

## Titre

Mécanismes cellulaires et moléculaires du blocage de la gamétogenèse chez l'huître creuse triploïde *Crassostrea gigas*.

Personne à contacter : Christophe Lelong, UMR BOREA, Université de Caen – Normandie, 14032 CAEN Cedex, [christophe.lelong@unicaen.fr](mailto:christophe.lelong@unicaen.fr), 02 31 56 52 93.

## Contexte général du projet

La conchyliculture en Région Basse Normandie constitue une activité importante, classant la région actuellement à la 3<sup>ème</sup> place en production d'huîtres (environ 20% de la production nationale)[1]. Depuis, l'ostréiculture française s'est diversifiée par la production d'huîtres triploïdes ( $3n$ ), né de la volonté d'annualiser la consommation en proposant des animaux stériles avec une qualité organoleptique équivalente sur l'année. Un second intérêt est de gagner un an d'élevage, sur les 3 ans habituels chez les huîtres diploïdes ( $2n$ ). Initialement induite par chocs thermique ou chimique, la triploïdisation des huîtres est maintenant assurée par le croisement d'huîtres  $2n$  avec des huîtres tétraploïdes ( $4n$ )[2], [3].

Cependant, différents travaux ont montré la capacité d'une certaine catégorie d'huîtres  $3n$  ( $3n\alpha$ ) à mener une gamétogenèse[4], [5]. Force est de constater la forte plasticité gamétogénétique de cette espèce assurant pour les animaux polyploïdes à nombre pair ( $2n$  et  $4n$ ) la capacité de mener une reproduction complète, et une reproduction nulle ou très faible chez les animaux  $3n$  ( $3n\beta$ )[5], [6]. D'autres études ont également montré les cas d'aneuploïdie élevée (proche de 25-35% et généralement de l'hypoploïdie), de réversion ( $2n$  vers  $3n$ ) et de mosaïcisme hétéroploïde chez les huîtres  $3n$ [3], [7]–[10]. Ces constats aboutissent à un premier questionnement sur l'impact des animaux polyploïdes et aneuploïdes sur les populations naturelles en cas d'échappement en termes d'aquaculture durable. Ces mécanismes accroissent le risque d'augmenter les capacités reproductives des animaux et leur échappement, originellement non natifs de l'Europe. De même, la polyploïdisation des espèces est un moteur de la spéciation soit par allopoloïdie, soit par autopolloïdie et de fait, entraîne une compétition adaptative entre les animaux polyploïdes et  $2n$ . Fréquent chez les plantes, peu de travaux chez les animaux ont argumenté ce fait, sauf chez des espèces de rainettes ou de daphnies où la polyploïdisation semble accroître la tolérance des animaux polyploïdes aux variations climatiques[11], [12].

D'un point de vue scientifique, cette plasticité gamétogénétique est-elle en lien avec des mécanismes mis en jeu pendant la production des animaux polyploïdes? En effet, les processus cellulaires et moléculaires, se déroulant pendant la production des gamètes et pendant la fécondation, puis chez l'adulte sont assez peu connus. Cependant, la méthode actuelle d'obtention des géniteurs  $4n$  nécessite certainement une gynogenèse chez l'ovocyte, même si Guo et al [13] n'ont pas pu stabiliser la population  $4n$  dans leur étude. Généralement, la faible fécondité est attribuée à une mauvaise ségrégation chromosomique pendant la méiose avec la production de gamètes aneuploïdes. Seulement l'ensemble des mécanismes de ségrégation a été étudié surtout sur les tissus somatiques (branchies) ou pendant la méiose[8], [14] et sur des

animaux produits selon les méthodes antérieures à celle employée maintenant dans la production (soit avant 2007). Les seules études sur la gamétogenèse menées sur les huitres 3n produites par la méthode IFREMER sont celles de Jouaux et al. (2010)[4] et Dheilly et al. (2014)[15], dont l'effort de gamétogenèse est de l'ordre de 75%. Suivant les méthodes d'obtention précédentes (cytochalasine B ou 4n produits selon les méthodes de Guo et al. (1994)[16] ou de McCombie et al. (2005)[3]), les seules données disponibles sont très hétérogènes (20 à 80% d'occupation gonadique, ne discriminant pas les tubules gonadiques et le tissu de réserve).

### Objectifs de la thèse

L'objectif de la thèse est l'étude de la plasticité gamétogénétique en relation avec les mécanismes cellulaires (aneuploïdie et compensation chromatinienne) et moléculaires (régulation du cycle cellulaire) chez l'huitre 3n.

Le mécanisme communément observé chez les huitres 3n au niveau des tissus somatiques est l'aneuploïdie et le mosaïcisme, lié certainement à un dysfonctionnement de la ségrégation, entraînant des ségrégations multivalentes pendant la métaphase. Quelques rares observations sur les gamètes ou sur les cellules germinales montrent des ségrégations bi-, tri- ou quadrivalentes[5], [6], [14], [17] pendant la métaphase I de méiose. Ces ségrégations se traduisent dans les tissus somatiques aussi par des regroupements de chromosomes bloqués (ou « clumps »), ainsi que des réversions[9], [10] ou des pertes chromosomiques[4] et mettent en jeu des modifications des complexes synaptonémaux. Par ailleurs, le blocage des complexes synaptonémaux favorise les crossing-over, facilitant le brassage génétique pendant la reproduction et peut faciliter les changements dans le génome.

Héritant du même génome parental, les différences de performance de croissance et de reproduction peuvent également sous l'influence de changements épigénétiques, Largement documentés chez les plantes, ces changements sont assez peu démontrés chez les animaux hormis chez la truite[18] et l'huitre[19], où ces études ont montré, non par une variation de la méthylation globale, mais au sein de loci spécifiques. Ces résultats peuvent alors suggérer une régulation épigénétique au sein d'ensemble de gènes régulant la reproduction chez les huitres 3n.

### Actions et approches méthodologiques

Le projet de recherche se décompose en trois actions :

**Action 1- Caractérisation des cellules germinales précoces des huitres 3n :** Cette action portera sur l'identification des caractères ultrastructuraux en microscopie électronique (corpuscules de Barr, condensation chromatinienne, organisation cytoplasmique, rapport nucléoplasmique) entre les cellules germinales primordiales chez les huitres 3n  $\alpha$  et  $\beta$ , et des cellules goniales.

**Action 2- Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires de la régulation de reproduction :** La régulation de la reproduction induisant deux stratégies chez les huitres 3n sera abordée au niveau cellulaire et moléculaire. Le blocage des huitres 3n sera étudié par La mesure des facteurs régulateurs du cycle cellulaire (PCR quantitative, immunocytochimie et ELISA) des cellules germinales. La dérégulation du cycle peut alors engendrer des variations de la ploïdie, comme la perte de chromosome chez l'huitre[4]. L'aneuploïdie sera abordée par le caryotypage associé au FISH, les approches DRACCAR[20] et

TUNEL, par la perturbation des fuseaux mitotiques par immunocytochimie. Une seconde hypothèse est une régulation épigénétique pour compenser le génome 3n par méthylation du génome ou silencing de gènes cibles. Elle sera abordée par les approches de méthylation globale de l'ADN ou de loci spécifiques et de mesures des enzymes de modification comme les ADN Méthyl Transférases, et des petits ARN identifiés à partir des données du programme GigamiRNome sur les 3n.

### **Action 3- Influence des facteurs environnementaux sur les mécanismes régulateurs de la reproduction des huitres 3n :**

La polyploïdie pour certaines espèces augmente la tolérance des variations environnementales [12], [21]. L'influence de l'environnement sera alors mesurée à partir du suivi de lot(s) d'huîtres 3n sur différents sites, avec un lot 2n contrôle. Le facteur choisi sera la température, premier critère fluctuant selon les sites d'élevage en France, mais aussi conséquence importante du réchauffement climatique. Ce suivi sera réalisé sur 3 ans (incluant deux cycles de reproduction). L'effort de reproduction sera mesurée par histologie quantitative et la viabilité des gamètes et des embryons par croisements entre des huitres 3n et/ou 2n. Au niveau cellulaire et moléculaire, la gamétogenèse sera suivie par les mêmes approches citées dans les actions 1 et 2.

### **Intérêt général et caractère innovant des recherches**

Ce projet concerne la compréhension des mécanismes régulant la reproduction chez les huitres 3n, par des approches novatrices. Il permettra sur cette espèce économiquement importante de lier les phénotypes observés aux régulations cellulaires et moléculaires. Il mettra aussi en lien la plasticité reproductive avec l'environnement.

Ce projet apportera des données majeures pour comprendre l'évolution de la reproduction des huitres 3n dans le contexte des changements globaux, vis-à-vis des populations huitres 2n. Les connaissances développées seront importantes pour la gestion des stocks d'élevage 2n et 3n, et également pour l'optimisation de la production des géniteurs pour les écloséries commerciales. Elles seront également importantes pour l'autorité publique sur l'utilité des réseaux de biovigilances.

D'un point de vue scientifique, ces données renforceront la position de l'huître comme organisme modèle, dont de nombreuses données moléculaires ont été générées. Elles apporteront une meilleure connaissance sur les modes de reproduction selon la ploïdie, grâce à la grande plasticité de cette espèce et sur le potentiel invasif des populations polyploïdes vis-à-vis des stocks naturels. Ces résultats assureront une meilleure compréhension des mécanismes de polyploïdisation chez les espèces animales, où peu de données existent vis-à-vis des espèces végétales.

## Bibliographie

- [1] FranceAgrimer, « Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture - Bilan 2012 ». FranceAgrimer, avr-2013.
- [2] A. Benabdelmouna, C. Ledu, et A. J. Hilliker, « Autotetraploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) obtained using normal diploid eggs: induction and impact on cytogenetic stability », *Genome*, vol. 58, n° 7, p. 333-348, juill. 2015.
- [3] H. McCombie, S. Lapègue, F. Cornette, C. Ledu, et P. Boudry, « Chromosome loss in bi-parental progenies of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* », *Aquaculture*, vol. 247, n° 1-4, p. 97-105, juin 2005.
- [4] A. Jouaux, C. Heude-Berthelin, P. Sourdain, M. Mathieu, et K. Kellner, « Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort », *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, vol. 395, n° 1-2, p. 162-170, nov. 2010.
- [5] X. Guo et S. K. Allen Jr., « Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) », *Biol. Bull.*, n° 3, p. 309, 1994.
- [6] X. Guo et S. K. Allen Jr, « Sex and meiosis in autotetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) », *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.*, vol. 40, n° 3, p. 397-405, juin 1997.
- [7] A. Leitão, P. Boudry, et C. Thiriot-Quévrevreux, « Evidence of differential chromosome loss in aneuploid karyotypes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* », *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.*, vol. 44, n° 4, p. 735-737, août 2001.
- [8] Q. Zhang, Y. Zhuang, et S. K. Allen Jr, « Meiotic chromosome configurations in triploid and heteroploid mosaic males of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea ariakensis*: Meiotic pairing in triploid and mosaic oysters », *Aquac. Res.*, vol. 41, n° 11, p. 1699-1706, oct. 2010.
- [9] Q. Zhang, H. Yu, A. Howe, W. Chandler, et S. K. Allen Jr, « Cytogenetic mechanism for reversion of triploids to heteroploid mosaics in *Crassostrea gigas* (Thunberg) and *Crassostrea ariakensis*: Mechanism of reversion in triploid oyster », *Aquac. Res.*, vol. 41, n° 11, p. 1658-1667, oct. 2010.
- [10] Z. Zhang, X. Wang, Q. Zhang, et S. A. Jr, « Cytogenetic mechanism for the aneuploidy and mosaicism found in tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) », *J. Ocean Univ. China*, vol. 13, n° 1, p. 125-131, nov. 2013.
- [11] C. R. V. Otto, J. W. Snodgrass, D. C. Forester, J. C. Mitchell, et R. W. Miller, « Climatic variation and the distribution of an amphibian polyploid complex », *J. Anim. Ecol.*, vol. 76, n° 6, p. 1053-1061, nov. 2007.
- [12] M. J. Beaton, « Geographical Parthenogenesis and Polyploidy in *Daphnia pulex* », *Am. Nat.*, vol. 132, n° 6, p. 837-845, déc. 1988.
- [13] X. Guo, W. K. Hershberger, K. Cooper, et K. K. Chew, « Artificial gynogenesis with ultraviolet light-irradiated sperm in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. Induction and survival », *Aquaculture*, vol. 113, n° 3, p. 201-214, juin 1993.
- [14] Z. Zhang, X. Wang, Q. Zhang, et S. A. Jr, « Preferential bivalent formation in tetraploid male of Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg », *J. Ocean Univ. China*, vol. 13, n° 2, p. 297-302, nov. 2013.
- [15] N. M. Dheilly, A. Jouaux, P. Boudry, P. Favrel, et C. Lelong, « Transcriptomic profiling of gametogenesis in triploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas*: towards an understanding of partial sterility associated with triploidy », *PLoS One*, vol. 9, n° 11, p. e112094, 2014.

- [16] X. Guo et S. K. Allen Jr, « Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body 1 in eggs from triploids », *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, p. 42-50, 1994.
- [17] H. Que, X. Guo, F. Zhang, et S. K. Allen, « Chromosome Segregation in Fertilized Eggs from Triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), Following Inhibition of Polar Body 1 », *Biol. Bull.*, vol. 193, n° 1, p. 14, août 1997.
- [18] L. Covelo-Soto, P. M. Leunda, A. Pérez-Figueroa, et P. Morán, « Genome-wide methylation study of diploid and triploid brown trout (*Salmo trutta* L.) », *Anim. Genet.*, vol. 46, n° 3, p. 280-288, juin 2015.
- [19] Q. Jiang, Q. Li, H. Yu, et L. Kong, « Inheritance and Variation of Genomic DNA Methylation in Diploid and Triploid Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) », *Mar. Biotechnol.*, vol. 18, n° 1, p. 124-132, févr. 2016.
- [20] A. Neher, G. Ofner, E. Appenroth, et A. Gschwendtner, « High-resolution image cytometry on smears of normal oral mucosa: a possible approach for the early detection of laryngopharyngeal cancers », *Head Neck*, vol. 26, n° 8, p. 694-700, août 2004.
- [21] S. P. Otto, « The evolutionary consequences of polyploidy », *Cell*, vol. 131, n° 3, p. 452-462, nov. 2007.