x anadromous) diploid and triploid Atlantic salmon. Aquaculture, 64 : 157-164.

- Tabarini, C.L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42 : 151-160.
- Thiriot-Quiévreux, C. et Ayraud, N., 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. *Mar. Biol.*, 70 : 165-172.
- Thiriot-Quiévreux, C., Insua Pombo, A.M. et Albert, P., 1989. Polyploïdie chez un bivalve incubant, *Lasea rubra* (Montagu). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 308 (III) : 115-120.
- Thompson, D. and Purdom, C.E., 1986. Induced diploid gynogenesis by mitotic interference in rainbow trout. *Aquaculture*, 57 : 376.
- Thorgaard, G.H., 1983. Chromosomal differences among rainbow trout populations. *Copeia*, 1983 : 650-662.
- Thorgaard, G.H., Jazwin, M.E. and Stier, A.R., 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110 : 546-550.
- Thorgaard, G.H., Scheerer, P.D., Hershberger, W.K. and Myers, J.M., 1990. Androgenetic rainbow trout produced using sperm of tetraploid males show improved survival. *Aquaculture*, 85 : 215-221.
- Uchimura, Y., Komaru, A., Wada, K.T., Ieyama, H., Yamaki, M. and Furuta, H., 1989. Detection of induced triploidy at different ages for larvae of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, by microfluorometry with DAPI staining. *Aquaculture*, 76 : 1-9.
- Verdonk, N.H. and Van Den Biggelaar, J.A.M., 1983. Early development and the formation of the germ layers. *In The Mollusca*, vol. 3, K.M. Wilbur Ed., Academic Press, New-York, pp. 91-122.
- Vogel, G. et Angenmann, H., 1967. *Atlas de biologie*. Stock, Paris, p. 133.
- Wada, K.T., Komaru, A. and Uchimura, Y., 1989. Triploid production in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, 76 : 11-19.

Yamamoto, S. and Sugawara, Y., 1988. Induced triploidy in the mussel, *Mytilus edulis*, by temperature shock. *Aquaculture*, 72 : 21-29.

Yamamoto, S., Sugawara, Y., Nomura, T. and Oshino, A., 1988. Induced triploidy in Pacific oyster *Crassostrea gigas*, and performance of triploid larvae. *Tohoku J. Agric. Res.*, 39 : 47-59.

Zimmerman, A.M. and Silberman, L., 1967. Studies on incorporation of ³H-thymidine in *Arbacia* eggs under hydrostatic pressure. *Exp. Cell. Res.*, 46 : 469-476.

TABLE DES MATIERES

TOME I	Pages
<i>AVANT-PROPOS</i>	3
RESUME	7
ABSTRACT	8
INTRODUCTION	9
METHODES GENERALES D'INDUCTION	
1. DESTRUCTION D'UN GENOME PARENTAL	12
2. SUPPRESSION D'UNE DIVISION CELLULAIRE	12
PREMIERE PARTIE : LA TRUITE	
1. MANIPULATIONS DU STOCK CHROMOSOMIQUE CHEZ LES POISSONS	14
2. OBJECTIFS DE TRAVAIL	15
3. MATERIELS ET METHODES	16
3.1. Prélèvement des gamètes et insémination	16
3.2. Irradiation du sperme	16
3.3. Choc thermique	17
3.4. Choc de pression hydrostatique	19
3.5. Caryologie	20
3.6. Electrophorèse enzymatique	20
3.7. Analyse des données	21

4. RESULTATS	22
4.1. Induction de l'androgenèse	22
4.2. Inhibition de la première mitose	25
5. DISCUSSION	29
5.1. Induction de l'androgenèse	29
5.2. Suppression de la première mitose	32
SECONDE PARTIE : LES BIVALVES	
1. MANIPULATIONS DU STOCK CHROMOSOMIQUE CHEZ LES MOLLUSQUES	36
2. OBJECTIFS DE TRAVAIL	37
2.1. La triploïdie	37
2.2. La tétraploïdie	37
2.3. La gynogenèse	37
3. MATERIELS ET METHODES	38
3.1. Récolte des gamètes et insémination	38
3.2. Irradiation du sperme	39
3.3. Traitement avec la cytochalasine B	40
3.4. Choc de pression hydrostatique	41
3.5. Chronologie des premières divisions de l'oeuf de palourde	41
3.6. Caryologie	42
3.7. Elevage	42
3.8. Observation de la gamétogenèse chez la palourde	43
3.9. Analyse des données	44

4. RESULTATS	45
4.1. Mise au point de quelques méthodes de travail chez l'huître	45
4.2. Triploïdie chez la palourde	50
4.3. Triploïdie chez le pétoncle	53
4.4. Tétraploïdie diparentale chez la palourde	54
4.5. Tétraploïdie diparentale chez l'huître	56
4.6. Gynogenèse chez l'huître	56
5. DISCUSSION	59
5.1. Triploïdie	59
5.2. Tétraploïdie diparentale	64
5.3. Gynogenèse chez l'huître	68
CONCLUSION	
1. ANDROGENESE	71
2. GYNOGENESE ET TETRAPLOIDIE	71
3. TRIPLOIDIE	73
4. CONCLUSION GENERALE	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	74
TABLE DES MATIERES	86
TOME II (Illustrations)	89