

GOETHE (Gamétogenèse et Echappement en lien avec la Triploidie chez l'Huitre creuseE)

Intitulé du projet de thèse : Régulation de la reproduction de l'huître creuse triploïde, *Crassostrea gigas* : Capacités reproductrices et invasives dans le contexte des changements climatiques

Ecole doctorale : EdNBISE Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Laboratoire d'accueil : UMR BOREA Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques

Equipe de recherche : Equipe 2 : Reproduction et Développement des Organismes Aquatiques : évolution, adaptation et régulations

Sous la direction de LELONG Christophe (christophe.lelong@unicaen.fr)

Les objectifs de ce projet sont de déterminer l'influence des facteurs environnementaux sur la reproduction des huîtres triploïdes et si, à terme, elles peuvent concurrencer les huîtres naturelles dans le milieu.

Le bilan du GIEC souligne bien l'évolution des changements climatiques avec l'augmentation de la température de l'océan, plus prononcée que la surface du globe. La température a augmentée de 0,1°C par décennie de 1971 à 2010 dans les 100 premiers mètres de profondeur. Les estimations sont une augmentation de 0,6°C à 2°C vers la fin du XXI^e siècle (Climate change 2014; IPCC; 2014), mais aussi une élévation du niveau de la mer et de l'acidification des océans. Les mollusques sont des animaux fortement influencés par les paramètres physico-chimiques (température, pH...) et biotiques (phytoplancton). Et le réchauffement climatique a favorisé l'invasion des huîtres férales ; *i.e.* initialement domestiques et devenues sauvages [1].

La conchyliculture en Normandie constitue une activité importante, 3^{ème} place en production d'huîtres (environ 20% de la production nationale). L'ostréiculture s'est diversifiée par la production d'huîtres triploïdes (3n) pour annualiser la consommation en proposant des animaux stériles avec une qualité organoleptique équivalente sur l'année et pour réduire l'élevage d'un an, 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]. Généralement, la faible fécondité est attribuée à une mauvaise ségrégation chromosomique avec la production de gamètes aneuploïdes. Cependant, des travaux ont montré la capacité d'une catégorie d'huîtres 3n (3n α) à mener une gamétogenèse (faible mais non nulle) [4-6] et une seconde catégorie sans reproduction (3n β). Ceci traduit une forte plasticité de ces animaux pour mener une gamétogenèse, selon leur ploïdie. Cependant, peu d'études ont été menées sur la gamétogenèse des huîtres 3n et les seules études ayant été sur les huîtres 3n produites par la méthode de croisement d'huîtres 2n et 4n [4-7] montrent que l'effort de gamétogenèse est de l'ordre de 75%.

Cette plasticité gamétogénétique est-elle alors en lien avec des mécanismes mis en jeu pendant la production des animaux polyplœïdes? Suivant les méthodes d'obtention précédentes (cytochalasine B ou 4n [8],[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).

Ou, cette plasticité gamétogénétique est-elle en lien avec leur plasticité génétique ? Les huîtres polyplœïdes présentent des taux plus élevés de polymorphisme, surtout les huîtres 3n produites par rétention du second globule polaire pendant la méiose 2 [9]. D'autres études montrent aussi de l'aneuploïdie (perte ou gain de chromosomes) élevée (25-35%), de la réversion (3n vers 2n) et du mosaïcisme hétéroplœïde chez les huîtres 3n [3], [10-11]. Cependant, la plupart des travaux sur la plasticité génétique des huîtres polyplœïdes l'ont été sur les tissus somatiques (branchies) ou pendant la méiose [12-13] et sur des animaux produits selon les méthodes antérieures à celle employée (avant 2007).

Aussi, suite au constat du GIEC sur le réchauffement océanique, **le risque d'augmenter les capacités reproductives des huîtres, et surtout triploïdes est-il possible?** Chavez et al [14] et Dridi et al [15] montrent qu'une faible augmentation de la température (1 à 3°C par rapport à la température optimale) accroît l'effort de reproduction de huîtres 2n. Mais, aucune étude sur l'effort de reproduction des huîtres 3n, selon les paramètres physico-chimiques n'a été menée. Ce constat pose alors la question de l'impact des animaux polyplœïdes sur les populations naturelles selon l'évolution de la gamétogenèse chez les huîtres 3n en terme d'aquaculture durable, notamment dans le contexte actuel des changements climatiques. En effet, face à différentes conditions biotiques et abiotiques, différentes études ont montré une plus forte robustesse des huîtres 3n, présentant de meilleures réponses (survie, poids, réserve) vis à vis des huîtres 2n. Et au niveau trophique, la croissance est plus importante chez les huîtres 3n, en milieu mésotrophe ou eutrophe [9].

Objectifs de la thèse

Les objectifs sont d'étudier l'initiation de la gamétogenèse chez les cellules précoces germinales chez l'huître 3n, les mécanismes moléculaires et cellulaires régulant leur reproduction, puis l'influence de la température sur leur reproduction. Le projet de recherche se décompose donc en trois actions :

Action 1 (1^{ère} année)- Caractérisation des cellules germinales précoces des huitres 3n et de leur ploïdie: Cette action portera sur l'identification des caractères structuraux et ultrastructuraux entre les cellules germinales primordiales chez les huitres 3n α et β , et des cellules goniales. Les variations de ploïdie, comme la perte de chromosome(s) (aneuploïdie et/ou mosaïcisme) ou les regroupements de chromosomes bloqués (ou « clumps »), communément observée au niveau somatique chez l'huître [10-12], peuvent engendrer une mauvaise régulation de la gamétogenèse. Quelques rares observations sur les gamètes ou sur les cellules germinales montrent des ségrégations bi-, tri- ou quadrivalentes [5-6,13]. Ces variations seront alors abordées par le caryotypage et l'approche DRACCAR.

Action 2 (Fin de 1^{ère} année, 2^{ème} et 3^{ème} années)- Etudes des mécanismes cellulaires et moléculaires régulateurs de la reproduction : La régulation de la reproduction induisant deux stratégies chez les huitres 3n sera abordée aux niveaux cellulaire et moléculaire. Le blocage des huitres 3n sera étudié par la mesure des facteurs régulateurs du cycle cellulaire (PCR quantitative, immunocytochimie...). Ces modifications seront également abordées par le FISH associé au caryotypage développé dans l'action 1, l'approche TUNEL et la perturbation des fuseaux mitotiques par immunocytochimie. Héritant du même génome parental, les différences de performance de croissance et de reproduction peuvent également être sous l'influence de changements épigénétiques. Largement documentés chez les plantes, ces changements sont assez peu démontrés chez les animaux hormis chez la truite [16] et l'huître [17], où ces études ont montré des modifications au sein de loci spécifiques. Ces observations peuvent suggérer une régulation épigénétique des gènes régulateurs de la reproduction chez les huitres 3n. Une seconde hypothèse est une régulation épigénétique pour compenser le génome 3n par méthylation du génome ou silencing de gènes cibles. Cette étude 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 (1^{ère} et 2^{ème} années) - Influence des facteurs environnementaux sur les mécanismes régulateurs de la reproduction des huitres 3n : La polyploïdie pour certaines espèces augmente la tolérance aux variations environnementales [18,19]. 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 mesuré par histologie quantitative et la viabilité des gamètes et des embryons par croisements entre des huitres 3n et/ou 2n. Aux niveaux 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 économique 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. Ces résultats sur la régulation de la prolifération seront également essentiels pour faciliter la réussite du programme Biligncell (mise en place d'une lignée cellulaire de mollusque bivalve : un outil innovant et transversal) « synergies partenariales Région Normandie » obtenu en 2017.

- [1] Thomas et al. *J of Biogeography*, 43, 568-579, 2016
- [2] Benabdelmouna et al. *Genome*, 58(7), 333-348, 2015.
- [3] McCombie et al. *Aquaculture*, (1-4), 97-105, 2005.
- [4] Jouaux et al. *JEMBE.*, 395(1-2), 162-170, 2010.
- [5] Guo et Allen Jr. *Biol. Bull.*, 3, 309, 1994.
- [6] Guo et Allen Jr *GNRCC*, 40 (3), 397-405, 1997.
- [7] Dheilly, Jouaux et al. *PloS One*, 9(11), e112094, 2014.
- [8] Guo et Allen Jr *MABB*, p. 42-50, 1994.
- [9] Garnier-Géré et al. *Mol. Ecol.*, 11(8), 1499-1514, 2002.
- [10] Leitão et al. *GNRCC*, 44(4), 735-737, 2001.
- [11] Zhang et al. *J. Ocean Univ. China*, 13(1), 125-131, 2013.
- [12] Zhang et al. *Aquac. Res.*, 41(11), 1699-1706, 2010.
- [13] Zhang et al. *J. Ocean Univ. China*, 13(2), 297-302, 2013.
- [14] Chavez-Villalba et al. *Aquaculture*, 214, 115-130, 2002
- [15] Dridi et al. *J Biol Res*, 21:13, 2014
- [16] Covelo-Soto et al. *Anim. Genet.*, 46(3), 280-288, 2015.
- [17] Jiang et al. *Mar Biotechnol*, 18(1), 124-132, 2016.
- [18] Beaton *Am Nat*, 132(6), 837-845, 1988.
- [19] Otto *Cell*, 131(3), 452-462, 2007.

Inscription du projet de doctorat dans les thématiques de l'UMR BOREA

L'objectif scientifique de l'UMR BOREA est l'étude de la biologie évolutive et de l'écologie des organismes aquatiques. Il s'agit de comprendre l'origine, le fonctionnement et l'évolution de la biodiversité aquatique (des molécules aux organismes et aux écosystèmes) afin de prédire les réponses aux changements globaux, anthropiques et climatiques. Cette UMR couvre un large champ de disciplines complémentaires permettant une approche intégrée des questions d'évolution de la biodiversité. L'UMR BOREA est une Unité de recherche fondamentale dans les domaines de la biologie évolutive et de l'écologie, mais dont les objectifs scientifiques, les modèles biologiques (modèles aquatiques d'intérêt écologique et/ou économique) et les écosystèmes étudiés ("naturels" ou "anthropisés"), permettent une ouverture directe vers des applications identifiées comme le développement et la diversification de l'aquaculture.

Le projet de doctorat renforcera les thématiques développées au sein de l'UMR BOREA, et plus particulièrement de l'équipe 2 « Reproduction et Développement : Evolution, adaptations, régulations. Il permettra également d'apporter des éléments complémentaires sur la régulation de la prolifération pour d'autres programmes de recherche, notamment pour le programme « Synergies partenariales de la Région Normandie » accordé en 2017 et porté par LABEO sur la mise en place de lignées cellulaires chez les mollusques bivalves. En effet, l'approche de la gamétogenèse perturbée chez les huîtres 3n en fait des modèles pertinents pour comprendre les mécanismes régulateurs de la gamétogenèse, en caractérisant les acteurs clés de la prolifération et la différenciation de la lignée germinale. Le second axe de l'équipe est d'étudier l'adaptation de l'organisme aux paramètres environnementaux. L'apport de l'étude des huitres triploïdes, montrant une forte plasticité phénotypique dans la reproduction, est également pertinente pour mettre en lien l'influence des facteurs environnementaux comme la température, le niveau trophique... dans les différents niveaux de régulations, à savoir de l'organisme jusqu'au génome. A l'issue du doctorat, on pourra éprouver les capacités adaptatives des organismes triploïdes dans le cadre des changements globaux.