

Institut National des Sciences et Techniques de la Mer
Cherbourg

Conservatoire National des Arts et Métiers

DIPLOME DE TECHNICIEN SUPERIEUR DE LA MER

Génie biologique et productions marines

Rapport de stage

**Contrôle des performances biologiques de
populations diploïdes et triploïdes d'huîtres creuses
*Crassostrea gigas***

David BENHAÏM

Septembre 1993

Maître de stage : André GERARD

IFREMER,

Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie

BP 133, Ronce les Bains

17 390 La Tremblade



Remerciements :

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à André Gérard mon maître de stage pour m'avoir offert des conditions de travail idéales.

Toute ma gratitude va à Yamama Naciri dont la gentillesse, la patience et le dévouement sont trois effets hautement significatifs...

Je remercie Serge Heurtebise et Jaqueline Garnier qui ont su me faire apprécier le doux parfum du chloroforme durant plus de 4 mois.

Un grand merci à Jean-marie, pour tout l'art qu'il a su m'inculquer dans le centrage de l'histogramme sur 1.5.

Je suis également reconnaissant envers Daniel Razet et Christophe Jamoneau qui m'ont ouvert la voie du CHN.

Je remercie l'ensemble du personnel de la DEL pour m'avoir communiqué ses données hydrobiologiques concernant le bassin de Marennes-Oléron.

C'est avec plaisir que j'inscris le nom d'Anne-Laure Barillé dans cette liste de remerciements, pour son aide en hydrobiologie, et n'en déplaît à Laurent (tant pis pour Dankers), je souhaite sincèrement que l'écho de ses argiles soit entendu.

Encore merci à Christophe Ledu, pour m'avoir ouvert les yeux sur l'intérêt du *Talitrus saltator* pour la *Sepia officinalis*.

Pascal Phélipot, Ginette Cailleateau et tous les autres membres de la Station de La Tremblade, sont autant de gens qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'élaboration de ce rapport.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
1.1. Présentation	1
1.2. Contexte et intérêt de l'étude	2
2. MATERIEL ET METHODES	4
2.1. Induction et contrôle de la ploïdie	4
2.1.1. Induction	4
2.1.2. Contrôle de la ploïdie	4
2.1.2.1. <u>Préparations histologiques</u>	4
2.1.2.2. <u>Coloration</u>	5
2.1.2.3. <u>Analyseur d'image</u>	5
2.2. Techniques d'élevage	5
2.2.1. Sur estran	5
2.2.2. En claire	6
2.3. Prélèvements	6
2.3.1. Méthode	6
2.3.2. Calendrier de prélèvement	6
2.4. Suivi hydrobiologique en claire	7
2.4.1. Contrôle du niveau	7
2.4.2. Températures et salinités	8
2.4.3. Sestons	8
2.4.3.1. <u>Sestons organiques et minéraux</u>	8
2.4.3.2. <u>Biochimie particulière</u>	8
2.4.4. Dosage de la chlorophylle a et des phéopigments	9
2.4.5. Dosage des CHN	9
2.5. Analyses biométriques	11
2.5.1. Protocole	11
2.5.2. Indice de condition	11
2.6. Analyses biochimiques	11
2.6.1. Dosages colorimétriques	12
2.6.2. Dosage des protéines	12

2.6.3. Dosage des lipides	12
2.6.4. Dosage des glucides	12
2.7. Sexage des individus	12
2.8. Analyses statistiques	13
2.8.1. Analyse des données de mortalité	13
2.8.2. Analyse de variance	13
2.8.2.1. <u>Principe de l'analyse</u>	13
2.8.2.2. <u>Conditions d'application</u>	14
2.8.3. Analyse discriminante	15
3. RESULTATS ET DISCUSSION	16
3.1. Déroulement des expériences	16
3.1.1. Ploïdie	16
3.1.2. Qualité du site	16
3.1.2.1. Sur estran	16
3.1.2.2. En claire	16
3.1.3. Mortalités	17
3.2. Hydrobiologie	18
3.2.1. Températures et salinités	18
3.2.2. Sestons	18
3.2.3. Chlorophylle et phéopigments	19
3.2.4. Biochimie particulière	20
3.2.5. Carbone et azote	20
3.3. Evolution des paramètres biologiques	21
3.3.1. Vérification des hypothèses	21
3.3.2. Test des effets	22
3.3.2.1. <u>Point zéro</u>	22
3.3.2.2. <u>Effet date</u>	22
3.3.2.3. <u>Effets ploïdie et date</u>	22
3.3.3. Corrélations entre caractères	25
3.3.4. Discrimination des sites et de la ploïdie	26
3.3.4.1. <u>Ploïdie</u>	26
3.3.4.2. <u>Site</u>	26

4. CONCLUSION

27

5. BIBLIOGRAPHIE

29

6. ANNEXES

32

1.INTRODUCTION

Présentation

L'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) est un établissement public à caractère industriel et commercial. A cet égard, son objectif principal est d'adapter le résultat de ses recherches au niveau des entreprises.

La Station de la Tremblade, dépend administrativement du Centre de Nantes. Elle est implantée en plein coeur du bassin de Marennes-Oléron, dans la région Poitou-Charentes, située au tout premier rang national en matière d'ostréiculture avec une production de 45% des huîtres creuses consommées en France.

La Station de La Tremblade comprend deux laboratoires : l'un rattaché à la DEL (Direction de l'Environnement Littoral), l'autre à la DRV-RA (Direction des Ressources Vivantes-Section Recherches Aquacoles). Ce dernier laboratoire regroupe quatre Unités de Recherche au sein d'une même structure : le Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins (LBEIM) . Ces Unités sont :

- ◆ L'UREA : Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles sous la responsabilité de Maurice Héral.
- ◆ L'URPIG : Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générale dirigée par Tristan Renault.
- ◆ L'URGE : Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie dirigée par André Gérard.
- ◆ L'URRA : Unité de Recherche Régionale Aquacole dirigée par interim par André Gérard. Cette Unité regroupe également la Station de Bouin (Vendée) sous la responsabilité de Jean-Pierre Baud.

Le stage dont ce rapport fait l'objet a été effectué entre l'URGE et l'URRA. Les objectifs généraux de l'URGE sont :

- ◆ L'obtention de souches résistantes aux maladies épizootiques (programme de sélection sur l'huître plate *Ostrea edulis*),
- ◆ La création de lignées ou de souches présentant de meilleures performances de croissance et de qualité de chair (sur *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ruditapes philippinarum* et *decussatus*),
- ◆ L'acclimatation de nouvelles espèces et leur hybridation dans le but de fournir de nouvelles souches à la profession et de limiter les risques liés à la monoculture,
- ◆ La recherche de marqueurs phénotypiques, électrophorétiques ou moléculaires.

Trois objectifs principaux sont fixés pour l'URRA :

- ◆ Définir les paramètres et indicateurs écologiques et physiologiques permettant de contrôler et de gérer l'exploitation des ressources conchylicoles,
- ◆ Contribuer au développement d'une filière contrôlée en conchyliculture, filière qui comprend l'écloserie, le captage, la nurserie et le grossissement,
- ◆ Contribuer à l'amélioration des produits par la mise en place d'une filière conchylicole contrôlée.

Contexte et intérêt de l'étude

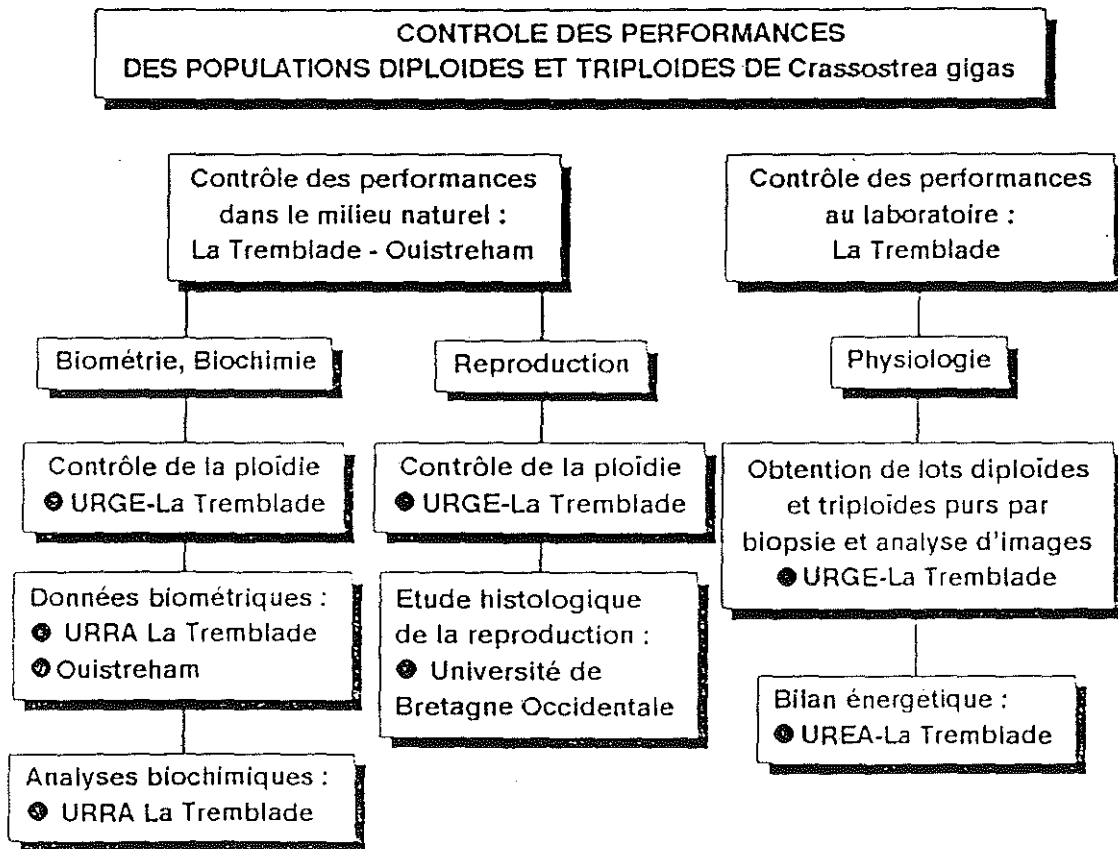
L'effort de reproduction chez l'huître creuse débute au printemps, et devient prioritaire sur la croissance somatique. La ponte entraîne une perte de 64% du poids sec total de chair (Héral, 1986). La triploïdisation devrait permettre, par réduction de la gonadogenèse, de réorienter les réserves énergétiques (présentes essentiellement sous forme de glycogène) en faveur de la croissance et de permettre la commercialisation de produits conchylicoles de qualité organoleptique optimale toute l'année. Ces individus, théoriquement stériles par absence de gonade, seraient ainsi plus facilement commercialisables en période estivale car ils ne présenteraient pas de "laitance". Initialement menées aux USA, les recherches sur les bivalves et notamment sur *Crassostrea gigas* (Allen et Downing, 1986 ; 1990), ont mis en évidence une augmentation de 172% du poids sec de chair chez les triploïdes contre 34% chez les diploïdes, ainsi que des taux de survie supérieurs qui seraient dus à une meilleure condition physiologique conférée par leurs abondantes réserves glucidiques.

En France, les techniques de triploïdisation ont d'abord été développées avec succès dans le domaine piscicole par l'INRA. Dans le domaine conchylicole, le LABEIM et l'URGE ont appliqué les protocoles d'Allen et Downing sur *Crassostrea gigas* et les ont adaptés à *Ruditapes philippinarum* (Dufy et Diter, 1990), *R. decussatus* (Gérard et al. 1993a) et *Ostrea edulis* (Gendreau et Grizel, 1990).

L'étude des performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes de *C. gigas* a donné lieu à un premier suivi, débuté en mars 1991 à la Tremblade et à Ouistreham, selon un protocole établi en 1990 (Figure 1) et interrompu précocement en 1992. Les huîtres triploïdes produites par l'URGE, avaient été prégrossies à la Station de Bouin. Sur le site de la Tremblade, l'URRA avait pris en charge l'élevage des huîtres et le suivi des paramètres biométriques et biochimiques, l'URGE assurant le contrôle de la ploïdie par imagerie numérique sur chaque animal analysé. L'étude histologique de la reproduction était confiée au laboratoire de Zoologie de l'Université de Bretagne Occidentale.

L'élevage en claire avait été retenu afin d'accélérer les processus de première maturation qui devait théoriquement différencier les lots diploïdes et triploïdes. De gros problèmes

figure 1

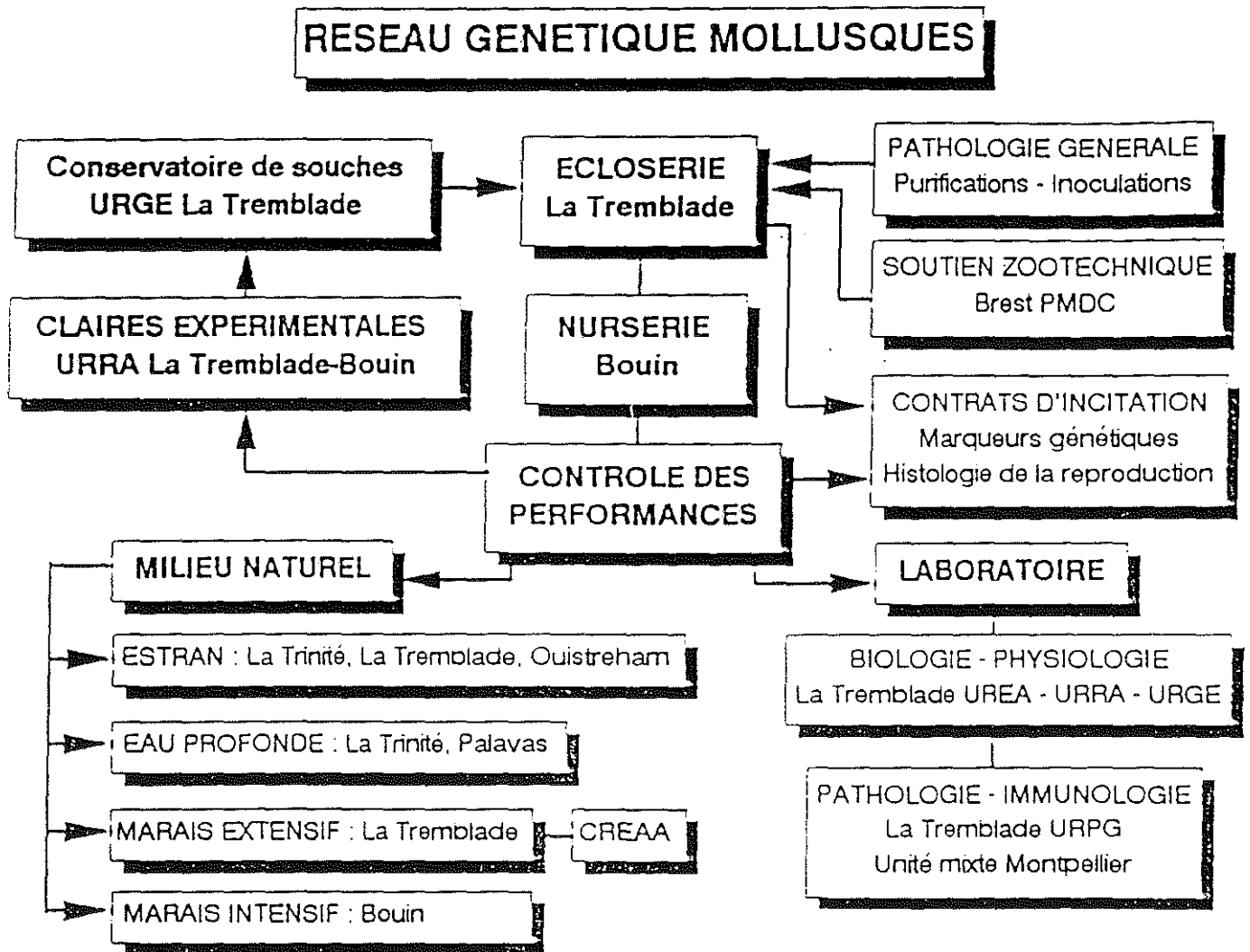


d'infrastructures entraînant de fortes mortalités dans les lots ont considérablement gêné le programme. Les résultats obtenus ont cependant montré une différence marquée, à partir du mois de Juillet, entre les lots diploïdes et triploïdes. L'indice de condition variait très peu chez les triploïdes, alors que celui-ci augmentait chez les diploïdes pendant la phase de maturation entre Juillet et début Août puis chutait brutalement entre le début et la mi-Août, suite à l'émission des gamètes. On notait également une accumulation rapide en glycogène des individus triploïdes à partir de la mi-Juin, alors qu'elle demeurait nulle pour les diploïdes pendant la phase de gamétogenèse (Gérard *et al.*, 1992).

Dans le cadre du contrat de plan Etat-Région un nouveau contrôle de performances biologiques de populations diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas* a été relancé depuis Mars 1993. Ce stage de quatre mois et demi s'intègre au contrôle mené sur des populations triploïdes et diploïdes d'huîtres creuses produites le 28 avril 1992 à l'URGE. Le transfert sur les sites d'étude a été effectué le 20 mars 1993. Quatre sites ont été retenus dans le cadre du Réseau Génétique Mollusque de l'IFREMER (Figure 2) : La Tremblade (en claire et sur estran), Quistreham, Arcachon et Palavas. Les prélèvements ont débuté le 20 Mars et s'étaleront théoriquement jusqu'en 1994. La Tremblade et Port-en-Bessin assurent un suivi complet des lots (mortalité, biométrie, biochimie, analyse de la ploïdie, sexage, gamétogenèse). Les stations de Palavas et d'Arcachon n'effectuent qu'un suivi réduit ne comprenant ni la biochimie, ni l'étude de la gamétogenèse.

Ce rapport ne fait état que des résultats obtenus à La Tremblade entre Mars et Juillet 1993.

figure 2



2.MATERIEL ET METHODES

2.1. Induction et contrôle de la ploïdie.

2.1.1. Induction.

La polyploïdisation consiste en une augmentation artificielle du nombre de chromosomes dans l'ensemble des cellules d'un individu. Pour l'obtenir artificiellement, on doit donc agir avant la première division embryonnaire, c'est à dire sur l'ovule fécondé depuis peu. Avant fécondation, l'ovule est en effet bloqué en première métaphase de la méiose. La pénétration du spermatozoïde permet la reprise des divisions et l'expulsion successive du premier globule polaire (mitose réductionnelle) et du second globule polaire (mitose équationnelle). La triploïdisation peut être obtenue par rétention de l'un de ces deux globules polaires par le biais de traitements physiques (température, pression) ou chimiques.

L'induction chimique à la cytochalasine B (CB) a été retenue à l'issue des premiers essais, dont l'efficacité dépend de la concentration, de la température, et du moment d'application du traitement (Downing *et al*, 1987). Une technique nouvelle a cependant été mise au point en 1991 par le laboratoire de la Tremblade, basée sur l'utilisation du 6-diméthylaminopurine (6-DMAP), produit présentant de multiples avantages sur la cytochalasine B (Gérard *et al*, 1993b). En effet, il se dissout directement dans l'eau de mer, n'est pas recensé comme poison et ne nécessite pas l'utilisation d'un solvant comme le Diméthylsulfoxyde (DMSO). Il est également plus économique et tout aussi efficace (Figure 3).

2.1.2. Contrôle de la ploïdie.

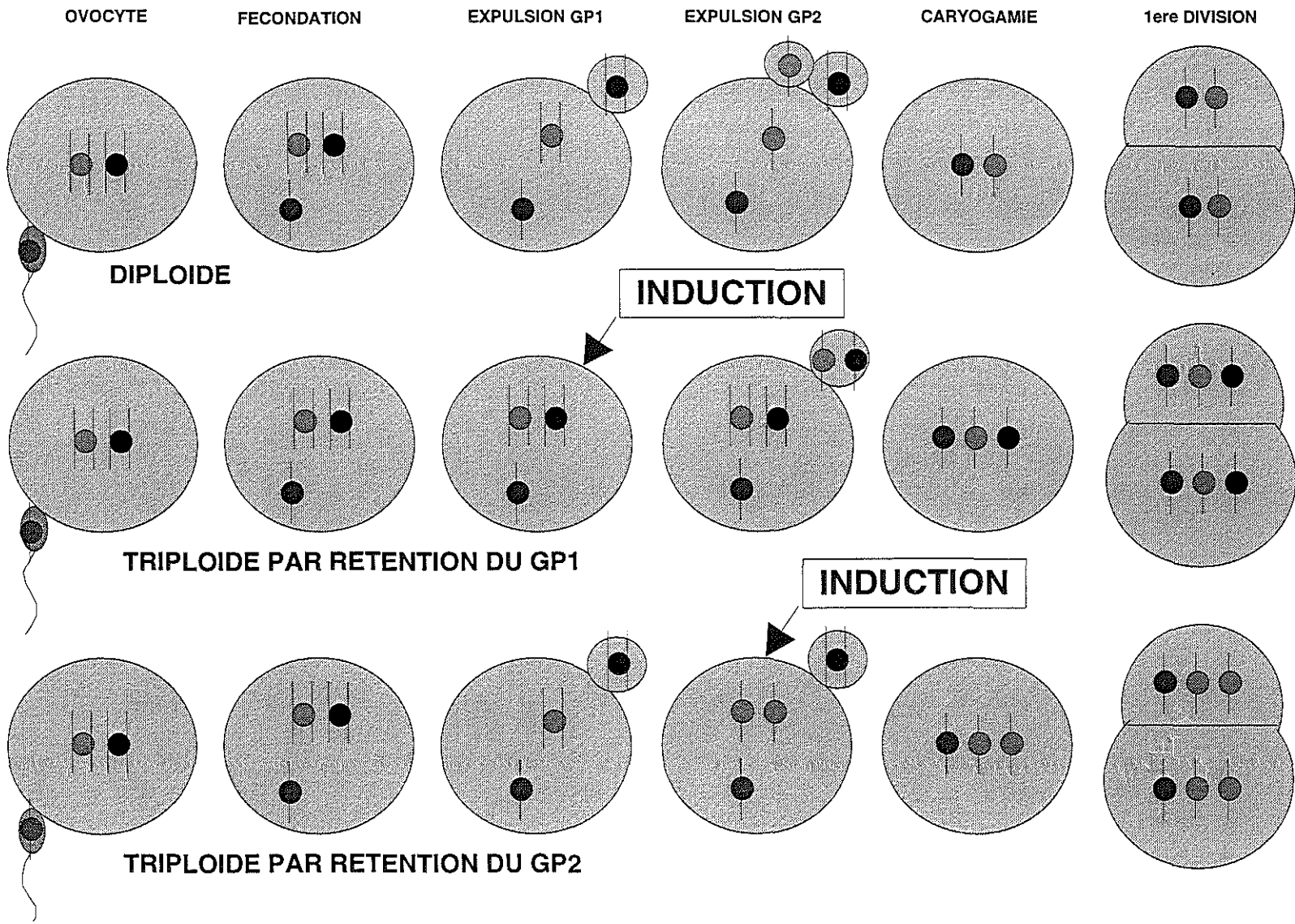
La triploïdisation par voie chimique ne permet pas d'obtenir actuellement des taux d'induction de 100%. Chaque animal prélevé devra donc être contrôlé individuellement par imagerie numérique. La ploïdie du lot diploïde sera également vérifiée.

2.1.2.1. Préparation histologiques.

Les huîtres sont ouvertes à l'aide d'un scalpel au niveau de la charnière et en sectionnant le muscle adducteur postérieur, ceci afin de récupérer la totalité de la chair destinée à l'évaluation du poids frais et les autres analyses biochimiques et biométriques.

- On prélève un petit morceau de branchie avec une pince courbée.
- On le sèche sur du papier sans l'écraser.
- On fait une succession d'appositions sur une lame propre (une lame pour deux individus).
- On prépare des lames témoins avec des individus diploïdes.
- On laisse sécher les lames à l'air quelques minutes.
- On fixe les lames par balnéation dans du Bohm Sprenger (Annexe 1).

FIGURE 3 - INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE



2.1.2.2. Coloration.

La coloration est basée sur la réaction de Feulgen Rosaniline. L'hydrolyse acide des ponts ribose-purine de l'ADN donne des résidus aldéhydes. Le réactif de Schiff permet la fixation, par pont covalent, de colorant sur ces groupes aldéhydes. Une coloration rose spécifique de l'ADN est obtenue et son intensité est proportionnelle à la quantité d'ADN. (Annexe 1).

2.1.2.3. Analyseur d'image.

L'analyseur d'image est le Samba TM 2005 de TITN-ALCATEL composé d'un microscope relié à une caméra, d'un micro-ordinateur sur lequel sont implantés trois logiciels, et deux moniteurs de contrôle pour la visualisation des images et le traitement des données (Figure 4). Le programme numérise les images et donne deux mesures de base :

- L'aire en pixels du noyau analysé, et la surface définie par l'opération de seuillage.
- La densité optique intégrée (DOI) qui correspond à la quantité d'ADN dans le noyau par unité de surface.

L'analyseur calcule le rapport de DOI existant entre le témoin diploïde et l'échantillon. Ce rapport est de 1.5 si l'animal est triploïde et de 1 s'il est diploïde. Le témoin diploïde est analysé en premier comme référence externe. Des zones présentant des noyaux sont repérés à l'objectif $\times 40$ avant de passer au $\times 100$ sous immersion. A ce niveau de l'analyse, il est nécessaire de régler la valeur de fond (réglage de luminosité), en se plaçant sur un champ vide et en ajustant la luminosité de façon à laisser à l'écran un léger scintillement. Une centaine de noyaux sont analysés pour la référence diploïde, une trentaine pour chacun des individus diploïdes et triploïdes. Un histogramme apparaît à l'écran, centré sur 1.5 pour un individu triploïde, 1 pour un diploïde (Figure 5)

2.2. Techniques d'élevage.

2.2.1. Sur estran.

La technique utilisée est l'élevage en surélévation. Les huîtres sont mises en poches (maille de 9 mm). Des dédoublements sont prévus au cours de la croissance. Ces poches standard de 1 m sur 0.5 m sont juxtaposées en files sur des tables métalliques de 50 cm de hauteur sur une longueur de 4 m (Héral, 1986).

Le parc à huîtres est situé dans le bassin de Marennes Oléron sur le site du banc de Bourgeois (Figure 6) dont le coefficient d'émersion est d'environ 70-75. Le lot étudié est constitué de 5 poches diploïdes et 5 poches triploïdes contenant chacune 210 individus.

figure 4

**CONFIGURATION DU
SYSTEME SAMBA 2005**

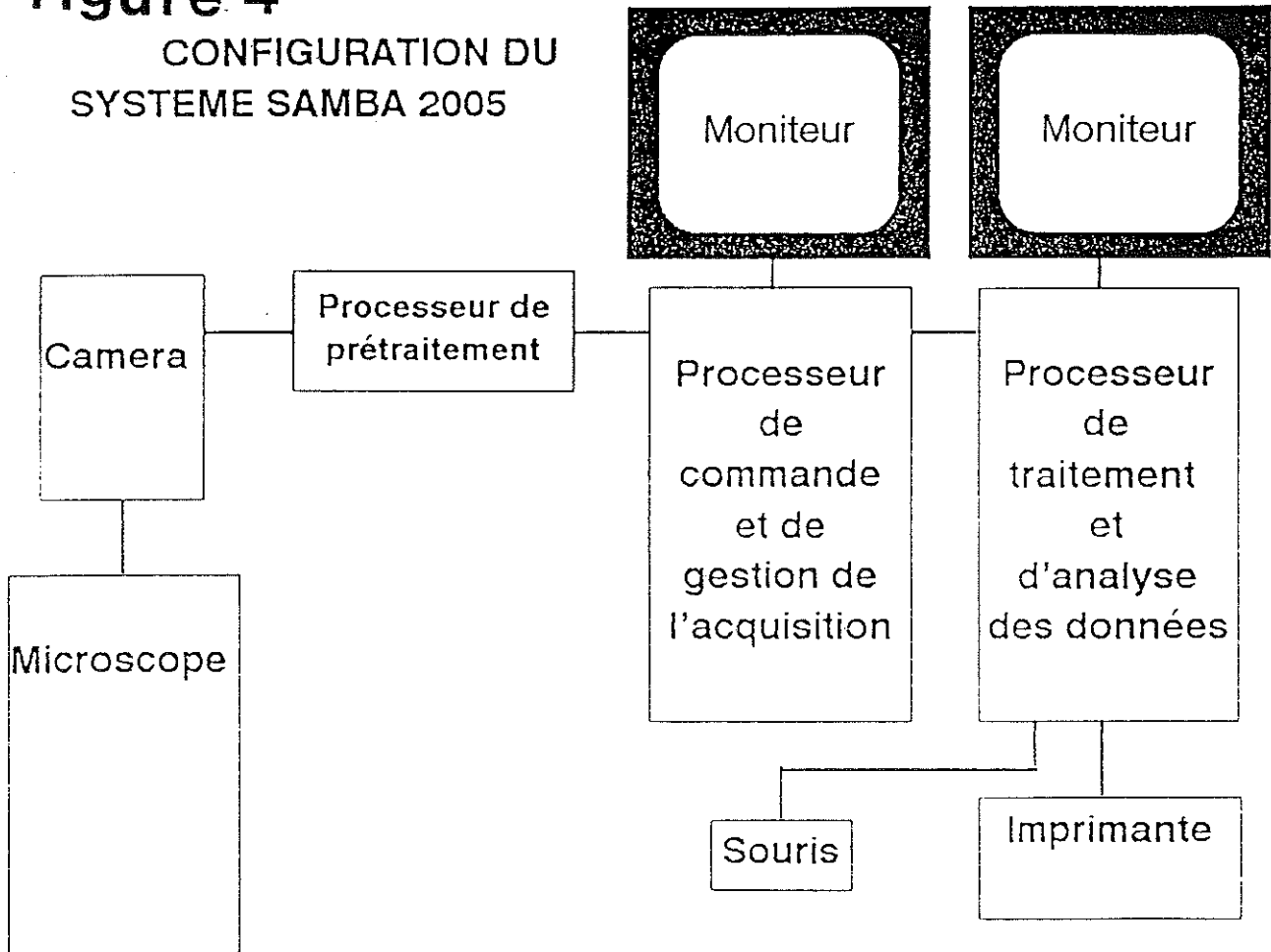


figure 5

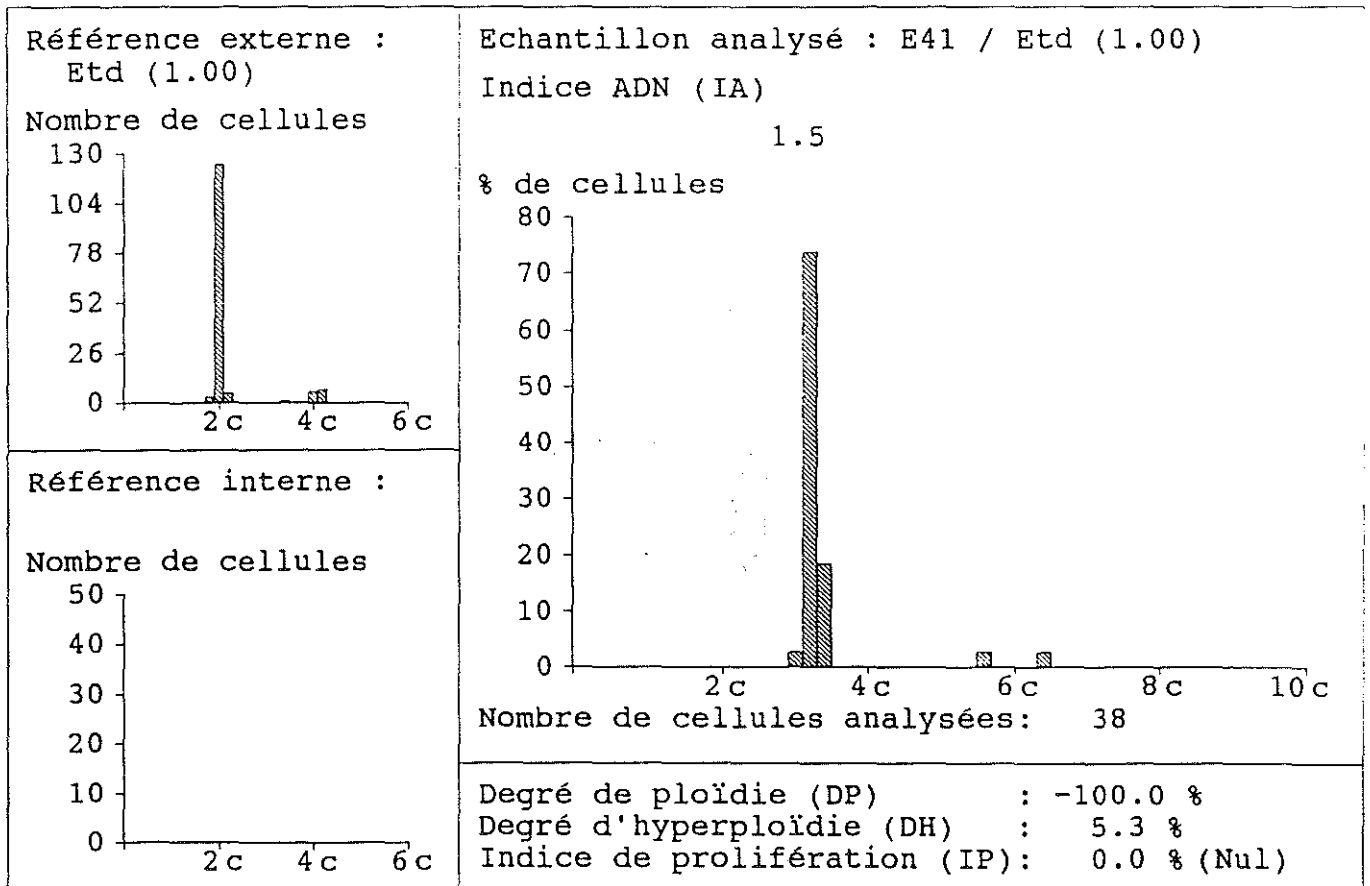
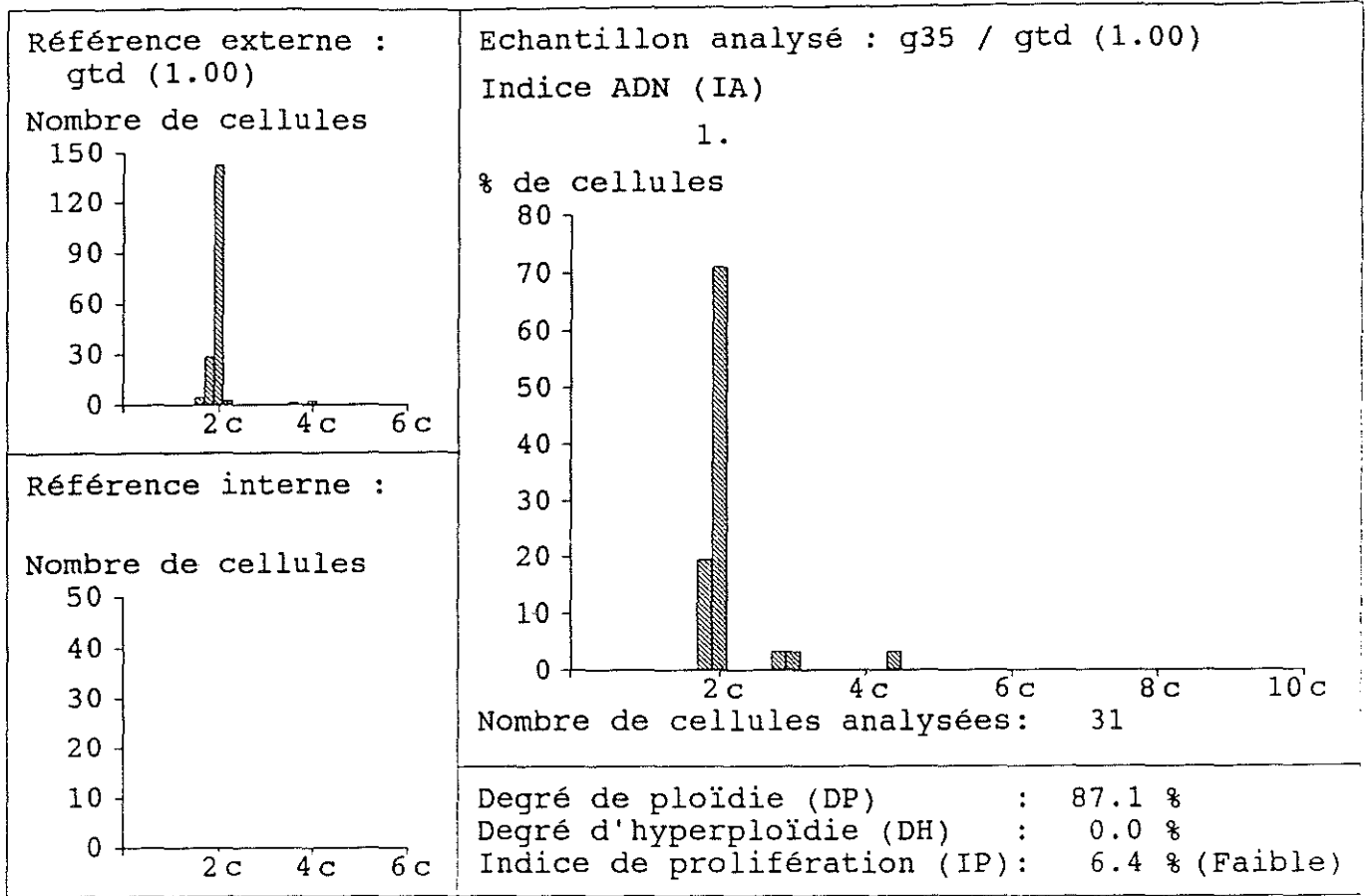
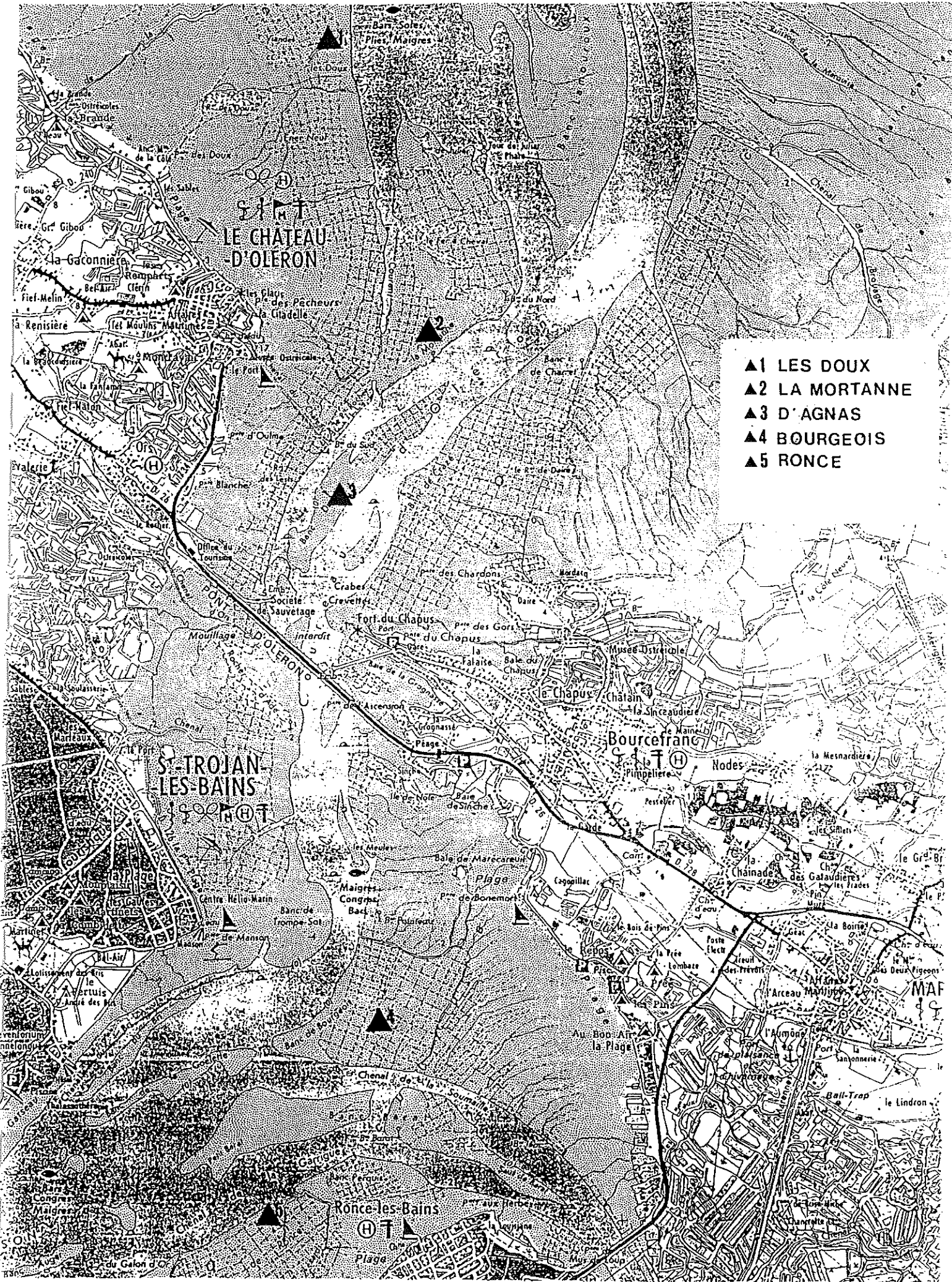


figure 6



2.2.2.En claire.

Aménagées sur d'anciens marais salants, les claires couvrent une surface de 3500 ha dans le bassin de Marennes-Oléron (Grelon, 1978). Ces bassins sont habituellement utilisés pour l'engraissement et le verdissement des huîtres semées à faibles densités. Ce verdissement est causé par la marennine, pigment d'une diatomée : *navicula ostrearia*. Une claire, située près de la station de Ronce les Bains, a été choisie pour assurer aux huîtres des conditions optimales de croissance et de surveillance. La mauvaise tenue en eau de cette claire a nécessité le transfert des huîtres sur un autre marais, Avallon, prêté à l'IFREMER par la section régionale du Comité Interprofessionnel de Marennes-Oléron.

L'élevage se fait également en poches posées sur des tables métalliques à 10 cm du sol. Comme sur estran, le lot étudié est constitué de 5 poches diploïdes et 5 poches triploïdes contenant chacune 210 individus.

2.3.Prélèvements.

2.3.1.Méthode.

La veille de la date fixée par le protocole, le prélèvement est effectué par bateau sur le parc de Bourgeois. La date du prélèvement est soumise aux contraintes de la marée. Les huîtres prélevées sur estran sont placées en claire jusqu'au lendemain.

On prélève de façon aléatoire 10 individus sur les 4 poches diploïdes et triploïdes de l'estran, soit 40 diploïdes et 40 triploïdes. La cinquième poche est réservée à l'estimation de la mortalité. Sur ces 40, 30 sont utilisées pour les analyses biochimiques et biométriques, 10 pour l'analyse histologique de la gamétogenèse, effectuée par le laboratoire de Marcel Lepennec de l'Université de Bretagne Occidentale sous contrat d'incitation. La ploïdie est vérifiée sur chaque individu par analyse d'image à l'URGE.

Seuls 30 diploïdes et triploïdes sont prélevés en claire pour les analyses biométriques, biochimiques, et le contrôle de la ploïdie.

2.3.2.Calendrier de prélèvement.

L'encadré indique la période étudiée dans ce rapport

20 Mars
22 Avril
25 Mai
24 Juin
7 et 22 Juillet

3 et 17 Août

Septembre

Octobre

Novembre

2.4.Suivi hydrobiologique.

La prise de nourriture des huîtres a lieu au cours de la filtration, grâce aux tractus ciliaires frontaux qui prennent en charge les particules de petite taille inférieures à 10 μm (Tames et Dral, 1956). Un suivi hydrobiologique est nécessaire pour évaluer la quantité et la nature des apports nutritifs disponibles dans le milieu pour l'élevage. Ces apports peuvent être de plusieurs origines : particulaires ou dissoutes. Les mollusques bivalves sont en effet capable d'absorber directement les substances organiques dissoutes (protéines, lipides et glucides), et de filtrer la matière organique particulaire : phytoplancton vivant ou en décomposition, éléments détritiques et faune bactérienne associée (Zanette, 1980).

L'ensemble des données porte sur l'hydrobiologie des claires de Ronce les Bains et Avallon. Les mesures de température, sestons ont été menées depuis le début du stage, celles concernant les chlorophylle a et phéopigments uniquement en Avallon, à partir de la date du transfert des huîtres au mois de Mai. Le dosage des CHN a été effectué à titre expérimental sur une courte période du 10 mai au 10 juin. Les prélèvements hydrobiologiques ont été effectués deux à trois fois par semaine.

Les quelques données recueillies à proximité du banc de Bourgeois (sestons organiques et minéraux, chlorophylles a , température et salinité) m'ont aimablement été fournies par le laboratoire DEL de La Tremblade.

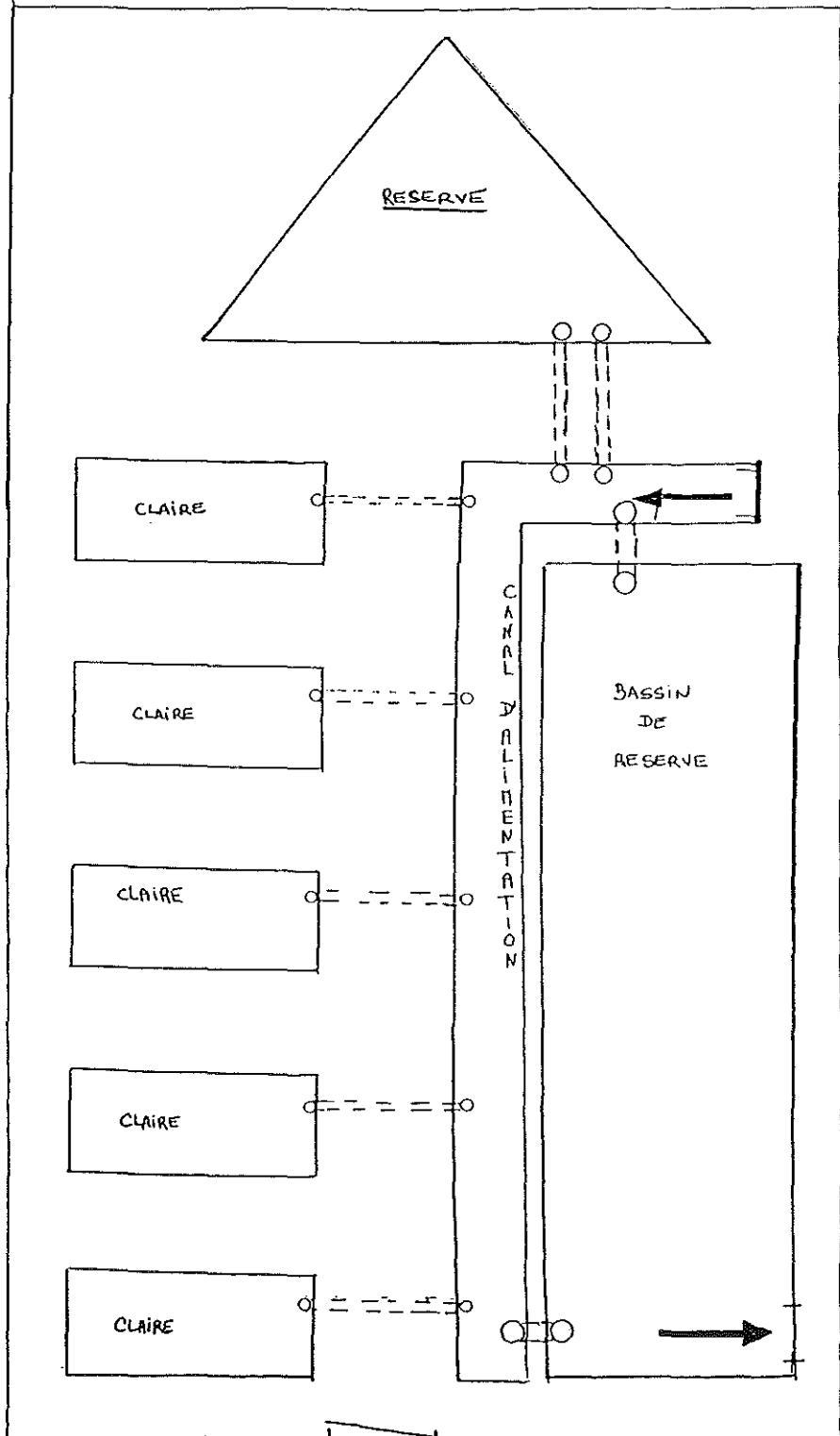
Ces données sont néanmoins très espacées dans le temps, et seront donc à interpréter avec prudence lors de la comparaison des sites.

2.4.1.Contrôle du niveau.

Le fonctionnement du marais est illustré par la figure 7.

Un contrôle quotidien du niveau d'eau dans la claire est nécessaire. Les grandes marées sont l'occasion d'alimenter le marais. Les vannes sont ouvertes environ 3 heures avant l'étale de pleine mer, et refermées peu après l'étale de pleine mer. Une pompe doit être employée en période de faible amplitude de marée et de forte évaporation.

figure 7



2.4.2. Température et salinité.

Relevées chaque jour, à l'aide d'un conductimètre WTW, la température et la salinité permettront éventuellement d'expliquer de manière plus précise les courbes de croissance, ainsi que les courbes d'analyses biochimiques.

2.4.3. Sestons.

La connaissance de la quantité de matières en suspension est importante pour l'étude des milieux aquatiques. Les concentrations en matières en suspension subissent des variations saisonnières (Aminot, 1983) principalement pour les huîtres élevées en claire. Retenir des particules par filtration d'eau de mer est un moyen pour les quantifier et d'en déterminer la nature biologique et biochimique.

2.4.3.1. Sestons organiques et minéraux.

On passe au préalable des filtres en fibre de verre Whatman GF/C (0.45 μm) vierges au four à 450°C (pour éliminer tout dépôt organique). Ces filtres présentent l'avantage d'être non hygroscopique (Aminot, 1983). Les filtres tarés à l'avance, à l'aide d'une balance précise au millième de gramme sont conservés au dessiccateur.

On filtre des volumes de 500 ml (variable en fonction de la richesse de l'eau). L'eau est préfiltrée (250 μm) pour éliminer les plus grosses particules qui ne représentent qu'une masse négligeable par unité de volume (Aminot, 1983). Il est ensuite nécessaire de laver les filtres à l'eau distillée pour éliminer le sel, source d'erreur par excès. Ils sont placés enfin sur un petit morceau de papier d'aluminium déposé dans une boîte de pétri. L'eau est évaporée en plaçant les filtres 24 heures à l'étuve à 60°C. On les laisse revenir à température ambiante au dessiccateur pendant 3 heures.

Leur pesée donne la somme des sestons organiques et minéraux. Pour dissocier la part organique de la part minérale, on "élimine par le feu" la matière organique au four à 450°C. La pesée donne alors les sestons minéraux. On déduit la part de sestons organiques par différence. Les résultats sont exprimés en mg/l.

2.4.3.2. Biochimie particulaire.

Dans le but de mieux évaluer l'apport nutritif du milieu dans lequel sont placées les huîtres, il est intéressant de pouvoir mesurer l'apport en lipides, protéines et sucres particuliers. On prépare donc sur des volumes identiques trois filtres (non tarés), et ceci pour les glucides, les lipides, et les protéines, soit 9 filtres au total.

Les filtres humides sont égouttés sur du papier buvard, pliés puis placés dans des tubes d'analyses biochimiques. Les tubes sont bouchés et conservés au congélateur. Les filtres seront ensuite broyés. Les analyses sont basées sur une adaptation pour le particulaire, des méthodes colorimétriques utilisées sur la chair. Les extractions des protéines, sucres, et lipides sestoniques sont détaillées aux Annexes 2, 3 et 4.

2.4.4. Dosage de la chlorophylle a et des phéopigments par fluorimétrie.

La mesure de la chlorophylle a et des phéopigments permet une évaluation de la biomasse phytoplanctonique contenue dans l'eau de mer.

La méthode consiste à mesurer la fluorescence d'un extrait acétonique de pigments, avant et après acidification. La diminution de fluorescence observée est en relation avec le pourcentage relatif de chlorophylle a par rapport à la somme chlorophylle a + phéophytine a (Neveux, 1983).

La filtration est effectuée sur membranes filtrantes en fibre de verre WHATMAN GF/C de 47 mm. Du Carbonate de Magnésium est rajouté avant la filtration. Les filtres sont ensuite pliés et introduits dans des tubes bouchés et placés au congélateur. La suite des manipulation consiste à :

- Ajouter 5 cc d'acétone à 90 % dans les tubes,
- Broyer les filtres à l'aide d'une spatule,
- Laisser extraire 4 heures au réfrigérateur,
- Centrifuger 15 mn à 3000 tours/mn,
- Lire la fluorescence,
- Acidifier avec 50 µl d'HCl 1 N,
- Lire la fluorescence.

Les calculs sont détaillés en Annexe 5.

2.4.5. Dosage des CHN.

On ne prendra en considération que le carbone et l'azote, l'hydrogène ne présentant qu'un intérêt réduit pour caractériser la richesse d'un milieu.

La détermination du carbone, hydrogène et azote organique, est effectuée par le PE 2400 série 2 CHNSO Analyser de Perkin Elmer. Réalisées en parallèle à l'UREA avec les autres mesures hydrobiologiques, sur un mois seulement (coût de passage de l'échantillon élevé), les valeurs obtenues présentent l'avantage d'être très fiables et d'usage relativement commode. Il sera

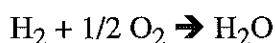
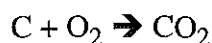
peut-être possible prochainement grâce aux travaux engagés par l'équipe de l'UREA d'établir des corrélations entre CHN et sestons organiques d'une part, et biochimie de la fraction particulaire d'autre part. Pour obtenir des résultats exploitables en claire, il sera néanmoins nécessaire de disposer d'une banque de données importante, ce qui n'est pas le cas.

On distingue 4 étapes dans l'analyse :

- Combustion, formation des gaz et purification,
- Réduction,
- Séparation des gaz,
- Mesures et calculs.

On filtre 100 ml d'eau de mer sur filtre Whatman GF/c diamètre 25 mm calciné. Les filtres sont passés ensuite aux vapeurs d'HCL afin d'éliminer les carbonates, puis conservés à l'étuve à 60 °C.

L'échantillon, emballé dans une feuille d'étain, est introduit dans les godets de la couronne d'échantillonnage. Il est propulsé par un injecteur dans le tube à combustion (1000°C). La combustion est provoquée par l'introduction d'oxygène. L'oxygène restant permet la formation de gaz simples selon les réactions suivantes :



Le mélange des gaz est entraîné à travers la colonne de combustion par de l'hélium (gaz neutre vecteur). L'oxygène en excès est réduit au niveau de la colonne de réduction par du cuivre, en oxyde de Cu.

Le CO₂, N₂, et H₂O restants, sont entraînés dans une colonne de chromatographie en phase gazeuse par l'hélium, et sont séparés en fonction de leur densité. Les gaz sont ensuite détectés à leur sortie de la colonne, par un catharomètre. Séparés par une chromatographie frontale, les gaz sortent par paliers. Par différence, on peut déterminer la quantité de carbone, d'hydrogène, et d'azote présente dans l'échantillon.

2.5. Analyses biométriques.

2.5.1. Protocole.

Sorties de l'eau, les huîtres sont brossées et essuyées rapidement. Leur poids total est mesuré à l'aide d'une balance précise au centième de gramme. A l'aide d'un pied à coulisse, on mesure approximativement (compte tenu de leur forme irrégulière) la longueur des huîtres.

Après ouverture, on récupère l'animal entier et si possible le morceau de branchie prélevé au préalable pour l'analyse d'image. L'ensemble est déposé dans un tube taré. Les pesées sont effectuées sur une balance de précision (1000ième de gramme) et donnent une estimation du poids frais de chair.

Les deux valves de la coquille sont mises à l'étuve à 60°C pendant 24 heures, puis pesées sur une balance au centième de gramme suffisante, pour la mesure du poids de coquille sèche.

Les tubes, après détermination du poids frais, sont placés dans un lyophilisateur Alpha 1-4 après congélation. La lyophilisation permet d'extraire l'eau des substances congelées. La dessiccation est réalisée en évitant l'état liquide par sublimation, à une température inférieure à 10°C et sous vide.

Les substances sont transformées en produits secs, ce qui permet d'éviter les altérations enzymatiques, bactériennes et chimiques. La pesée des tubes lyophilisés donne le poids sec de chaque individu. Les tubes sont conservés au dessiccateur avant les analyses biochimiques.

2.5.2. Indice de condition.

Les fluctuations des conditions d'environnement se traduisent essentiellement par des variations de la quantité des tissus organiques présents, quantité qui détermine la "condition de l'animal" (Bodoy *et al*, 1986).

L'emploi d'indices permettant d'évaluer cette condition est courant dans les études concernant les populations exploitées (Mann, 1978 ; Berthome *et al*, 1979). La nécessité de l'usage du poids sec dans les indices physiologiques a été mise en évidence par de nombreux auteurs (Lucas & Beninger 1985 ; Mann, 1978). L'indice présentant la plus forte sensibilité correspond au rapport entre le poids sec et la différence entre poids total et poids de coquille (Lawrence & Scott, 1982). Il semble cependant souhaitable de limiter l'usage des indices de conditions à des comparaisons présentant un caractère relatif (Bodoy *et al*, 1986).

2.6. Analyses biochimiques.

Toutes les analyses biochimiques sont réalisées à partir des échantillons lyophilisés.

2.6.1. Dosages colorimétriques.

La densité optique et la concentration (calculées automatiquement) des échantillons de protéines, sucres et lipides sont évalués par le spectrophotomètre Secomam S.1000/PC Logiciel 1.9.

Il se compose de plusieurs parties :

- Le monochromateur.
- L'unité centrale et son clavier.
- Le moniteur VGA couleur.
- Des options : imprimante et système d'aspiration avec micro cuve à circulation en verre ou quartz et pompe péristaltique. Tous les paramètres sont commandés par l'unité centrale .

2.6.2. Dosage des protéines.

L'extraction des protéines est effectuée à la soude, sur 10 mg environ d'échantillon lyophilisé, selon la méthode de Lowry *et al.* (1951).

Cette méthode colorimétrique permet de déterminer les acides aminés tyrosine et tryptophane en solution, ou inclus dans des chaînes protéiques.

Les mesures, déduites d'une courbe étalon établie avec une solution d'albumine de boeuf, sont exprimés en équivalent albumine de boeuf (Annexe 6).

2.6.3. Dosage des lipides.

Sept à huit mg de chair sèche sont nécessaires pour extraire et purifier au chloroforme et au méthanol les lipides par la méthode de Bligh & Dyer (1959). Les mesures, exprimées en équivalent tripalmitate, sont estimées par la méthode de Marsh & Weinstein (1966) (Annexe7).

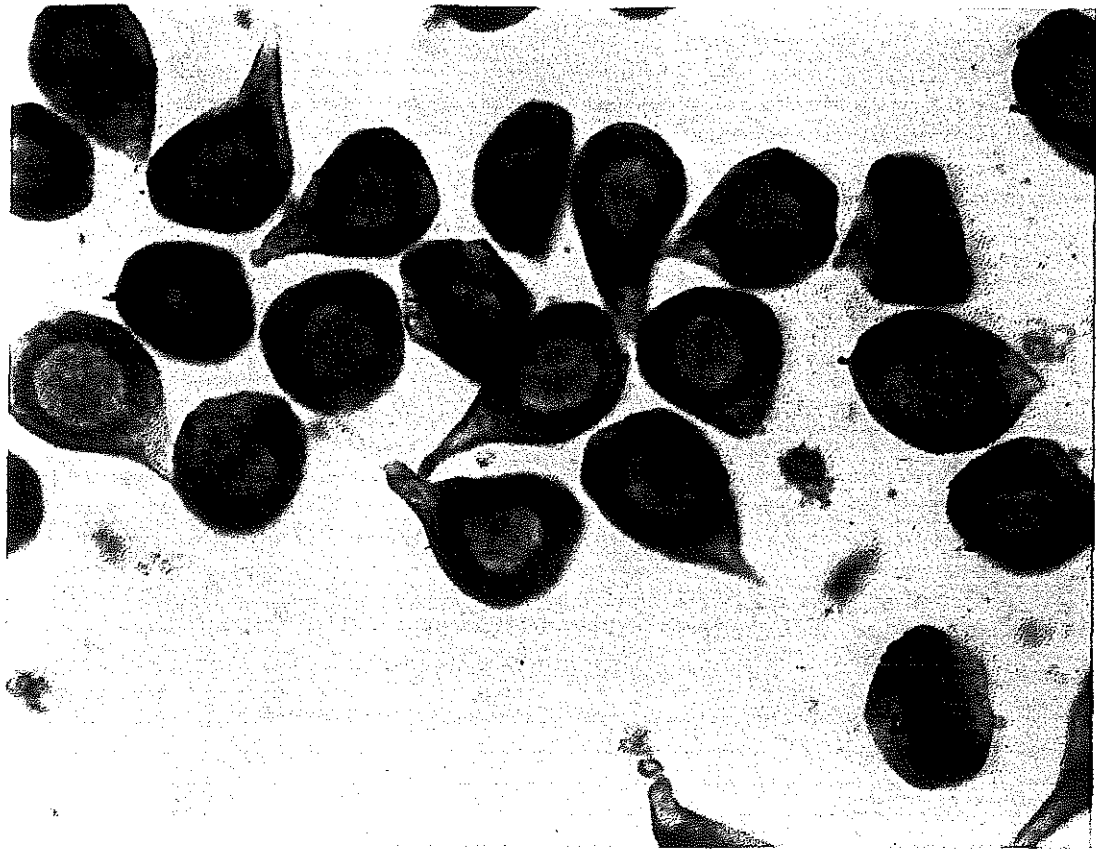
2.6.4. Dosage des glucides :

Les culots restant à l'issu du début de l'extraction des lipides (contenus dans le surnageant) sont récupérés pour l'analyse des sucres.

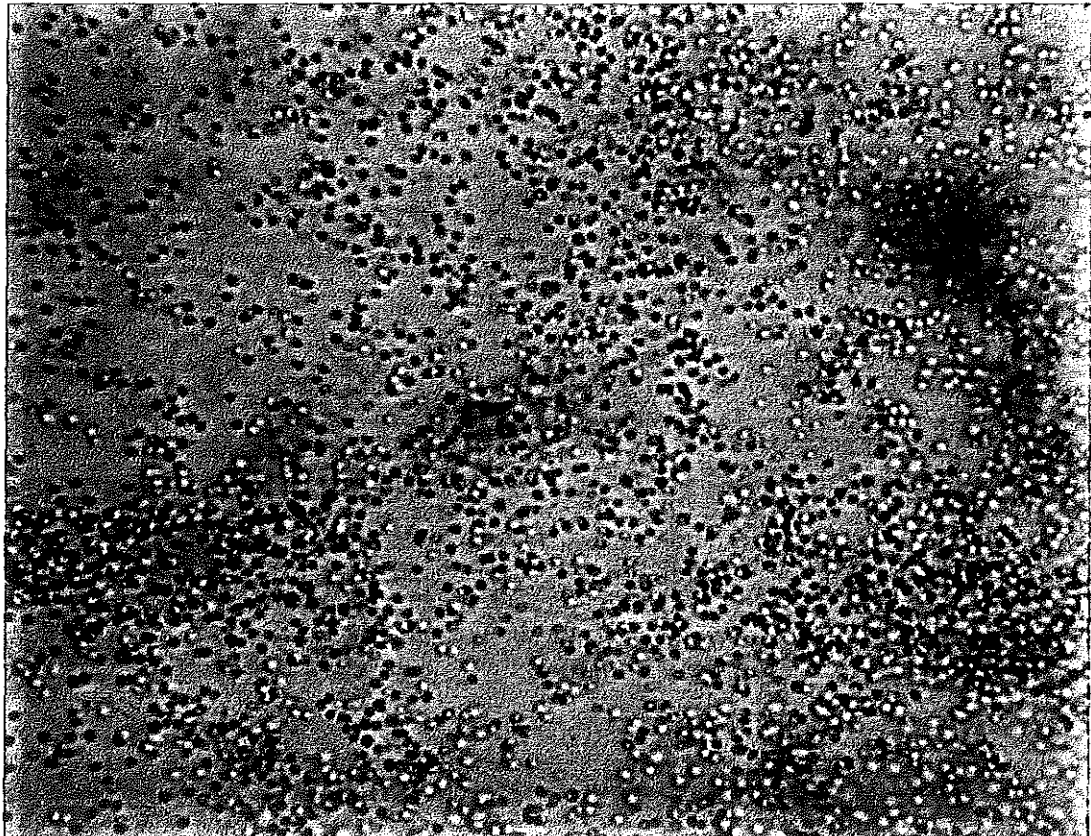
Après extraction à 4°C, au TCA à 15%, les sucres totaux et le glycogène (précipité à l'éthanol absolu) sont dosés par la méthode colorimétrique de Dubois *et al* (1956). (Annexe 8).

2.7. Sexage des individus.

Le sexe de chaque individu est déterminé en observant un frottis gonadique sur lame, au microscope. (voir photo 1 et 2).



PHOTOGRAPHIE n° 1 : ovules de *Crassostrea gigas*.



PHOTOGRAPHIE n°2 : spermatozoïdes de *Crassostrea gigas*

Il apparaît en effet des différences biochimiques entre mâles et femelles, les ovules étant plus riches en lipides. De plus, les mâles triploïdes produiraient deux fois plus de produits gonadiques que les femelles triploïdes (Allen et Downing, 1986)

2.8. Analyses statistiques.

Toutes les données biométriques et biochimiques de l'ensemble des prélèvements sont importées dans un même fichier sur le logiciel Statgraphics. Le niveau de ploïdie est codé (2 pour les diploïdes, 3 pour les triploïdes), ainsi que le site (1 pour l'estran, 2 pour la claire). Aucun espace ne doit figurer entre chaque prélèvement également codés de 1 à 6 (le logiciel les comptabiliserait comme données nulles). Avant analyse, tous les diploïdes réfractaires (diploïdes présents dans les lots triploïdes) ont été éliminés : le faible nombre de ces réfractaires ne permettait pas de les analyser séparément.

2.8.1. Analyse des données de mortalités.

Les pourcentages de mortalité obtenus en claire et sur estran pour les diploïdes et les triploïdes, sont comparés selon la statistique de test ϵ suivante (Schwartz, 1963) :

$$\epsilon = \frac{|p_a - p_b|}{(pq/n_a + pq/n_b)^{0.5}}$$

où p_a et p_b sont les deux pourcentages à comparer, n_a et n_b sont les effectifs à partir desquels ont été calculés ces pourcentages et :

$$p = (p_a \times n_a + p_b \times n_b) / (n_a + n_b) \quad \text{et} \quad q = (1 - p)$$

Les pourcentages sont significativement différents à 5 % si $\epsilon \geq 1.96$ (table de la loi normale).

2.8.2. Analyse de variance.

2.8.2.1. Principe de l'analyse.

L'analyse de variance est une comparaison de plusieurs moyennes basée sur le rapport F prenant en compte, au numérateur la variance entre "colonnes" c'est-à-dire entre échantillons des différentes populations à comparer, et au dénominateur la variance "intra-colonne" appelée aussi résiduelle (Schwartz, 1963). Ces moyennes diffèrent significativement dans leur ensemble au risque 5 % si F dépasse la limite $F(c-1, N-c)$ lue dans une table de F à 5 % pour les degrés de liberté $(c-1)$ et $(N-c)$, N étant le nombre total de mesures et c le nombre de populations à comparer.

Deux modèles ont été analysés sous le logiciel Statgraphics. Le premier permet de prendre en compte l'ensemble des mesures relevées à La Tremblade :

$$Y_{ijkl} = \mu + d_i + p_j + s_k + f_{ij} + g_{ik} + h_{jk} + i_{ijk} + E_{ijkl}.$$

Y_{ijkl} : variable quantitative continue mesurée pour la date i , la ploïdie j le site k et l'individu l ,

μ : moyenne générale,

d_i , p_j et s_k : effets fixes de la date, de la ploïdie et du site,

f_{ij} , g_{ik} , h_{jk} , i_{ijk} : interactions d'ordre 2 entre date et ploïdie, date et site, ploïdie et site, et d'ordre 3 entre site, ploïdie et date,

E_{ijkl} : effet aléatoire ou résiduelle.

Le second modèle permet d'analyser les résultats au point zéro, c'est à dire pour le prélèvement de Mars, avant la distribution des huîtres entre claire et estran (avec les même notations):

$$Y_{jl} = \mu + p_j + E_{jl}.$$

Pour un effet fixé donné, le test F sera significatif, c'est-à-dire que l'hypothèse nulle (égalité des moyennes) sera rejetée, si cet effet est très supérieur à la résiduelle, c'est à dire si la variation due à cet effet est supérieure aux variations dues aux facteurs non contrôlés, aux erreurs, au "bruit de fond". Une interaction significative entre deux facteurs signifiera que le classement des individus pour chaque niveau du premier facteur dépendra du niveau du second facteur.

Le coefficient de variation est égal au rapport de l'écart-type résiduel sur la moyenne générale et donne la précision de l'expérience. Une expérience sera considérée comme précise si ce coefficient est inférieur à 10%.

2.8.1.2. Conditions d'application.

L'analyse de variance n'est applicable sur une variable donnée que si les différentes séries mesurées (par site, par ploïdie...) sont distribuées normalement, et ont toutes la même variance. L'ajustement à une loi normale est testée par un χ^2 . En cas de non-ajustement, les variables brutes sont transformées et réajustées sous cette nouvelle forme. Deux transformations classiques ont été testées : log (pour les données de croissances) et arcsin (pour les pourcentages). En cas de non-ajustement sous leur forme transformée, les données brutes sont alors analysées facteur par facteur selon la méthode non paramétrique par rang de Kruskal-Wallis sous le logiciel Statgraphics.

Les tests F fournis par l'analyse de variance sont d'autant plus robustes que les effectifs des différentes séries sont plus grands : $N \geq 30$ (Schwartz , 1963), ce qui est le cas dans cette étude.

2.8.3. Analyse discriminante.

L'analyse discriminante est une analyse multivariée déterminant la combinaison de variables permettant le mieux de différencier des populations déclarées à priori comme différentes selon un facteur donné. Un test d'ajustement permet de juger de la pertinence de la ségrégation déclarée à posteriori après calculs, par rapport à la ségrégation déclarée à priori. Il est souvent conseillé d'étudier la matrice de corrélations entre les différentes variables susceptibles d'intervenir dans l'analyse et d'éliminer celles qui sont trop corrélées entre elles et qui n'apportent donc pas d'information propre.

Deux analyses discriminantes ont été étudiées sur l'ensemble des données : l'une en déclarant le site, l'autre en déclarant la ploïdie comme facteurs discriminants.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1.Déroulement des expériences.

3.1.1.Ploïdie.

Le niveau de ploïdie a été déterminé pour tous les prélèvements, à l'exception des deux premiers, suite à des problèmes de coloration des lames destinées à l'analyse d'image. A la suite de cette analyse, les individus diploïdes réfractaires ont été éliminés des lots. On trouve pour les quatre derniers prélèvements :

- Prélèvement 3 : 83.3% de triploïdes sur estran et en claire.
- Prélèvement 4 : 66.7% de triploïdes sur estran et en claire
- Prélèvement 5 : 90.0% de triploïdes sur estran et 86.7% en claire
- Prélèvement 6 : 86.7% de triploïdes sur estran et 76.7% en claire

Des individus provenant des lots triploïdes prégrossis à la nurserie de Bouin avaient été analysés par l'URGE, avant leur envoi à La Tremblade. Les résultats avaient conclu à un taux de 90% de triploïdes. Les analyses concernant les prélèvements 3, 4 et 6 ne sont pas significativement différents à 5% de ce taux initial. Le pourcentage de triploïdes déterminé pour le quatrième prélèvement (66%) est lui, significativement différent de 90%, ce qui peut s'expliquer par un problème d'échantillonnage. Les individus des deux premiers prélèvements non analysés, seront considérés comme triploïdes à 100%. Cette approximation est possible compte tenu du faible nombre d'individus diploïdes réfractaires analysés lors du contrôle à Bouin. De plus, la différence entre lots diploïdes et triploïdes n'est pas encore importante au début du printemps.

Remarque : Le contrôle de ploïdie de l'ensemble des individus diploïdes (30) n'a été effectué que pour les quatre premiers prélèvements. Comme ces lots se sont révélés diploïdes à 100%, seuls 3 à 4 individus ont été suivis en ploïdie par la suite, pour servir de référence externe en analyse d'image.

3.1.2.Qualité du site.

3.1.2.1.Sur estran.

La qualité du site de Bourgeois a permis un suivi minimum de l'élevage consistant à retourner les poches à chaque date de prélèvement pour éviter la prolifération de macroalgues colmatant les mailles. Aucun problème majeur n'est à signaler sur la période considérée.

3.1.2.2.En claire.

L'événement principal a été le changement de claire le 17 mai, suite à de fortes mortalités. Le sol argileux de la claire de Ronce les Bains était très perméable et le niveau d'eau très difficile à maintenir en dépit des grandes marées et du pompage. A la mi-mai, la température

relativement élevée, le faible niveau d'eau et le temps orageux ont vraisemblablement été la cause des mortalités enregistrées. L'autre claire, située en Avallon sur un marais équipé d'un système de mise à niveau, s'est avérée plus favorable à l'élevage. Après une période d'adaptation durant laquelle quelques mortalités ont encore été enregistrées, les huîtres ont pu reprendre une croissance normale.

3.1.3.Mortalités.

Diploïdes :

Date	Nombre en claire	Nombre sur estran	Mortalité en claire	Mortalité sur estran	% survie en claire	% survie sur estran	Différence statistique
20 mars	210	210	0	0	100	100	ns
22 avril	210	210	0	0	100	100	ns
25 mai	210	210	60	0	71.43	100	s***
24 juin	150	210	0	12	71.43	94.28	s***
19 juillet	150	208	23	38	60.5	88.1	s***

ns : différence non significative à 5%.

s* : différence significative à 5%.

s** : différence significative à 1%;

s*** : différence significative à 0.1%.

Triploïdes :

Date	Nombre en claire	Nombre sur estran	Mortalité en claire	Mortalité sur estran	% survie en claire	% survie sur estran	Différence statistique
20 mars	210	210	0	0	100	100	ns
22 avril	210	210	0	0	100	100	ns
25 mai	210	210	56	0	73.33	100	s***
24 juin	154	210	0	4	73.33	98.1	s***
19 juillet	154	206	27	24	60.5	86.66	s***

ns : différence non significative à 5%.

s* : différence significative à 5%.

s** : différence significative à 1%;

s*** : différence significative à 0.1%.

Différence triploïdes-diploïdes :

Taux de survie	Estran 2N	Estran 3N	Différence statistique	Claire 2N	Claire 3N	Différence statistique
20 mars	100	100	ns	100	100	ns
22 avril	100	100	ns	100	100	ns
25 mai	100	100	ns	71.43	73.33	ns
24 juin	94.28	98.1	s*	71.43	73.33	ns
19 juillet	88.1	86.66	ns	60.5	60.5	ns

A part pour le prélèvement du 24 juin sur l'estran, il n'y a aucune différence significative pour les taux de survie entre diploïdes et triploïdes d'un même site. Le niveau de ploïdie ne semble donc pas influencer le taux de survie des huîtres sur la période considérée. En revanche le site apparaît comme un facteur important à partir du 25 mai, le taux de survie étant significativement supérieur sur estran, pour les deux niveaux de ploïdie. Il faut cependant rappeler qu'à partir du 25 mai, à la suite des fortes mortalités (non sélectives) des lots diploïdes et triploïdes, les huîtres ont été transférées dans la claire d'Avallon. Après cette date, les taux de survie sont identiques en claire et sur estran en pourcentages non cumulés.

3.2. Hydrobiologie.

3.2.1. Températures, salinités.

Les fluctuations de températures et de salinités sur estran et en claire (Figures 8 et 9) semblent similaires sur les deux sites aux mêmes dates. Une hausse de température survient au cours du mois de mai liée au réchauffement de l'air (Figure 10).

Les précipitations importantes au début du mois de juin (Figure 11) ont entraîné une légère diminution des salinités. En claire, le milieu est moins renouvelé que sur estran et la hauteur d'eau plus faible (1 m au maximum). La salinité est donc plus faible que sur estran sur l'ensemble du suivi à Ronce, puis à Avallon. Les salinités augmentent ensuite parallèlement à la température au mois de juillet, en rapport avec le phénomène d'évaporation : précipitations très faibles (Figure 11), et température extérieure élevée (Figure 10).

3.2.2. Sestons.

La Figure 12 montre que les sestons minéraux expliquent en moyenne plus de 80 % de la matière en suspension en claire. La part de sestons minéraux est beaucoup plus faible en début de période d'étude (Figures 12 et 13) dans la claire de Ronce. Dans cette claire, le renouvellement ne se produit qu'aux grandes marées, la remise en suspension est faible et la sédimentation de la partie minérale importante. Le 17 mai, après le transfert en Avallon sur un

Fig.8 : TEMPERATURE ET SALINITE
en Claire

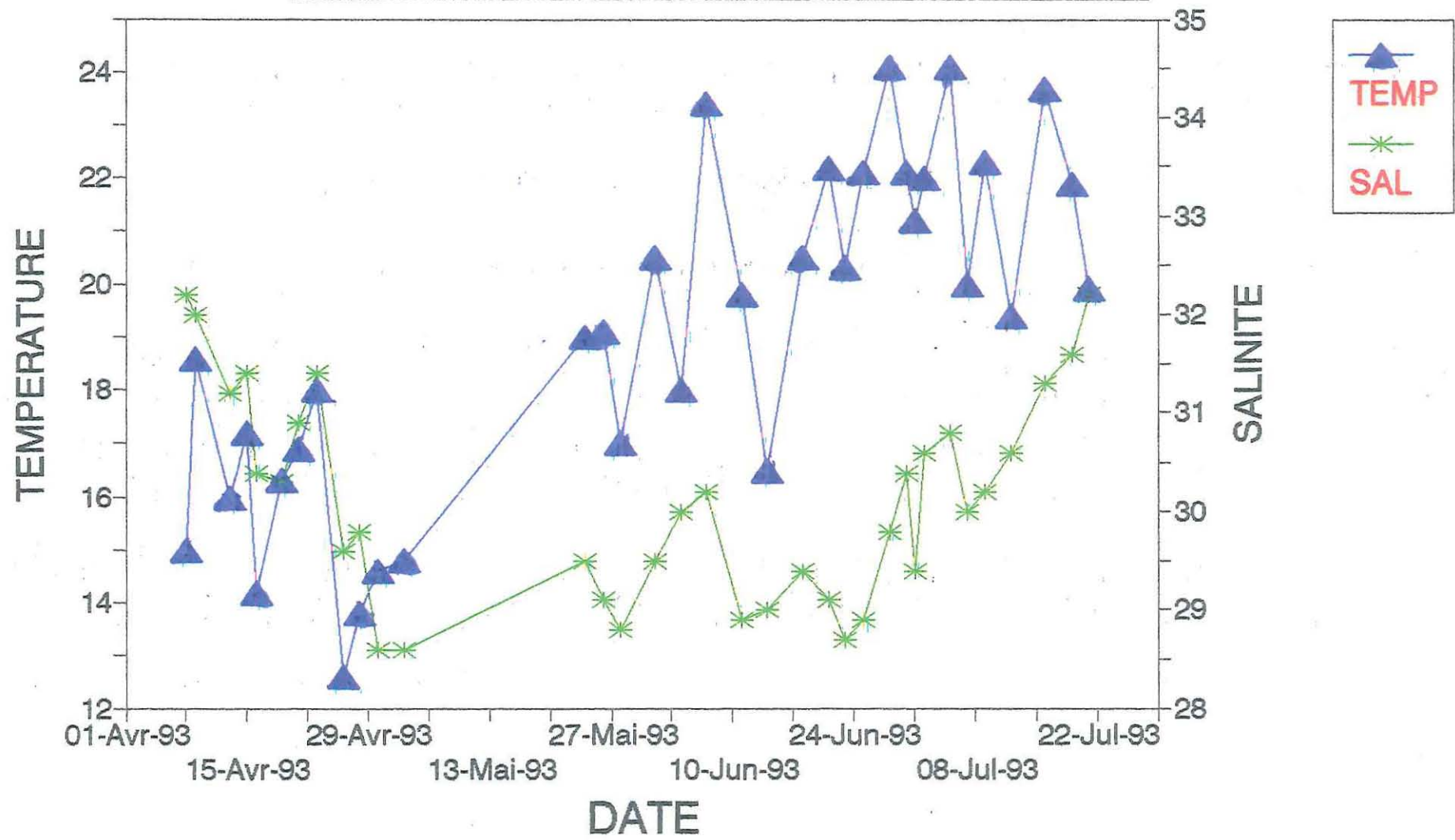
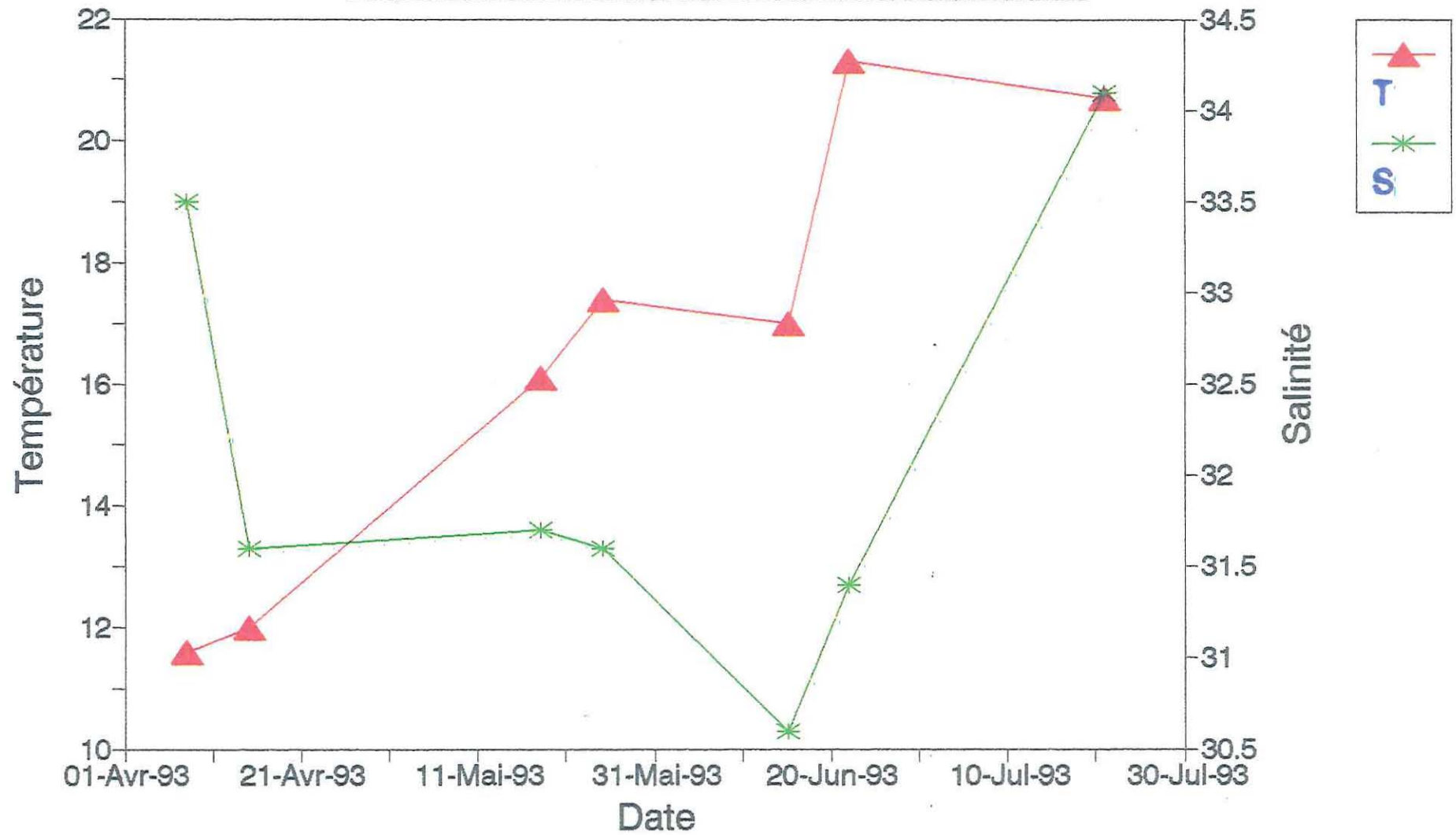
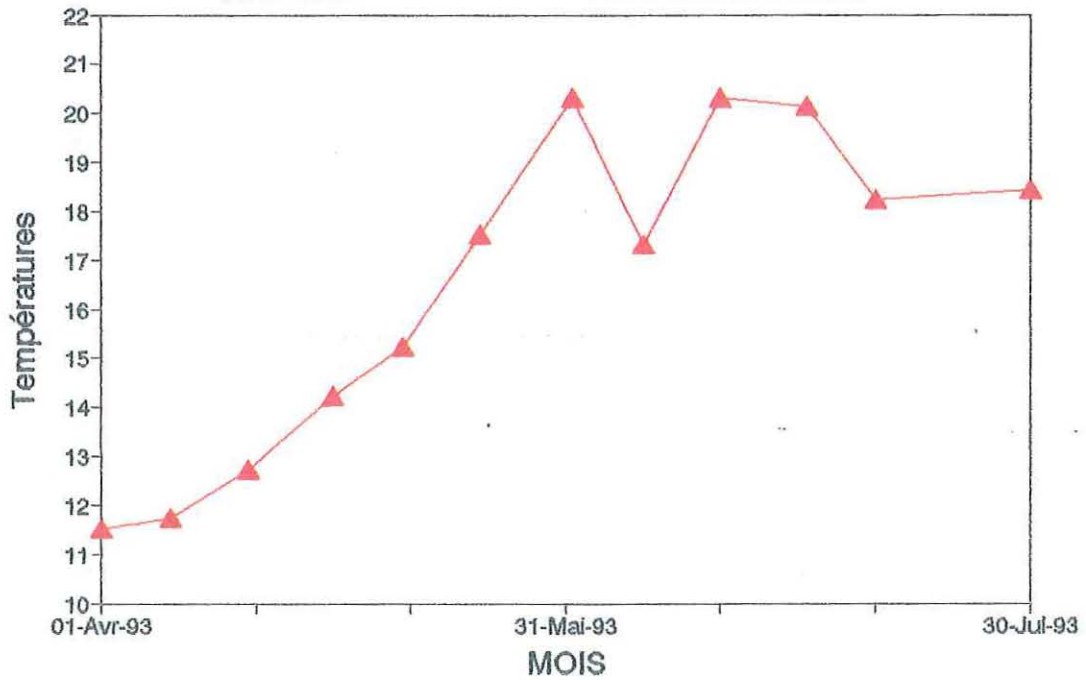


Fig.9 : Températures et salinités sur Estran



**Fig.10. Températures moyennes
Station du château d'oléron**



**Fig.11. Précipitations et insolation
Station du château d'oléron**

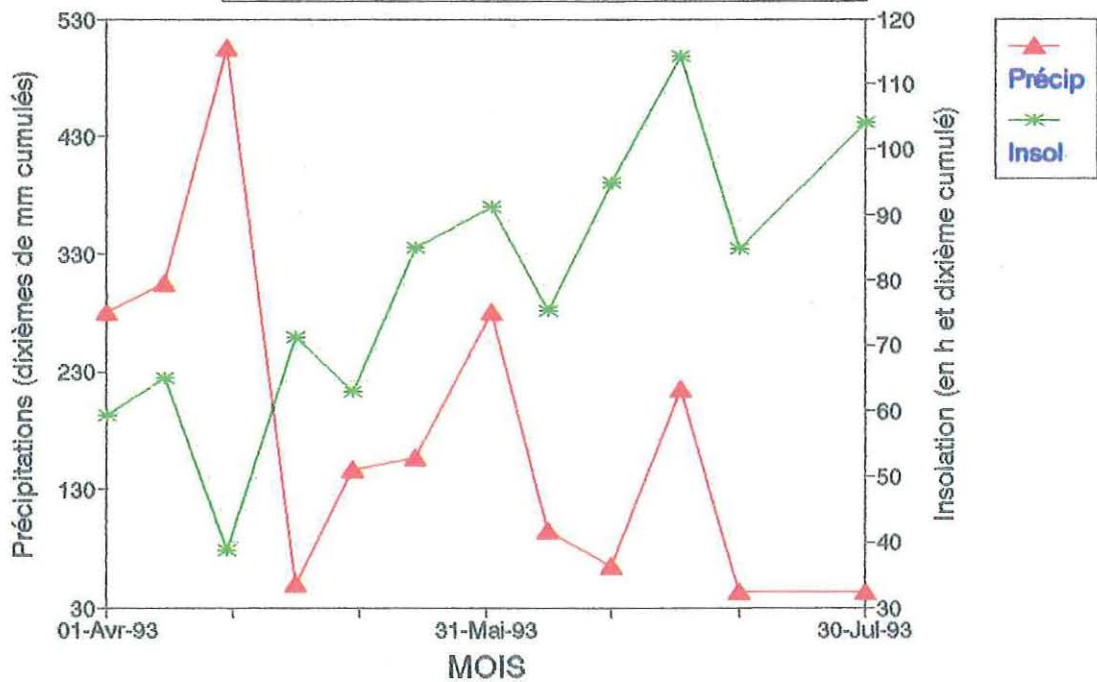


Fig.12 : Evolution des pourcentages en sestons Organiques et Minéraux

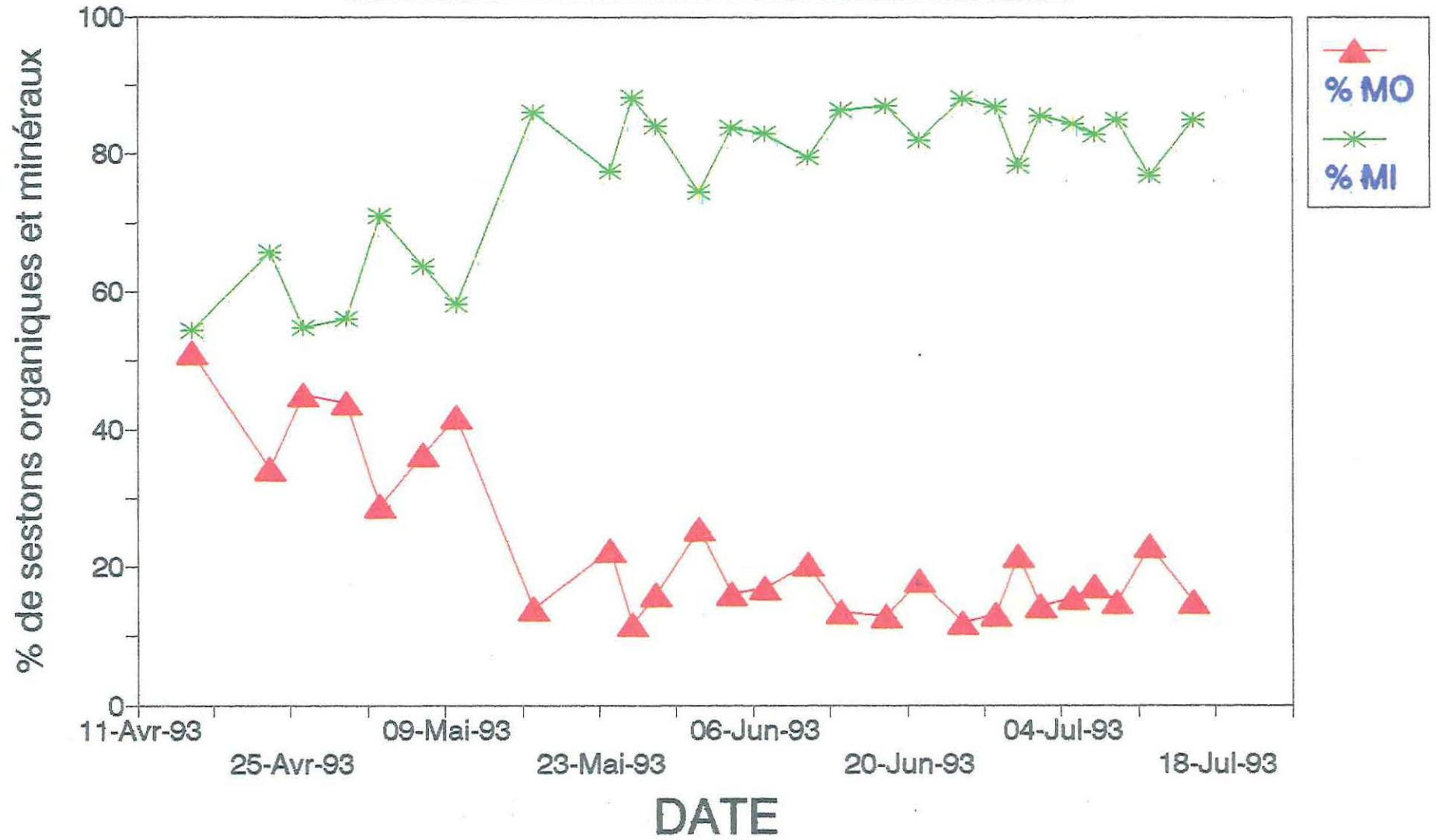


Fig.13 : SUIVI HYDROBIOLOGIQUE
en Claire

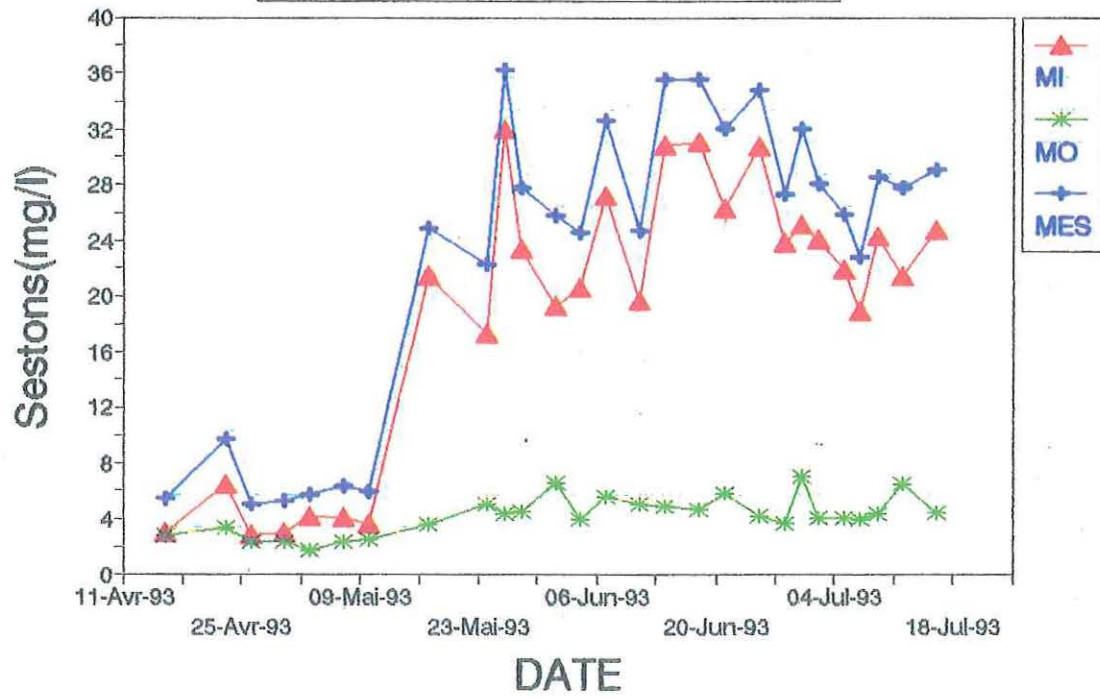
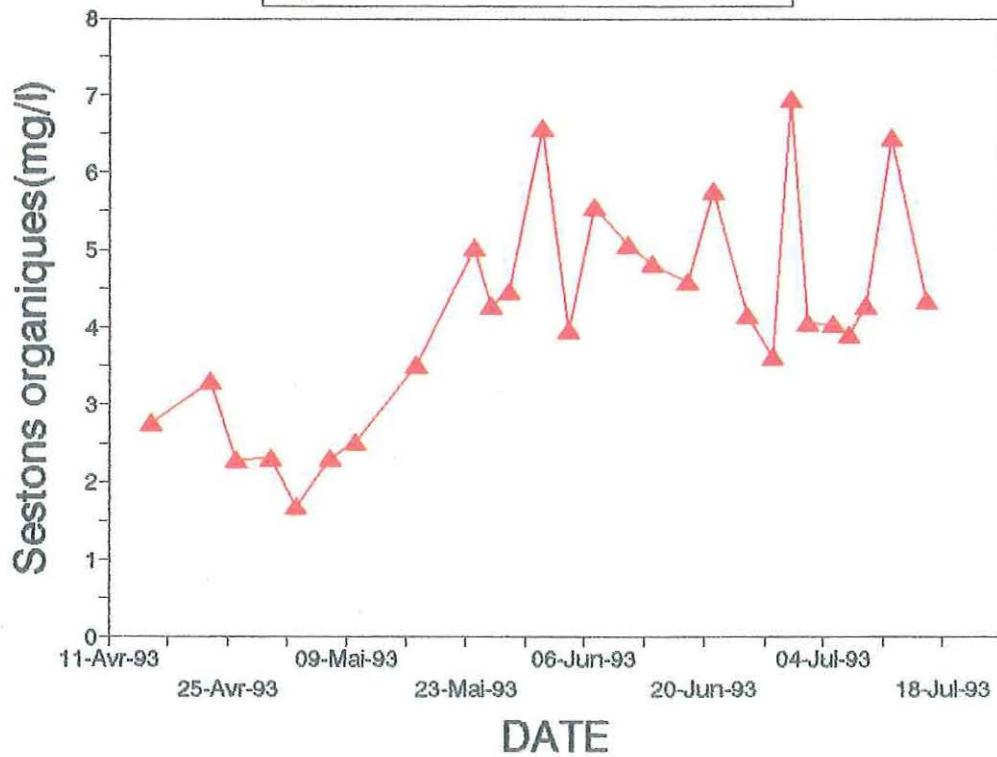


Fig.14 : SESTONS ORGANIQUES



marais dont le renouvellement s'effectue à plus faible coefficient, la partie minérale augmente du fait d'une remise en suspension plus importante.

La Figure 14 montre effectivement que la part de sestons organiques augmente considérablement au cours du mois de mai, passant de 2 à une moyenne de 4.81 mg/l sur toute la période (en Avallon). L'augmentation de température (Figure 10) et du niveau d'insolation (Figure 11) a dû permettre un développement phytoplanctonique à la fin mai. Le meilleur renouvellement d'eau a dû également jouer un rôle.

La comparaison avec les mesures sestoniques effectuées sur estran est délicate. La charge sestonique, aussi bien minérale qu'organique, y apparaît plus faible que dans la claire d'Avallon (Figures 15 et 16). Cependant ces valeurs ne sont pas indépendantes des dates de prélèvements effectués lors de coefficients de marée très différents. En effet, la charge sestonique augmente avec les coefficients de marée. Les maxima simultanés de sestons totaux, organiques et minéraux du 21 juillet (Figure 15) sont mesurés par un coefficient de 101. Il existe en outre une évolution journalière de la charge sestonique, dépendant de la hauteur d'eau. Les quelques mesures exploitables sur estran proviennent souvent de prélèvements effectués à faibles coefficients de marée. On peut donc penser à une sous-estimation de la charge sestonique.

3.2.3. Chlorophylle et phéopigments.

L'évolution des biomasses phytoplanctoniques (Figure 17) en claire, exprimée en chlorophylle a donne deux maxima : l'un à 5.98 $\mu\text{g/l}$ à la fin-mai l'autre à 7.04 $\mu\text{g/l}$ à la mi-juin. Ces valeurs correspondent à la pousse printanière tardive. Les apports telluriques et les précipitations (Figure 11) du mois d'avril ont été importants. Ces valeurs sont relativement conformes avec celles obtenues lors de précédentes études sur la même claire. Le pic observé en juin concorde avec le taux de matière organique observé à la même date (Figure 14) et aux deux pics simultanés de glucides et protéines particulières (Figure 19). Durant l'été, avec la prédominance des influences océaniques, les apports nutritifs étant faibles, la biomasse phytoplanctonique décroît (Zanette, 1980). Sur estran, deux pics de chlorophylle d'amplitudes moindres que ceux relevés en claire sont présents aux mêmes dates (Figure 18).

Les valeurs en phéopigments nettement plus faibles sur estran, suivent les mêmes évolutions que les teneurs en chlorophylle a. Le rapport chlorophylle $\times 100 / (\text{chloro} + \text{phéo})$ varie en claire de 48 à 75 % avec une moyenne de 59 % traduisant la présence de populations phytoplanctoniques jeunes à renouvellement permanent (Zanette, 1980).

Ceci est confirmé par le rapport protéines sur glucides qui donne en moyenne une valeur de 1.24. Ce rapport, inférieur à 2, caractérise des cellules vivantes (Mc Allister *et al*, 1961). Sur

Fig.15 : Hydrobiologie sur Estran

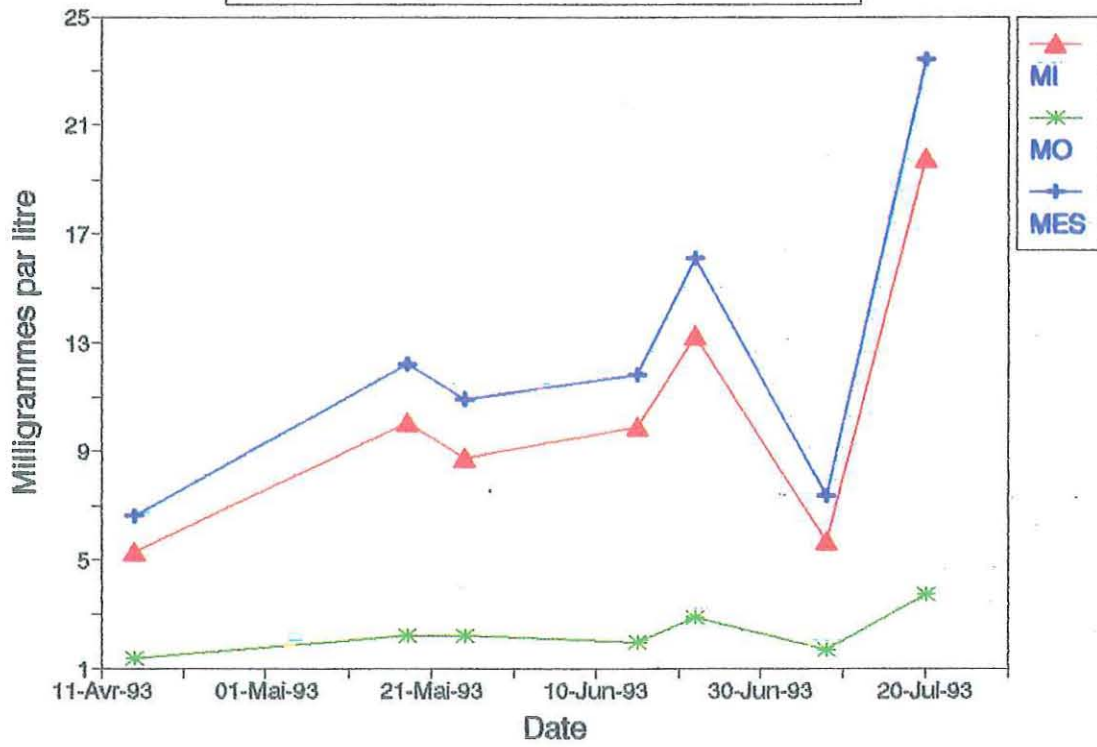


Fig.16 : Sestons organiques

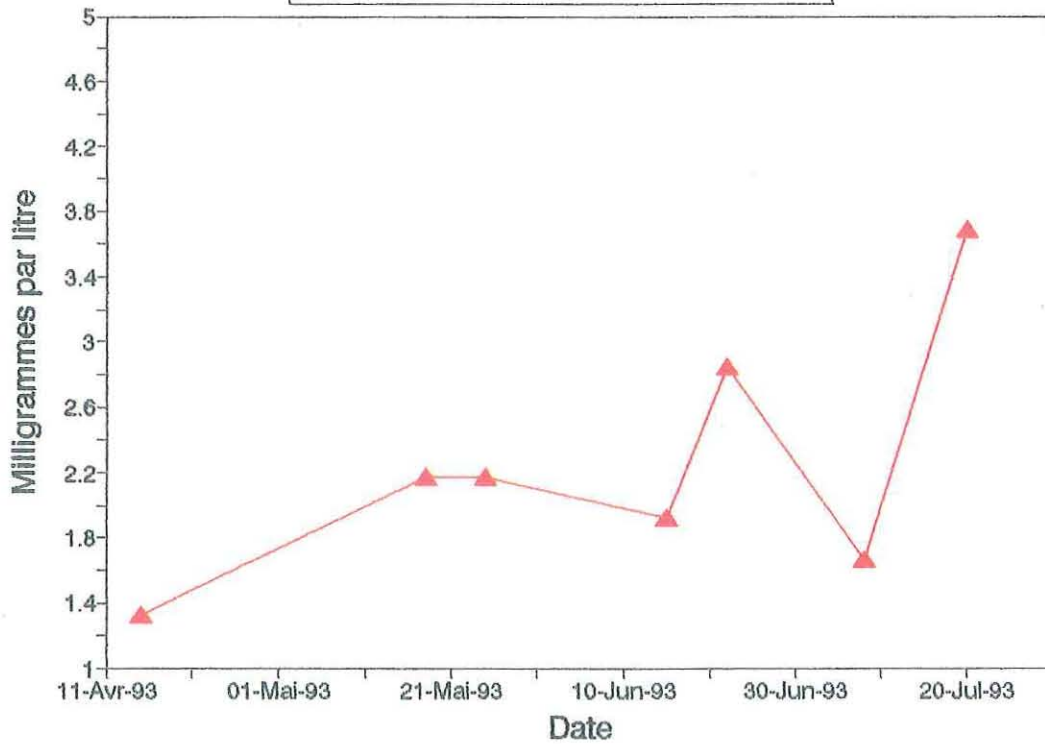


Fig.17. Chlorophylle A et phéopigments
En Claire

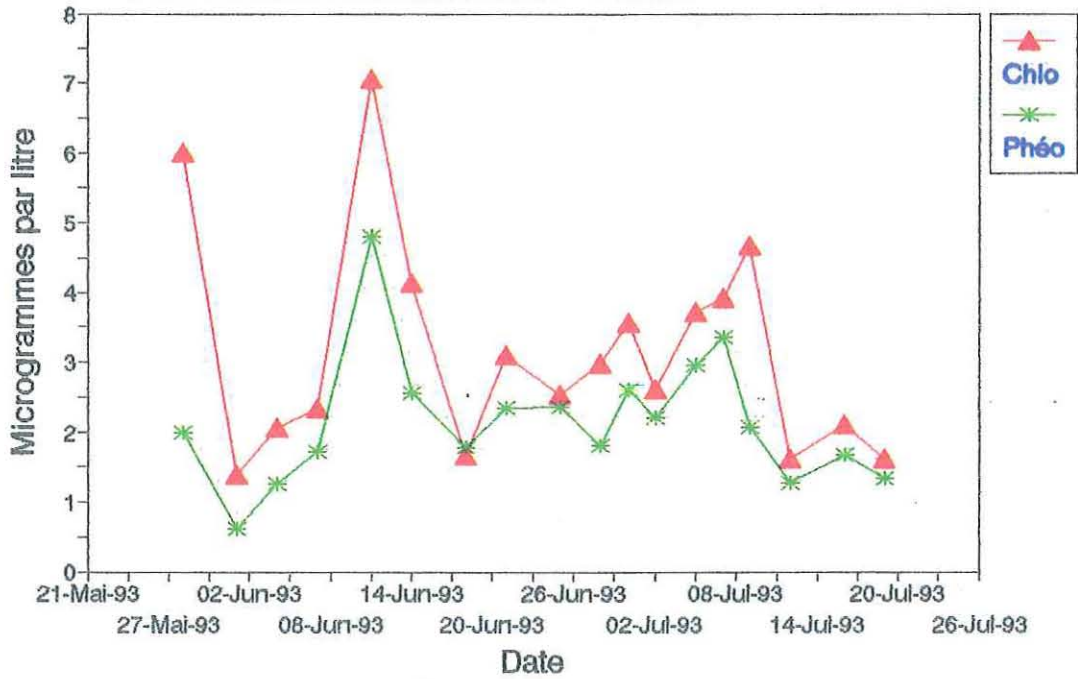
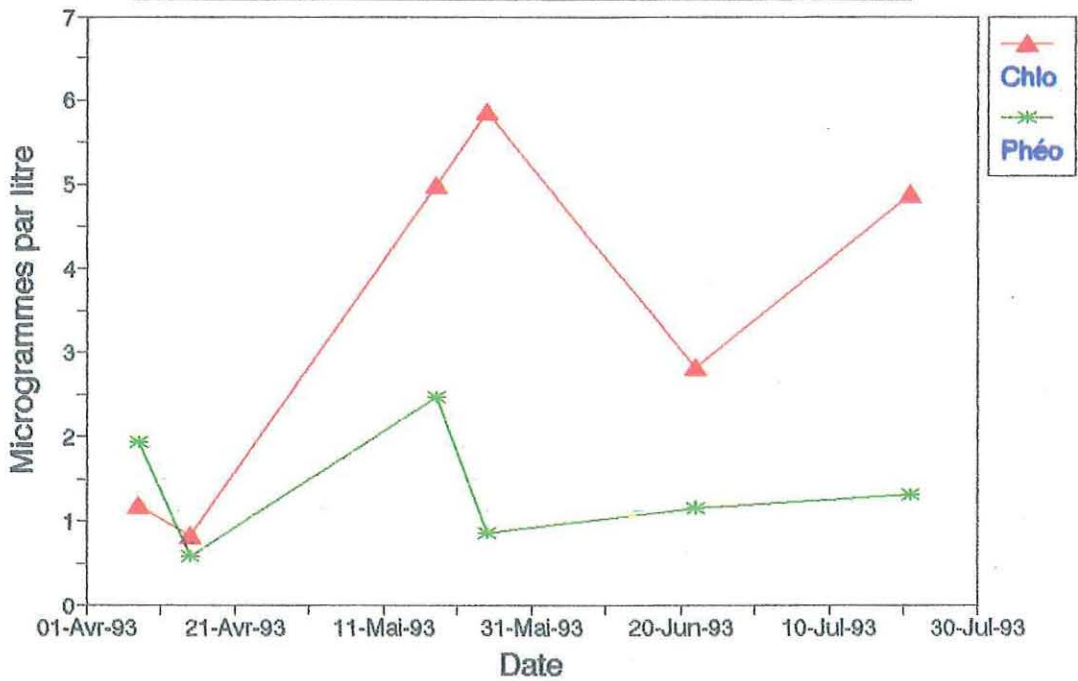


Fig.18. Chlorophylle A et phéopigments
sur Estran



estran, la teneur en phéopigments est variable en fonction des marées. Ces phéopigments proviennent de la dégradation des pigments chlorophylliens qui se produit lors de la mort des cellules, ou du broutage par les organismes filtreurs. La supériorité de la quantité de phéopigments par rapport aux chlorophylles en vives eaux traduit la remise en suspension des cellules dégénérantes et du sédiment, lui-même riche en phéopigments.

3.2.4. Biochimie particulière.

La chlorophylle a permis une estimation de la biomasse active dans la production de matière organique par photosynthèse. L'analyse biochimique donne au contraire une estimation de la matière organique en suspension portée par les particules vivantes ou détritiques (Nedhif, 1984).

Les protéines, lipides et glucides particuliers (Figure 19) évoluent dans le même sens que les sestons organiques. Entre le 23 mai et le 21 juillet, les sucres sont légèrement majoritaires devant les protéines, les lipides étant minoritaires. Leur somme représente en moyenne 26.1 % du séton organique, ce qui est conforme aux études menées sur le bassin de Marennes-Oléron (Héral *et al.*, 1980)

Remarque : En fait les protéines sont probablement en quantité plus importante car sous-estimées par la méthode de Lowry *et al.* (1951) qui ne dose que les protéines de structure.

3.2.5. Carbone et azote.

On obtient des valeurs très proches par duplicats qui sont dues à une bonne précision et une bonne fiabilité de l'appareil. Il est cependant difficile d'exploiter ces résultats sur une si courte période (10 mai au 10 juin).

On peut noter que conformément aux données sestoniques, les valeurs de carbone et d'azote doublent après le changement de claire (Figure 20 et 21).

Le rapport C/N avoisine 5 en moyenne sur toute la période avec un écart-type faible (0.55). Ce rapport, utilisé pour caractériser un site à un moment donné, exprime ici, par comparaison avec des valeurs plus fortes sur le bassin, la transparence de l'eau des claires. Celle-ci est liée à une sédimentation plus rapide de la partie minérale due aux faibles mouvements de la masse d'eau (Zanette, 1980).

La valeur en carbone est en moyenne quatre fois supérieure à celle de l'azote. Le carbone semble être un bon marqueur de la matière organique (Jamoneau, 1993). C'est cette valeur qui semble le mieux rendre compte du pic de matière organique du 4 juin (Figure 20). Le pic d'azote est simultané et visible sur la figure 21 avec une échelle plus dilatée.

Fig. 19 : Biochimie particulière en Claire

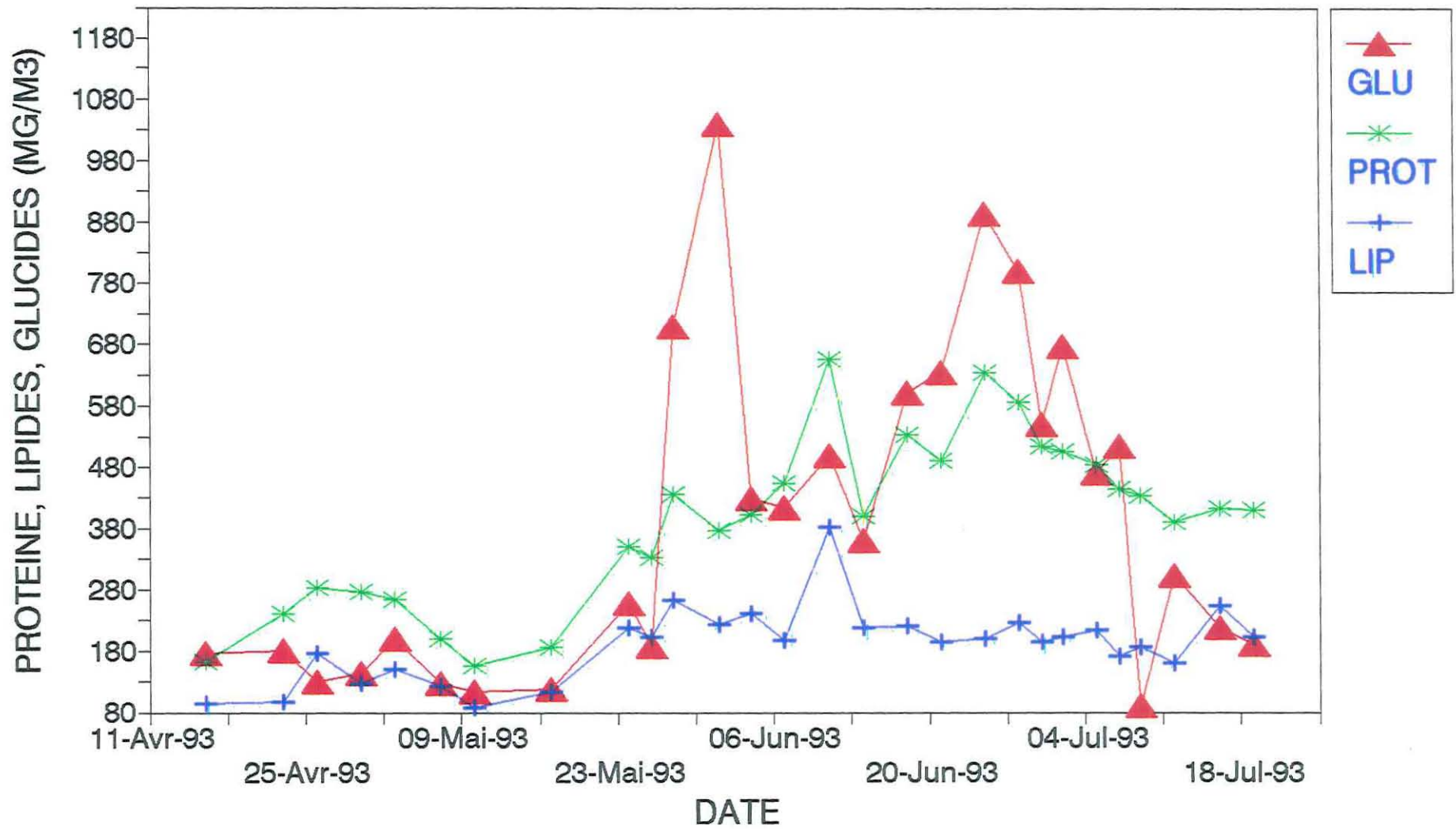


Fig.20 : Comparaison Sestons organiques et valeurs de carbone et d'azote

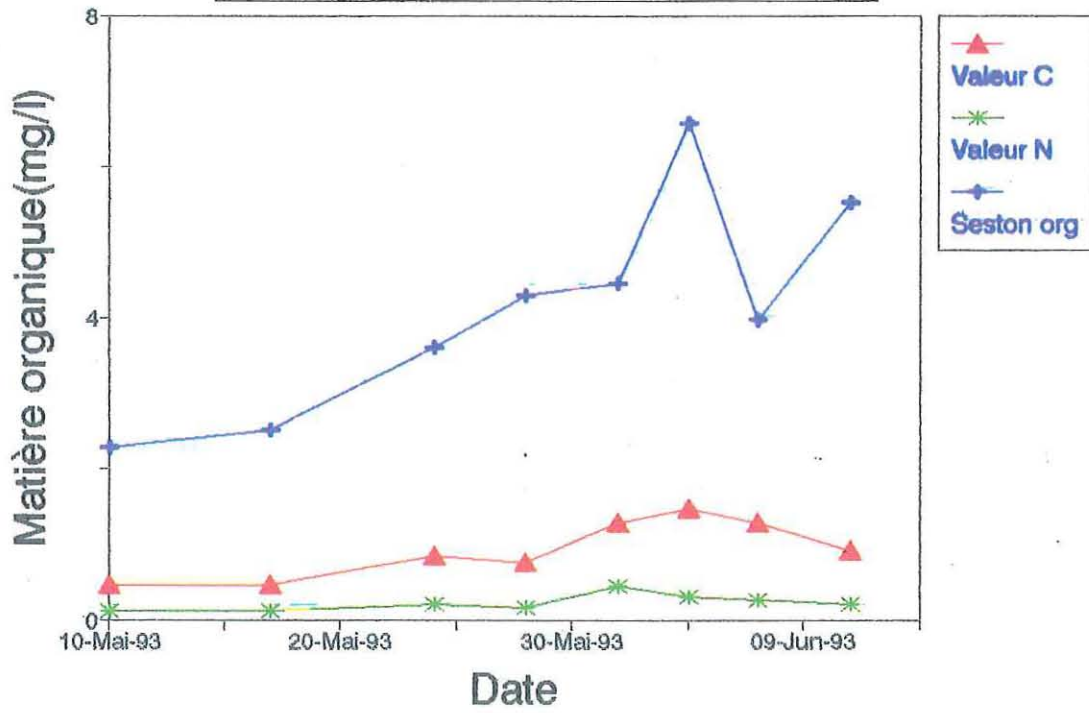
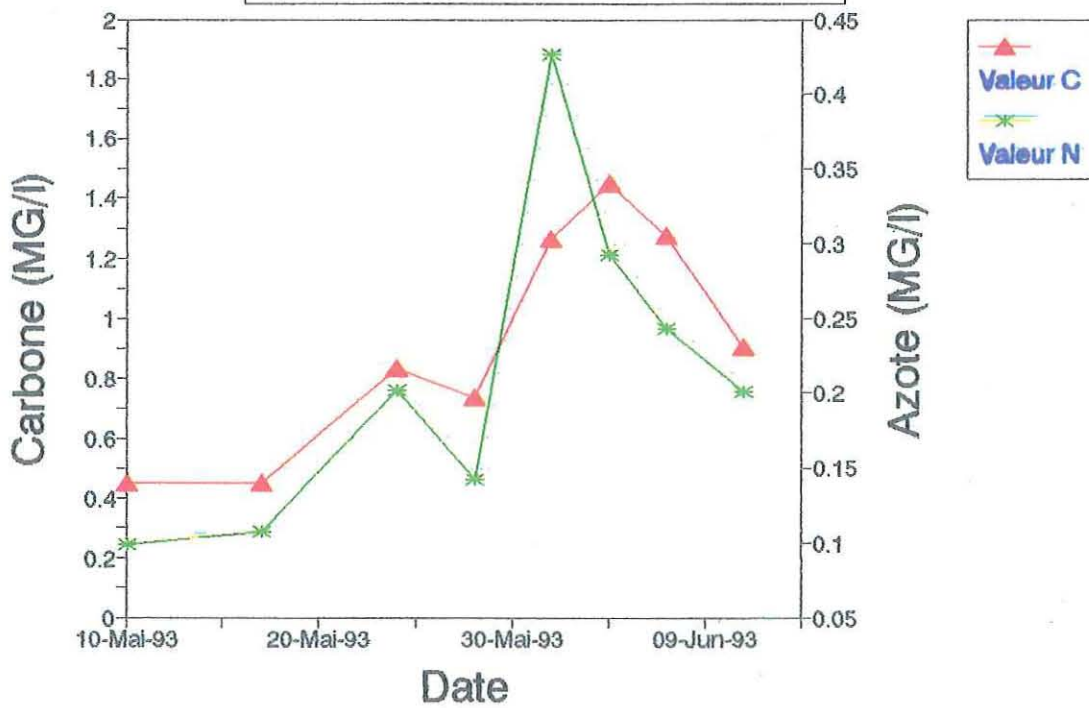


Fig.21 : Valeurs de carbone et d'azote en Claire



L'écart important entre sestons organiques et carbone + azote s'explique par une surestimation de la fraction organique, évaluée par la méthode des pesées (Dankers & Laane, 1983). A 450°C, lors de la perte au feu, la matière organique se transforme en CO₂ et H₂O mais l'eau de constitution des argiles s'évapore également. La matière organique estimée par différence de pesée est donc bien surestimée. L'eau d'évaporation des argiles représente 10 % du poids de soston minéral (A.L. Barillé, comm. pers.).

Le rapport protéines particulaires/ azote semble relativement stable (0.58), mais le nombre d'échantillons est bien trop faible pour confirmer avec certitude cette tendance.

3.3. Evolution des paramètres biologiques.

3.3.1. Vérification des hypothèses.

Au point 0, les paramètres poids total, poids de coquille, poids frais, poids sec, s'ajustent à une distribution lognormale (Tableau 1). Les pourcentages de protéines et de lipides s'ajustent à une distribution arcsinus. Tous ces paramètres seront testés en analyse de variance. En revanche, les pourcentages de glycogène et de sucres totaux ne s'ajuste pas à une distribution arcsinus et devront être analysés en test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

Tableau 1 :

Variable	Distribution lognormale	Distribution arcsinus	Ploïdie
Poids total	ns		ns
Poids coquille	ns		ns
Poids frais	ns		ns
Poids sec	ns		ns
% protéines		ns	s**
% lipides		ns	ns
% glycogène		s***	ns (Krus-Wallis)
% Sucres totaux		s***	ns (Krus-Wallis)

Sur l'ensemble de la période (Tableau 2), seul le logarithme du poids sec et l'arcsin du pourcentage de protéines s'ajustent à une loi normale. Le poids de coquille et le poids frais ne suivent pas une distribution lognormale. Cependant, étant donné le faible niveau de signification des tests d'ajustement, les données seront tout de même traitées en analyse de variance. L'analyse de variance est effectivement une méthode statistique robuste qui donne des résultats fiables même en cas de non conformité légère des hypothèses de base. Les autres

Tableau 2 : Analyse de variance

Variable	Distrib lognormale	Distrib arcsinus	Site	Ploidie	Date	S × P	S × D	P × D	S × P × D	coefficient de variation	Distrib normale des résidus
Poids sec	ns		s***	s***	s***	ns	s***	s**	ns	5.6 %	s* (0.04)
Poids total	s***		ns	s**	s***						
Poids coquille	s*		ns	s***	s***	ns	ns	ns	ns	9.0 %	ns (0.64)
Longueur	s***		ns	ns	s***						
Poids frais	s*		s***	s***	s**	ns	s***	s***	ns	93 %	ns (0.32)
% protéines		ns	s***	s***	s***	ns	s***	s*	s***	9.5 %	ns (0.44)
% lipides		s***	s**	s***	s***						
% glycogène		s***	s***	s***	s***						
% sucres totaux		s***	s***	s***	s***						

L'ajustement des distributions sont testées par un χ^2

ns : test non significatif à 5%

s* : test significatif à 5%

s** : test significatif à 1%

s*** : test significatif à 0.1%

paramètres seront analysés par la méthode non paramétrique de Kruskal-Wallis, effet après effet, ce qui donne des tests moins précis.

3.3.2. Test des effets.

3.3.2.1. Point zéro.

On constate qu'en début d'expérience les lots diploïdes et triploïdes ne sont pas significativement différents (Tableau 1) sur les paramètres étudiés, à l'exception du taux de protéines qui apparaît supérieur chez les triploïdes (Figure 27).

3.3.2.2. Effet date.

Il est évident que l'effet date est hautement significatif pour tous les paramètres considérés, dans la mesure où il traduit la croissance des huîtres. Rappelons qu'il est néanmoins intéressant de déclarer les effets fixés connus à priori, ceci afin de réduire la résiduelle intervenant dans les tests F.

3.3.2.3. Effets ploïdie et date.

Longueur.

Entre le 20 mars et le 22 juillet 1993, la croissance des huîtres a été globalement satisfaisante sur estran et en claire. La longueur moyenne (Figure 21) progresse de 58.25 mm à 76.52 mm en claire et de 58.25 à 71.47 mm sur estran pour les individus triploïdes contre 71.47 et 72.30 mm pour les individus diploïdes. La croissance en taille n'est cependant pas significativement différente entre diploïdes et triploïdes; ni entre les deux sites (Tableau 2).

Poids total.

Le poids total moyen s'avère significativement supérieur (Tableau 2 et Figure 22) pour les individus triploïdes qui passent de 12.41 g à 37.99 g en claire et de 12.41 g à 40.13 g sur estran, contre 30.32 g et 34.40 g pour les individus diploïdes sur les mêmes sites. L'effet site n'est en revanche pas significatif.

Poids de coquille sèche.

Le poids de coquille sèche (Figure 24) représentant près de 60 % du poids total, fait apparaître des différences intéressantes entre les lots. La différence observée entre niveaux de ploïdie est hautement significative, alors que l'effet site ne l'est pas. La précision de l'expérience est indiquée par le coefficient de variation peu élevé (Tableau 2). L'ordre de croissance de plus en plus net au cours du temps, est le suivant :

- Triploïdes sur estran
- Triploïdes en claire
- Diploïdes sur estran
- Diploïdes en claire

Fig.21: *Crassostrea gigas*
Evolution de la longueur

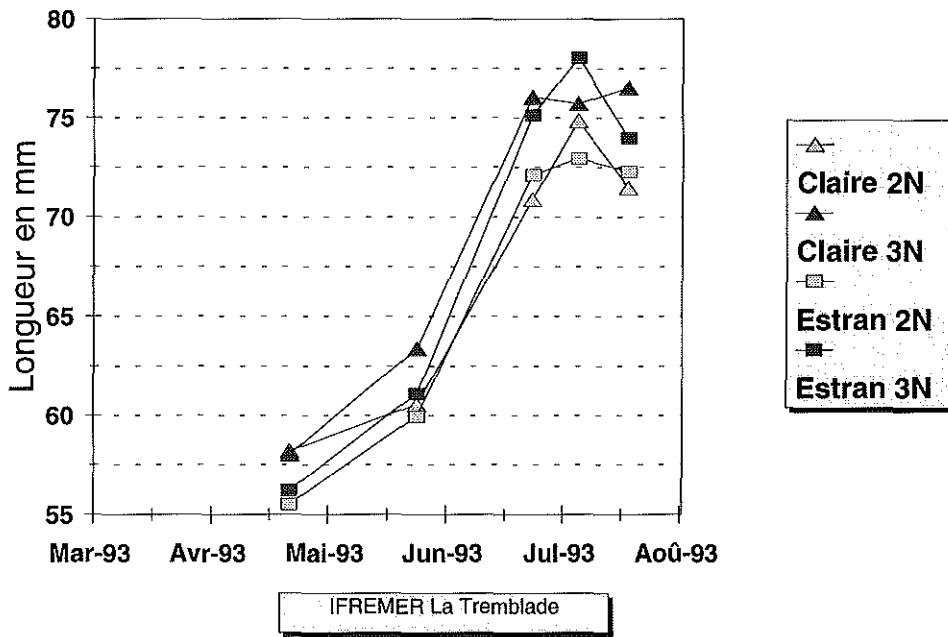
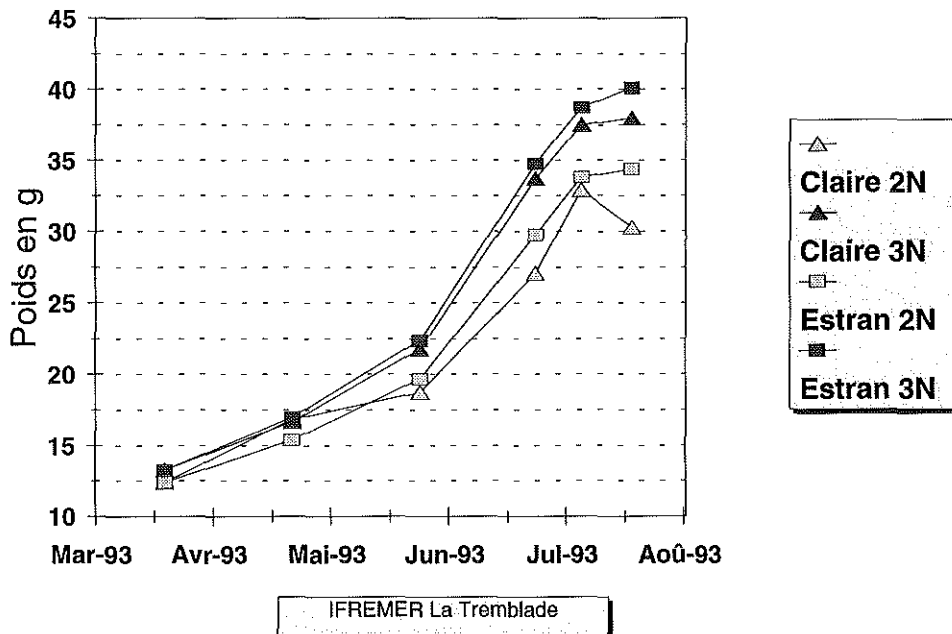


Fig.22: *Crassostrea gigas*
Evolution du poids total



Les interactions d'ordres 2 et 3 ne sont pas significatives ce qui indique que le classement des diploïdes et des triploïdes est toujours le même quelque soit la date et le site considéré.

Poids frais et sec de chair.

L'évolution des poids frais et secs de chair (Figures 23 et 25) nous renseigne un peu mieux sur les différentes phases de l'élevage. Ces deux paramètres présentent une évolution similaire avec des écarts moins marqués pour l'évolution du poids sec. Le poids frais est un paramètre dont la mesure est beaucoup moins fiable que le poids sec compte tenu des différences de séchage d'un individu à l'autre. Ceci est confirmé par le coefficient de variation de 93 % observé pour le poids frais, alors qu'il n'est que de 5.6 % pour le poids sec (Tableau 2). Ces coefficients indiquent que la mesure du poids frais est inutile car trop sujette à des variations incontrôlées qui rendent les mesures inexploitable.

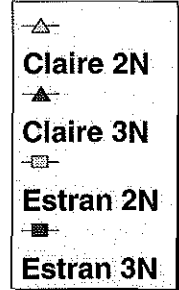
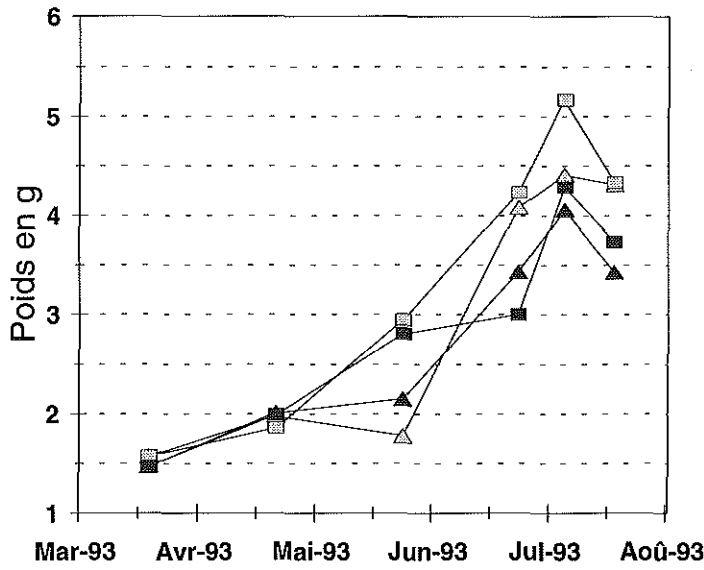
L'évolution du poids sec est très lente en sortie de prégrossissement de la nurserie de Bouin, ce qui traduit une période de stress nutritif du 20 mars au 22 avril. Du 22 avril au 25 mai, le poids moyen de chair sèche double sur le site estran alors qu'il stagne à un niveau bas en claire. Le milieu environnemental est moins riche en claire car moins renouvelé, l'apport d'eau étant lié aux coefficients de marée.

Au 25 juin, les conditions du milieu se sont améliorées en claire après le transfert des huîtres. Les données hydrobiologiques montrent bien que l'apport nutritif est très supérieur en Avallon où le renouvellement d'eau ne nécessite pas de forts coefficients de marées. A cette date tous les lots sont similaires en poids sec. La différence entre diploïdes et triploïdes devient nette entre le 24 juin et le 6 juillet (surtout sur estran), en faveur des diploïdes. Il s'agit probablement de la période de gonadogenèse et de préparation à la ponte, qui a lieu généralement en juillet-août comme l'ont montré de précédentes études à Marennes-Oléron. Cette évolution contrastée des diploïdes en fonction de la date se traduit par des interactions ploïdie-date significatives.

L'évolution de l'indice de condition (Figure 26) exprimant le volume intervalvaire de l'huître, renforce l'hypothèse d'une gonadogenèse supérieure chez les diploïdes par rapport aux triploïdes, par sa valeur élevée pour les diploïdes durant la même période. Ce paramètre dénote également par sa valeur basse enregistrée en claire, la mauvaise condition physiologique des huîtres, avant leur transfert en Avallon.

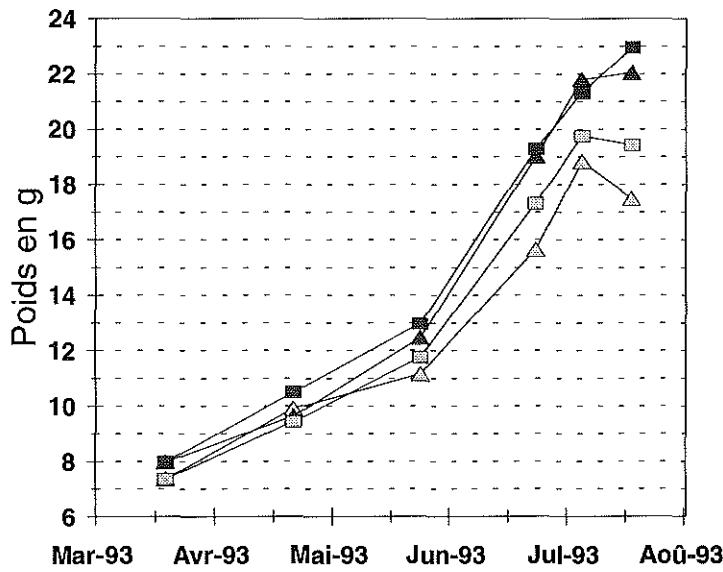
Entre le 6 et le 22 juillet, on observe une légère diminution du poids sec moyen des diploïdes mais les données du 3 août auraient été nécessaires pour confirmer l'hypothèse de la ponte. Le poids sec des triploïdes n'augmente pas dans la même période. En claire, l'indice de condition des diploïdes semble souligner leur niveau de maturation moins avancé que sur estran.

Fig.23: Crassostrea gigas
Evolution du poids frais de chair



IFREMER La Tremblade

Fig.24: Crassostrea gigas
Evolution du poids de coquille



IFREMER La Tremblade

Fig.25: *Crassostrea gigas*
Evolution du poids de chair sèche

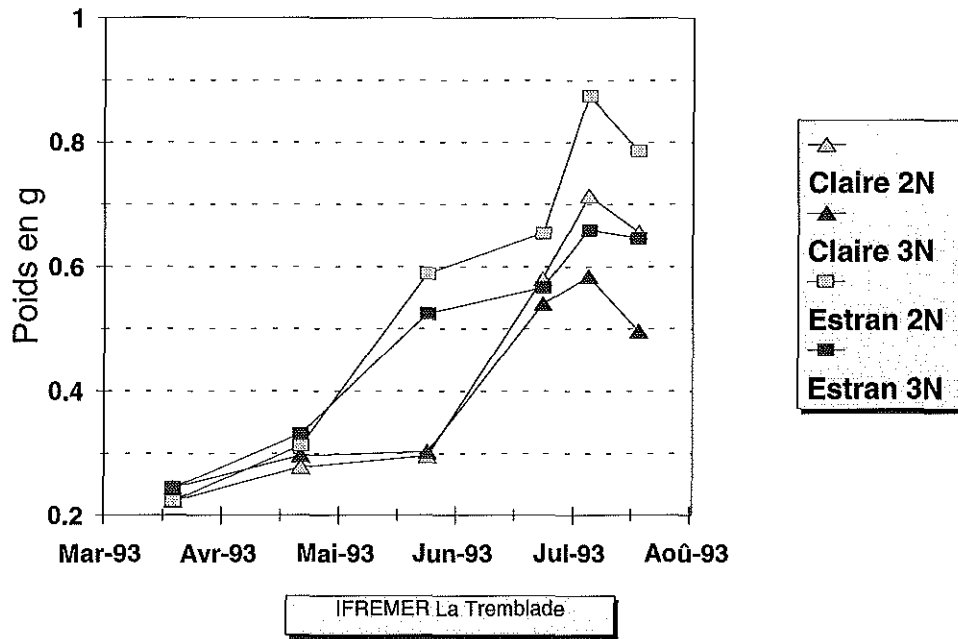
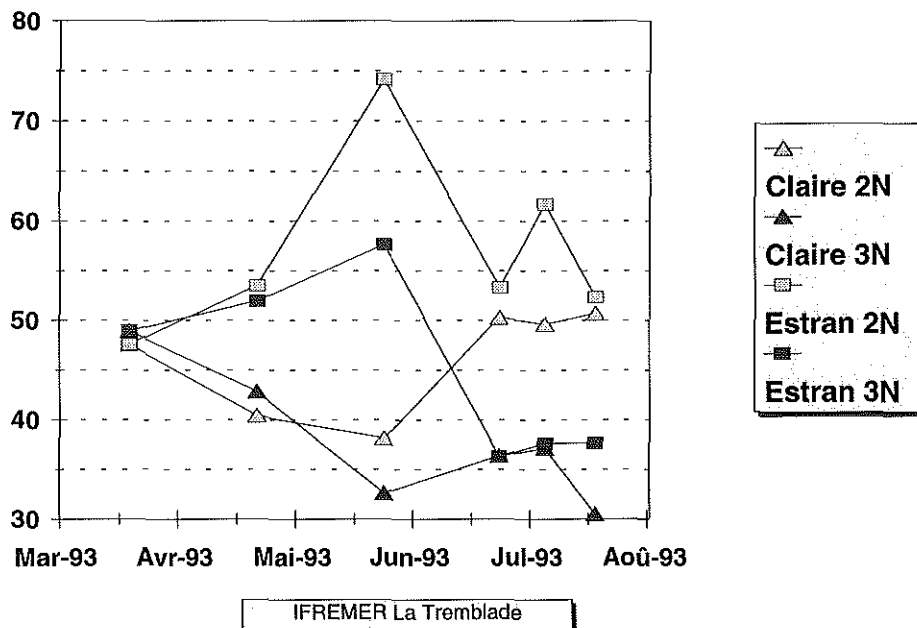


Fig.26: *Crassostrea gigas*
Evolution de l'indice de condition



L'indice de condition et le poids sec moyen des triploïdes de claire chute légèrement durant la même période. L'hypothèse d'une maturation et d'une ponte d'individus triploïdes devra être discutée plus précisément à l'issue de l'étude histologique de la reproduction effectuée par l'Université de Bretagne occidentale.

Pourcentage de protéines.

Les protéines de la chair ont principalement un rôle de structure. Les variations du taux de protéines de la chair ne sont que peu corrélées aux phénomènes métaboliques autre que la croissance (Fouet, 1992).

Leur évolution (Figure 27) suivant celle du poids sec, est représentative de la croissance somatique. La multiplication cellulaire laisse supposer un accroissement de la teneur en protéines de structure de la chair, ce qui demande un apport protéique important provenant du milieu extérieur et aussi un remaniement interne des structures protéiques de la chair (Fouet, 1992)

Les effets ploïdie et site ainsi que les interactions site-date et ploïdie-date sont hautement significatifs, le coefficient de variation est faible. Au début de l'expérience, on observe déjà un taux de protéines supérieur chez les triploïdes. Au point suivant tous les lots présentent un taux similaire en protéines, ceci se traduit par des interactions ploïdie-date significatives. Le taux augmente de 30 à 40 % jusqu'au 6 juillet pour l'ensemble des individus. En claire, les pics de protéines (Figure 27) du mois de juin ont certainement constitué un apport important expliquant cette croissance. Les diploïdes de l'estran et de claire atteignent un maximum de 43 % le 22 juillet, ceci confirmant le pic de protéines observé pendant la phase de gamétogenèse (Deslou-Paoli *et al*, 1982. Deslou-paoli et Héral, 1988).

Les triploïdes s'orientent en revanche de façon opposée sur estran et en claire, avec une chute du taux de protéines des triploïdes sur estran. Le manque de données hydrobiologiques sur estran ne permettent pas de conclure à un appauvrissement du milieu.

Pourcentage de sucres totaux, de glycogène et de lipides.

Les effets site et ploïdie sont hautement significatifs en ce qui concerne les taux de sucres totaux, glycogène et lipides (Tableau 2).

Les évolutions des taux de sucres totaux et glycogène sont identiques (Figures 29 et 30). En effet, la majorité des sucres totaux est représentée sous forme de glycogène, reconnu depuis longtemps comme étant la forme de réserve principale des bivalves (Gabott, 1975).

Le taux de glycogène (Figure 30) chute brutalement entre le 20 mars et le 22 avril. Les huîtres utilisent leurs réserves glucidiques pour s'adapter à un milieu naturel moins riche en apports nutritifs que la nurserie. Le taux de lipides (Figure 28) suit pour sa part l'évolution du poids sec (Figure 25), et se stabilise à 10 % pour tous les lots jusqu'au 22 avril.

Fig.27: Crassostrea gigas
Evolution du taux de protides

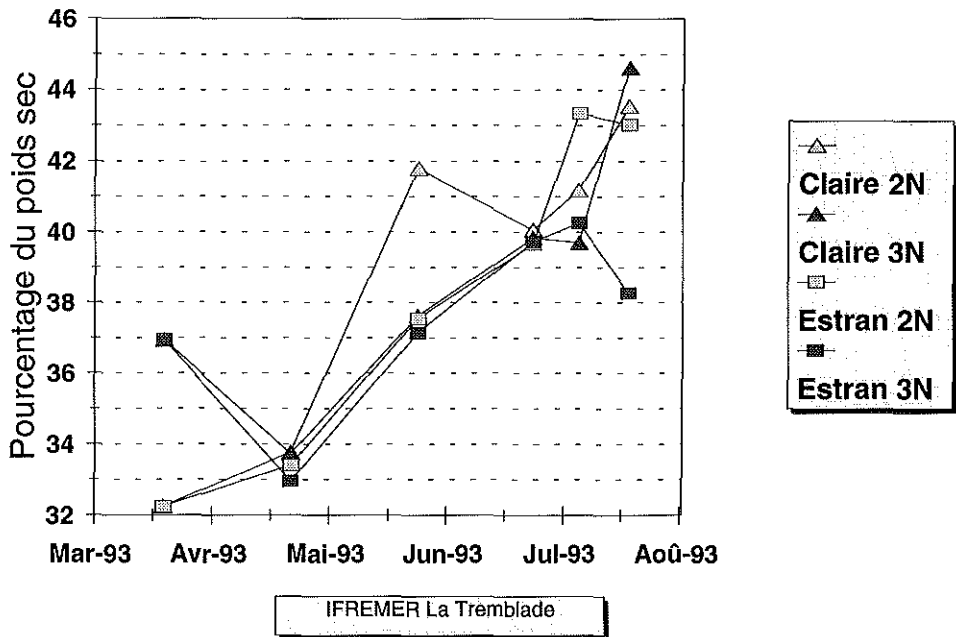
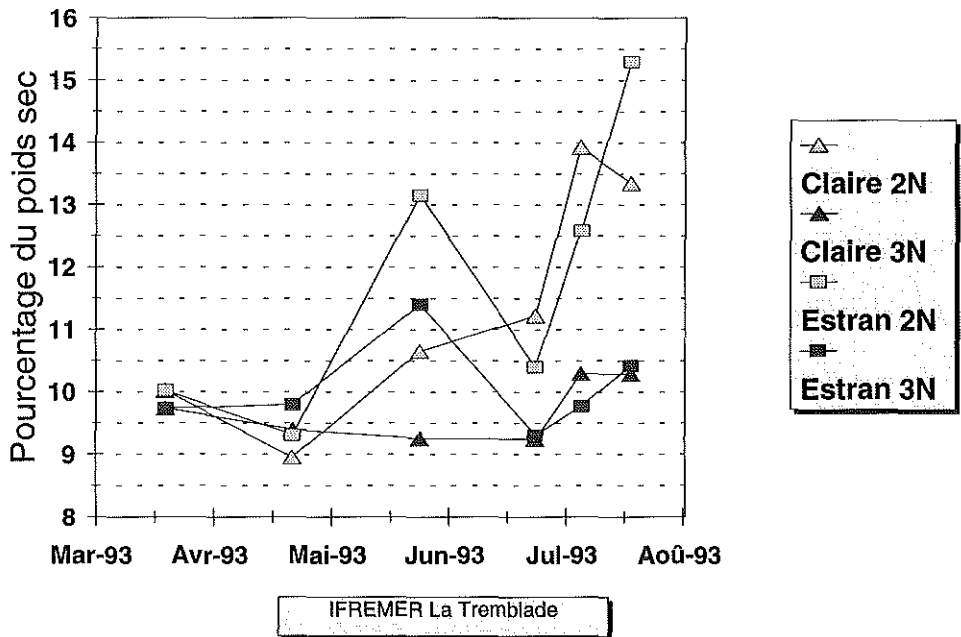
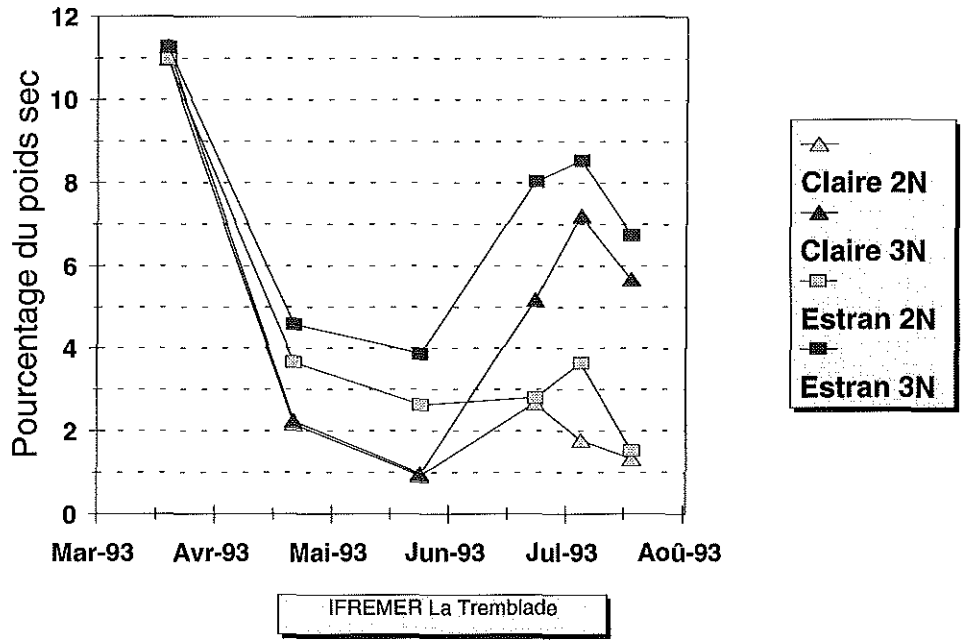


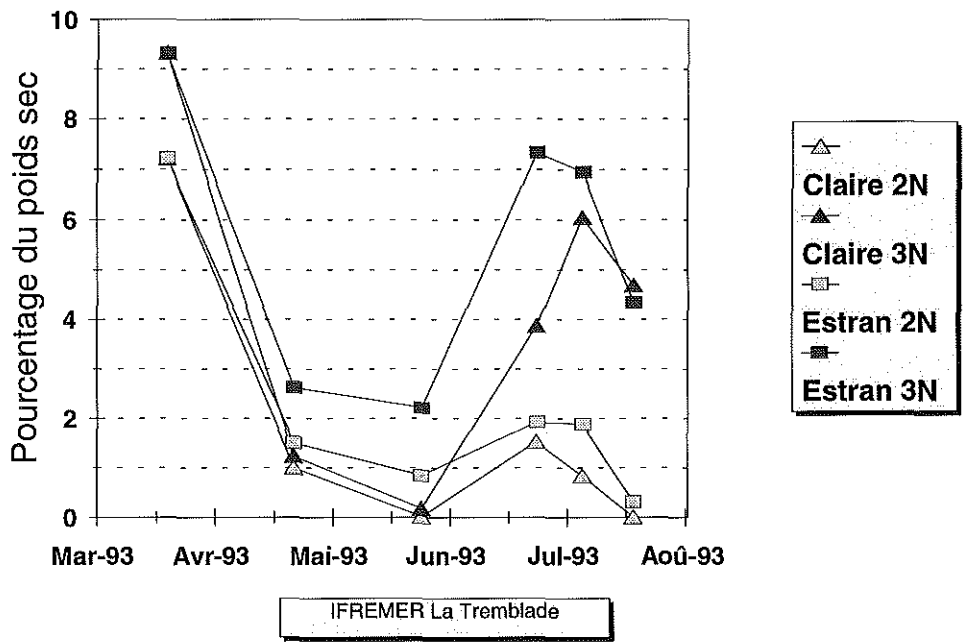
Fig.28: Crassostrea gigas
Evolution du taux de lipides



**Fig.29: *Crassostrea gigas*
Evolution du taux de glucides**



**Fig.30: *Crassostrea gigas*
Evolution du taux de glycogène**



Le taux de glycogène se stabilise ensuite à un niveau très faible entre mai et juin pour les individus de l'estran, alors qu'au 25 mai, les huîtres de claire ont épuisé toutes leurs réserves. Dans le même délai, le taux de lipides augmente pour les diploïdes de l'estran. En claire la tendance est plus irrégulière. Les triploïdes de l'estran accumulent vraisemblablement des réserves lipidiques, leur taux de glycogène demeurant stable.

Du 25 mai au 24 juin, les blooms phytoplanctoniques dans le milieu naturel ont permis aux individus une reprise de réserves beaucoup plus nette pour les triploïdes, les diploïdes ayant utilisé une grande partie de leurs réserves par transformation de glycogène en lipides de réserves des gamètes (Gabott, 1975; Lubet *et al*, 1976).

Du 4 juin au 22 juillet, les diploïdes épuisent à nouveau toutes leurs réserves glucidiques en faveur de la gonadogenèse, leur taux de lipides augmentant parallèlement. Les triploïdes présentent aussi une légère tendance dans ce sens traduisant peut-être une gonadogenèse.

La différence de réserves en glycogène entre les individus diploïdes et triploïdes est donc significative pendant la période habituelle de gonadogenèse. Le taux de 4 % de glycogène chez les triploïdes au 22 juillet est néanmoins très inférieur aux 35 % enregistrés durant la même période en Normandie (Joly et Gouletquer, 1993) où le milieu est beaucoup plus riche en phytoplancton. De plus, dans ce site, les diploïdes n'utilisaient qu'une partie de leurs réserves pour la maturation, se maintenant à un taux de 30 % en glycogène, alors que la totalité des réserves est utilisée à La Tremblade en claire, et une grande partie sur estran.

Au 22 juillet, on n'observe pas de chute nette du taux de lipides, du poids sec, ni de l'indice de condition. La ponte n'est donc vraisemblablement pas encore survenue. Les figures 8 et 9 montrent qu'entre le 24 juin et le 22 juillet, les températures relevées en claire et sur estran ne se maintenaient pas régulièrement au dessus de 20°C, ce qui a dû retarder la maturation et la ponte. Ce retard de maturation est plus net en claire.

3.3.3. Corrélations entre caractères.

La matrice de corrélation donne les coefficients de corrélations linéaires de tous les paramètres deux par deux (Tableau 3).

Les paramètres les plus corrélés entre eux sont le poids total et le poids de coquille (le poids de coquille représente 60 % en moyenne du poids total), le poids sec et le poids frais, les sucres totaux et glycogène, le poids sec et le taux de protéines (traduisant tous deux la croissance somatique), le poids sec et le taux de lipides (la gonade est constituée essentiellement de lipides).

Tableau 3 : MATRICE DE CORRELATION

	Ptot	Psec	Pcoq	Pfra	Long	Prot	Lip	Gly	Stot	%pro	%lip	%gly	%st
Ptot	1.00	0.78	0.99	0.82	0.87	0.76	0.59	0.54	0.61	0.39	0.20	0.40	0.39
Psec		1.00	0.77	0.95	0.66	0.97	0.89	0.41	0.54	0.33	0.46	0.24	0.26
Pcoq			1.00	0.81	0.84	0.75	0.58	0.53	0.60	0.38	0.20	0.40	0.39
Pfra				1.00	0.74	0.93	0.80	0.37	0.48	0.35	0.37	0.20	0.21
Long					1.00	0.66	0.49	0.41	0.46	0.38	0.15	0.29	0.27
Prot						1.00	0.89	0.35	0.47	0.49	0.50	0.18	0.20
Lip							1.00	0.22	0.34	0.34	0.79	0.07	0.08
Gly								1.00	0.96	0.00	-0.05	0.93	0.89
Stot									1.00	-0.02	-0.01	0.88	0.90
%pro										1.00	0.30	-0.06	-0.11
%lip											1.00	-0.14	-0.13
%gly												1.00	0.96
%Stot													1.00

Ptot : Poids total

Prot : taux de protéines

Psec : Poids sec

Lip : taux de lipides

Pcoq : Poids de coquille sèche

Gly : taux de glycogène

Pfra : Poids frais de chair

Stot : taux de sucres totaux

Long : Longueur

% Pro; lip, gly; st : Pourcentages en protéines; lipides, glycogène et sucres totaux.

Ces corrélations permettent d'éliminer certains paramètres de l'analyse discriminante, dont l'information apportée est redondante. Les sucres totaux et le poids frais, respectivement très corrélés avec le glycogène et le poids sec, (dont la mesure est également plus fiable : coefficient de variation faible) sont éliminés de l'analyse discriminante.

3.3.4. Discrimination des sites et de la ploïdie.

Les résultats sont résumés dans les tableaux suivants, et donnent les coefficients standardisés des variables dans l'espace vectoriel discriminant les deux sites et les deux niveau de ploïdie ainsi que l'ordre d'importance de ces variables. Plus un coefficient est important en valeur absolue, plus la variable qui lui est associée est un facteur discriminant.

3.3.4.1. Ploïdie.

Ploïdie	P total	P sec	P coquille	Longueur	% prot	% lip	% gly
Coeff standard	2.45744	-1.20687	-1.01154	-0.41705	-0.25493	-0.15612	0.64316
Ordre prioritaire	1	2	3	5	6	7	4

Les paramètres qui différencient le mieux triploïdes et diploïdes sont le poids total, le poids sec, le poids de coquille et le pourcentage de glycogène. Ceci confirme que la croissance pondérale et l'accumulation de réserves constituent les paramètres principaux distinguant les triploïdes des diploïdes. On constate également que le poids de coquille différencie les lots diploïdes et les lots triploïdes. Le poids sec traduit à la fois des différences de croissance et sans doute également de gonadogenèse.

3.3.4.2. Site.

Site	P total	P sec	P coquille	Longueur	% prot	% lip	% gly
Coeff standard	0.12403	1.40295	-0.41166	-0.81469	-0.25449	-0.13218	0.42802
Ordre prioritaire	7	1	3	2	5	6	4

Poids sec, longueur, poids de coquille et % de glycogène sont les paramètres qui discriminent le mieux les deux sites. Contrairement à l'analyse précédente, le poids total ne vient qu'en septième position. Le poids sec est le reflet de la croissance et de la gamétogenèse. Son importance comme facteur discriminant traduit donc un état de maturation retardé en claire. L'estrane favoriserait ainsi meilleure pousse de même qu'une meilleure accumulation de

réserves sous forme de glycogène. On constate enfin que la longueur discrimine bien les sites, alors que que l'effet site a été jugé non significatif en analyse non paramétrique de Kruskal-Wallis. Ceci peut s'expliquer par le manque de précision du test non paramétrique pour lequel les effets sont testés indépendamment et sans interactions.

Il est intéressant de noter que le poids sec, le poids de coquille et le % de glycogène sont également important pour discriminer les sites et les niveaux de ploïdie.

4.CONCLUSION

Les premiers résultats du contrôle de performances chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* exposés dans ce rapport, confirment les travaux de Downing & Allen (1986), ainsi que les données du premier contrôle de performances de 1991, obtenues en Normandie et à la Tremblade. Cela n'est pas toujours le cas chez les mollusques. En effet, la triploïdisation chez la palourde japonaise *Ruditapes philipinarum* exerce bien un effet inhibiteur de la maturation ovocytaire, mais elle se révèle être sans effet sur la croissance et la constitution biochimique. De plus les palourdes triploïdes se sont toujours montrées plus sensibles à la maladie des anneaux bruns. Sous réserve de confirmation, la production de telles individus ne présenterait donc pas grand avantage (Gérard *et al.*, 1991)

Il en est donc autrement chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les huîtres triploïdes présentent des caractéristiques biométriques supérieures aux diploïdes dès que le processus de gamétogenèse est entamé. Cet écart est particulièrement important pour le poids de coquille. Au 22 juillet, les différences de composition biochimique entre diploïdes et triploïdes étaient déjà significatives : c'est ainsi que les huîtres triploïdes maintiennent leurs réserves en glycogène à un taux de 4 %, alors que les diploïdes ont épuisé la totalité des leurs, à cette date. Fin juillet et selon toute vraisemblance, les huîtres n'avaient cependant pas encore émis leurs produits génitaux dans le milieu.

Il faudra vérifier que la gonadogenèse a eu lieu chez les individus triploïdes (résultats donnés ultérieurement par l'Université de Bretagne Occidentale) et dans quelle mesure cela aura-t'il des conséquences sur l'état de leurs réserves en glycogène et leur croissance, après la période habituelle de ponte.

L'élevage sur estran s'est avéré plus profitable que l'élevage en claire. Cette supériorité n'est pas statistiquement significative pour le poids total, le poids de coquille et la longueur. En revanche, tous les paramètres biochimiques sont très significativement supérieurs sur estran, ce qui se traduit par la maturation plus avancée des diploïdes, et la meilleure accumulation de réserves chez les triploïdes. Les résultats hydrobiologiques ne permettent pas d'attribuer ce retard de maturations et d'accumulation de réserves en claire, à un appauvrissement du milieu. En revanche, il est fort probable que le transfert en Avallon, et la mauvaise qualité de la claire de Ronce les Bains ont nuit fortement à l'élevage sur les premières semaines. Les prochains mois, après l'atténuation de cet effet de stress, il sera possible d'apporter des réponses satisfaisantes à cette question.

Les conclusions définitives sur la croissance et le comportement des huîtres dans ces deux milieux d'élevage seront données théoriquement en 1994. Il reste également pour être complet, à déterminer si ces individus triploïdes présentent des caractéristiques organoleptiques

5.BIBLIOGRAPHIE

Allen S.K. & Downing S.L., 1987. Performance of triploid pacific oyster, *Crassostrea gigas* : gametogenesis. *Can.J.Fish. Aquat. Sci.*, 47 : 1213-1222.

Aminot A., 1983. Mesure des matières en suspension. Analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, chap XIV : 169-176.

Berthome J.P., Deslous-Paoli J.M. & Fernandez Castro N., 1979. Comparaison de trois index de qualité de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Cons. int. Explor. Mer*, CM. 1979/K : 18, 9 p.

Bligh E.G., Dyer W.F., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. biochem. physiol.*, 37 : 911-917.

Bodoy A., Prou J. & Berthome J.P., 1986. Etude comparative de différents indices de condition chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Haliotis*, 15 : 173-182.

Deslou-Paoli J.M., & Héral M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Living. Resour.*, 1, 239-249.

Deslou-Paoli J.M., Zanette Y., Héral M., Masse H. & Garnier J., 1982. Amélioration de la forme et de la qualité de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans les claires de Marennes Oléron. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 45(3) : 181-194.

Downing S.L. & 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.

Dankers N. & Laane R., 1983. A comparison of wet oxidation and loss of ignition of organic material in sestonic matter. *Environ. Tech. Let.*, 4 : 283-290.

Dubois M., Gilles K.A., Rebecs P.A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28 : 350-356.

Dufy C. & Diter A., 1990. Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. I. Chemical induction and larval performances of triploids. *Aquat. Living Res.*, 3 : 55-60.

Fouet I., 1987. Fluctuation de la croissance et de la composition biochimique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg) élevée a différents niveaux d'émersion dans le bassin de Marennes-Oléron. Licence de Biologie des Organismes, Université de Bordeaux I., 27 pages.

Gabbot P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalves molluscs : a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In : Proceeding of ninth Europ. *Mar. Biol. Symp.* (ed. H. Barnes) : 191-211. Aberdeen University Press, Aberdeen.

Gendreau S. & Grizel H., 1990. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Aquaculture*, 90 : 229-238.

Gérard A., Peignon J.M., Ledu C., Phélipot P., Noiret C., Bodoy A., Heurtebise S. & Garnier J., 1992. Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation (3ème partie). Rapport interne IFREMER, RIDRV 92-11 - RA La Tremblade.

Gérard A., Naciri Y., Noiret C., Ledu C., Peignon J.M. & phelipot P., 1993a. Induced triploidy in the European clam *Ruditapes decussatus* (L.) and performance of triploid larvae. Accepté dans *Aquaculture*, Mai 1993.

Gérard A., Naciri Y., Peignon J.M., Ledu C. & phelipot P., 1993b. Optimization of triploid induction by the use of 6 DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Accepté dans *Aquaculture & Fisheries Management*, mars 1993.

Gérard A., Naciri Y., Peignon J.M., Ledu C., Phélipot P., Bodoy A., Heurtebise S., Garnier J., Baud J.P., Nourry M., Haure J., Martin A.G., Claude S., Barret J., Devauchelle N., Joly J.P., Gouletquer P., Coatanea D., Oheix J., Zanette Y. & Blachier P., 1993c. Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation (4ème partie). Rapport interne IFREMER, RIDRV 93-22 - RA La Tremblade.

Grelon M., 1978. Saintonge, pays des huîtres vertes. Ed. Rerpella, La Rochelle, 364p.

Héral M., 1986. L'ostéiculture française traditionnelle. *Aquaculture*, Barnabé G., coord., Vol. 1 Part 2, Chap 3 : 345-390.

Héral M. & Deslou-Paoli J.M., 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître creuse : *Crassostrea gigas* estimée par mesures microcalorimétriques et dosages biochimiques. *Oceanologica Acta*, Vol.6, n°2 : 193-199.

Héral M., Razet D., Maestrini S.Y., Garnier J. 1980. Composition de la matière organique particulière dans les eaux de Marennes-Oléron, apports énergétiques pour la nutrition de l'huître. CIEM : 44.

Jamoneau C., 1993. Evaluation et caractérisation de la matière en suspension dans la colonne d'eau, après filtration différentielle, au cours d'un cycle mortes eaux-Vives eaux dans le bassin de Marennes Oléron. Mémoire de l'IUT Biologie appliquée. La Rochelle.

Joly J.P. & Gouletquer P., 1993. Contrôle de performances sur les diploïdes et triploïdes d'huîtres creuses : *Crassostrea gigas* à Oustreham. REGEMO. IFREMER Port en Bessin.

Lawrence D.R. & Scott G.I., 1982. The determination and use of condition index of oysters. *Estuaries*, 5(1) : 23-27.

Lubet P.E., Herlin P., Mathieu M., Collin F., 1976. Tissu de réserves et cycle sexuel chez les lamellibranches. *Haliotis*, 7 : 59-62.

Lucas A. & Beninger P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44 : 187-200.

Lowry O.M., Roseborough N.I., Farrand A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, 193 : 263-275.

Mc Allister C.D., Parson T.R., Strickland J.D.H., 1961. Further measurements of primary production using large volume plastic sphere. *Limnol. Oceanogr.* 6(2) : 237-258.

Mann R., 1978. A comparison of morphometric, biochemical and physiological indexes of condition in marine bivalves molluscs. In : J.H. Tharp & W.Gibbows, Ed., Energy and environmental stress in aquatic systems. DOE Symp. Ser. 48 : 484-497.

Marsh J.B. & Weinstein D.B., 1966. Simple charring method for determination of lipid. *J.Lip.Res.*, 7 : 574-576.

Nedhif M., 1984. Elevage de *Ruditapes philipinarum* dans le bassin de Marennes Oléron, relations trophiques et bilan énergétique. Thèse de spécialisation INAT. Tunis.

Neveux J., 1983. Dosage de la chlorophylle a et des phéopigments par fluorimétrie. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Chap XVI : 193-201.

Schwartz D., 1963. Méthode statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Médecine-Sciences. Flammarion. Paris.

Tammes P.M.L. & Dral A.D.G., 1956. Observations on the straining of suspensions by mussels. *Arch.Neerl. Zool.*, 11 : 87-112.

Zanette Y., 1980. Contribution à l'étude de la biologie des claires du bassin de Marennes Oléron. Section Régional., ISTPM La Tremblade. Héral M. Resp. Scient.

6. ANNEXES

ANNEXE 1 :

Préparation des échantillons d'analyse d'image par la coloration de Feulgen-Rosenberg :

Composition du Bohm-Sprenger :

Méthanol à 80%
Formaldéhyde à 15%
Acide acétique à 5%

Matériel et méthode :

HCL 5N pour hydrolyse : 431 ml d'HCl concentré (37%) + 569 ml d'eau désionisée.

Réactif de schiff : MERCK, réactif pour électrophorèse et microscopie (référence : 9033).

Bain sulfureux : -0.5 g de métabisulfite de Na/k
 -1 ml d'HCL 5N
 - Eau distillée pour 1 litre

Méthode :

1. Hydratation à l'eau distillée : 10 mn
2. Hydrolyse acide : 1 heure
3. rinçage à l'eau distillée : 4 fois 1 mn
4. Réactif de Schiff : 1 h 30 mn. Sortir le réactif du réfrigérateur 1 h avant utilisation. Couvrir avec du parafilm pour éviter les dégagements sulfureux et mettre au noir.
5. Bain sulfureux : 4 fois 1 mn
6. Eau distillée : 10 mn
7. Vider et ajouter à nouveau de l'eau distillée 3 mn.
8. Ethanol 100 : 2 fois 3 mn
9. Xylène : 2 fois 3 mn
10. Monter à l'eukitt

Remarques :

•Les lames témoins et les échantillons doivent être colorés en même temps et dans le même bain.

•Le BOHM-SPRENGER, le réactif de Schiff, sont récupérés après usage et peuvent être réutilisés plusieurs fois.

- Il en est de même pour l'acide, les bains d'éthanol et de xylène.
- Avant de passer les lames dans l'éthanol, on peut les rincer avec ce même alcool à l'aide d'une pissette. Ceci permet d'éviter une dilution progressive du bain d'éthanol (réutilisé plusieurs fois).
- Avant passage dans le xylène, sécher les lames à l'air, pour éviter des bulles après montage des lames.

ANNEXE 2 :

Dosage des protéines particulaire selon la méthode de Lowry :

Principe :

Le dosage effectué est basé sur la méthode de Lowry (Annexe 6) adaptée pour la fraction particulaire contenue dans l'eau de mer.

Réactifs :

Solution A : Carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) à 2 % dans une solution de soude 0.1 N.

Solution B1 : Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$) à 0.5 % dans l'eau distillée.

Solution B2 : Tartrate de sodium ou de potassium à 1 % dans l'eau distillée.

Solution C : 50 ml de solution A + 2 ml de solution B1 + 2 ml de solution B2.

La solution C doit être préparée au moment de l'emploi, les solutions A, B1, B2, se conservent environ deux mois à 4°C.

Solution D : (Réactif de Folin Ciocalteu). Ce réactif du commerce doit être dilué deux fois avant emploi, il se conserve plusieurs mois à l'obscurité et à 4°C.

Mode opératoire :

- Broyer le filtre à l'aide d'une canne de verre.
- Ajouter 5 ml de solution C et laisser reposer 10 mn à température ambiante.
- On ajoute dans le tube contenant le filtre, 1 ml d'eau distillée.
- Ajouter 0.5 ml de solution D, homogénéiser aussitôt.
- Laisser la coloration se développer au maximum 1 h 30 à température ambiante
- Lecture de la densité optique à 700 nm.

Courbe étalon :

On établit une courbe étalon dans la soude 1N avec de l'albumine de boeuf, de 0 à 500µg/ml. Les résultats sont exprimés en mg équivalent albumine de boeuf.

Remarque :

Il est important de faire des essais à blanc sur des filtres neufs, pouvant présenter un apport initial en protéines.

ANNEXE 3 :

Dosage des glucides particuliers :

Principe :

En présence d'un acide minéral fort, les pentoses donnent du furfural et les hexoses donnent du 5 hydroxyméthyl furfural. Le furfural et ses dérivés se combinent avec le phénol pour donner un complexe coloré.

Réactifs :

- Solution de phénol à 5 %.
- Acide sulfurique concentré très purifié.

Mode opératoire :

- Introduire dans un tube à centrifuge en verre : 1 ml d'eau distillée, le filtre, 1 ml de phénol à 5 %.
- Broyer le filtre à l'aide d'une spatule.
- Laisser reposer 40 mn au moins à température ambiante.
- Ajouter rapidement à l'aide d'une pipette automatique 5 ml d'acide sulfurique concentré.
- Homogénéiser aussitôt.
- Laisser reposer 10 mn à la température de la salle.
- Mesurer la densité optique du surnageant à 490 nm, après centrifugation à 3000 tours/mn pendant 10 mn.

Courbe étalon :

On utilise une solution de glucose de 0 à 100 µg/l. Les résultats sont exprimés en µg équivalent en glucose.

ANNEXE 4 :

Dosage des lipides particuliers :

Principe :

- L'hydrolyse acide à chaud des acides gras révèle une coloration brune dont le maximum d'absorption se situe aux environs de 360 nm.

Extraction :

- Introduire dans le tube contenant le filtre, après décongélation, 2 ml de chloroforme.
- Broyer finement avec une spatule le filtre et laisser extraire au moins une heure au réfrigérateur pour éviter toute évaporation du solvant.
- Pipeter la solution ainsi formée à l'aide d'une pipette automatique dans un autre tube à hémolyse.
- Réintroduire 1 ml de chloroforme sur le broyat du premier tube afin de rincer ce dernier.
- Pipeter de nouveau le reliquat de chloroforme que l'on a ajouté à la première solution.
- Evaporer le solvant à 40°C dans une étuve pendant au moins 24 heures (jusqu'à dissolution complète du solvant)
- Rajouter 2 ml d'acide sulfurique concentré sur les lipides ainsi retenus et porter à 200°C dans un bloc chauffant, pendant 20 mn.
- Après refroidissement, rajouter avec précautions 3 ml d'eau distillée de manière à obtenir un mélange homogène, la réaction est très exothermique.
- Après refroidissement, lire la densité optique à 360 nm.

Courbe étalon :

On utilise une solution standard évaporée d'acide tripalmitique à des concentrations comprises entre 0 et 200 µg/ml.

ANNEXE 5

Dosage de la chlorophylle et des phéopigments par fluorimétrie :

Etalonnage :

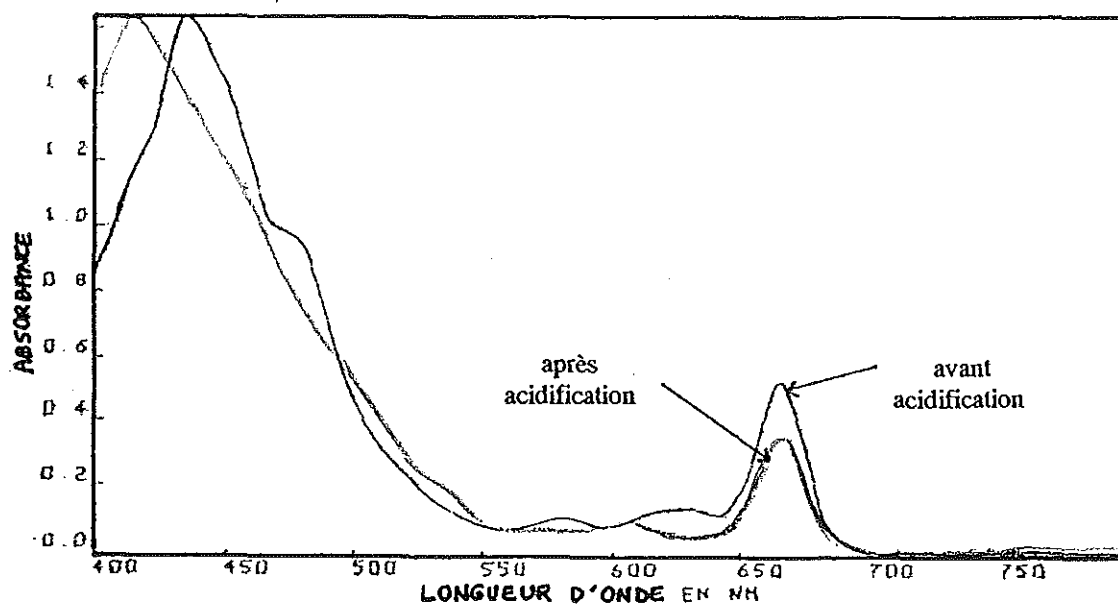
On filtre sur filtre Whatman GF/C (\varnothing 47 mm) une quantité d'eau de mer préfiltrée à 200 μ m afin d'obtenir une D.O. de l'ordre de 0,300 à 0,400 après broyage dans 40 cc d'acétone à 90 %. Par spectrophotométrie d'absorption moléculaire et en appliquant la loi de Lorenzen, on va déterminer la concentration en chlorophylle a et en phéopigment.

$$[\text{Chloa}] = \frac{26,7 (\text{DO665a} - \text{DO750a}) - (\text{DO665b} - \text{DO750b})}{L} \quad (\text{en } \mu\text{g/cc d'acétone})$$

$$[\text{Phéo a}] = \frac{26,7 (1,7 (\text{DO665b} - \text{DO750b})) - (\text{DO665a} - \text{DO750a})}{L} \quad (\text{en } \mu\text{g/cc d'acétone})$$

trajet optique : $L = 5$ cm

DO665a, DO665b : absorbance à 665 nm avant et après acidification par 100 μ l d'HCl à 1 N.
DO750a, DO750b : absorbance à 750 nm avant et après acidification.



Spectres d'absorption d'une solution acétonique de chlorophylle a et de phéopigments enregistrés à partir d'un spectrophotomètre Secoman S 1 000 P.C.

La solution acétonique de chlorophylle a obtenue précédemment est aussi mesurée par fluorimétrie après dilution, de telle sorte que l'on obtienne une fluorescence avant acidification de l'ordre de 90.

Ainsi, on a 2 valeurs :

Fa : fluorescence avant acidification

Fb : fluorescence après acidification.

On acidifie avec 50 μ l d'HCl à 1 N.

On sait que :

$$[(\text{Chloro a})] = \frac{F.r}{r-1} \cdot (F_a - F_b) \cdot \frac{1}{x} \quad \text{en } \mu\text{g/cc d'acétone}$$

$$[\text{Phéo a}] = \frac{F.r}{r-1} (r.F_b - F_a) \frac{1}{x} \quad \text{en } \mu\text{g/cc d'acétone.}$$

avec F = constante liée au photomultiplicateur.

r = constante du dosage liée à la lampe (r est de l'ordre de Fa/Fb).

x = facteur de dilution.

Détermination de F et r

$$\frac{[\text{Chlo a}]}{[\text{Phéo a}]} = \frac{\frac{[\text{Chlo a}]}{X}}{\frac{[\text{Phéo a}]}{X}} = Q$$

Il faut donc résoudre une équation à 2 inconnues :

$$(F.r/r-1) (F_a - F_b) = Q [(F.r/r-1) (r.F_b - F_a)]$$

$$F_a - F_b = Q (rF_b - F_a)$$

$$Q.r.F_b = Q.F_a + F_a - F_b$$

d'où

$$r = \frac{F_a(Q + 1) - F_b}{Q.F_b} \quad \text{avec } Q = 99,54$$

On remplace r par sa valeur dans l'équation [Chlo a] et on trouve F

$$F = \frac{r - 1}{r(F_a - F_b)} \cdot \frac{[\text{Chlo a}]}{X}$$

Ici, on trouve :

$$r = 1,95$$

$$F = 2,55 \cdot 10^{-4} \text{ ou } 0,000255$$

Détermination de [Chlo a] et [Phéo a] :

$$[\text{Chlo a}] = \frac{F.r}{r-1} \cdot (F_a - F_b) \cdot \frac{V_a}{V_f} \cdot 1000 \text{ en } \mu\text{g/litre d'eau de mer}$$

$$[\text{Phéo a}] = \frac{F.r}{r-1} \cdot (r.F_b - F_a) \cdot \frac{V_a}{V_f} \cdot 1000 \text{ en } \mu\text{g/litre d'eau de mer}$$

où V_a = volume acétone en ml

V_f = volume filtré en ml

ANNEXE 6 :

Dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Lowry *et al* (1951) :

Principe :

La méthode de Lowry permet de doser les liaisons amides des protéines et les acides aminés : tyrosine et tryptophane. Cette méthode se caractérise par la formation d'un complexe cuivrique des protéines qui réduit le phosphomolybdate en milieu basique (apparition d'une coloration bleu violacée).

Extraction :

- Broyage des huîtres qui permet d'obtenir une poudre plus fine par rapport à un broyage après lyophilisation.
- Congélation puis lyophilisation de la chair broyée.
- Pesée d'environ 10 mg de chair sèche dans un tube cristal de 10 ml.
- Ajouter 10 ml de soude 1N, boucher et agiter les tubes.
- Mettre 30 mn à 60°C, ou une nuit à température ambiante.

Courbe étalon :

On prépare une solution étalon dans les mêmes conditions que les échantillons, avec de l'albumine de boeuf à 500 µg/ml. La gamme s'échelonne de 0 à 500 par dilutions successives avec la soude en prélevant par la suite 0.5 ml de solution.

Solutions de dosages :

- Solution A : Na_2CO_3 à 2 % dans NaOH 0.1N.
- Solution B : CuSO_4 à 0.5 % dans H_2O distillée.
- Solution C : Tartrate de sodium et potassium à 1% dans H_2O distillée.
- Solution D : 100 ml de solution A + 2 ml de solution B + 2 ml de solution C.
- Solution E : Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 2 fois (0.5N).

Mode opératoire :

- Mettre 0.5 ml de d'échantillon ou d'étalon dilué, dans un tube cristal de 10 ml.
- Neutraliser avec 0.5 ml de H_2SO_4 1N.
- Ajouter 5 ml de la solution D.
- Après 10 mn à température ambiante, ajouter 0.5 ml de la solution E et homogénéiser aussitôt à l'aide d'un vortex.
- Attendre 1h30 que la coloration soit maximale.
- Mesurer la densité optique à 750 nm.

ANNEXE 7 :

Dosage colorimétrique des lipides par la méthode de Marsh & Weinstein (1966) :

Principe :

Cette méthode repose sur l'oxydation de la matière organique en milieu acide, et n'est pas spécifique des lipides, mais de l'ensemble du matériel liposoluble. Il est donc indispensable d'obtenir un extrait lipidique sans contaminants. Bligh et Dyer (1959) ont développé une méthode d'extraction et de purification qui utilise un mélange ternaire monophasique (chloroforme/méthanol absolu/eau) suivi d'un mélange ternaire biphasique par addition d'eau.

Extraction et purification (Bligh & Dyer, 1959) :

- Broyer les huîtres placées dans leurs tubes.
- Congeler puis lyophiliser la chair.
- Peser environ 8 mg de chair sèche dans un tube en verre de 10 ml.
- Ajouter 1 ml de chloroforme et 2 ml de méthanol absolu.
- Homogénéiser à l'aide d'un vortex.
- Centrifuger 10 mn à 2800 tr/mn.
- Récupérer le surnageant dans un tube en pyrex de 10 ml (résistant à haute température).
- Répéter l'opération une seconde fois.
- Séparer les deux phases par adjonction d'eau distillée (4 ml).
- Centrifuger 10 mn à 2800 tr/mn.
- Eliminer la phase supérieure par aspiration à l'aide d'une trompe à vide en prenant garde de ne pas aspirer la mousse blanche à l'interface des deux phases (phospholipides).
- Evaporer le chloroforme à 40°C à l'étuve (environ 48 heures).

Courbe étalon :

- Etablir une courbe étalon avec du tripalmitate, de 0 à 1500 µg/ml, dans les mêmes conditions que les échantillons.
- Evaporer le chloroforme.
- Les résultats sont exprimés en mg équivalent tripalmitate.

Solutions de dosage :

- H₂SO₄ concentré.
- H₂O distillée.

Mode opératoire :

Ajouter 10 ml de H₂SO₄ concentré sur le culot après séchage.

- Développer la coloration 20 mn au bloc chauffant à 200°C.
- Refroidir rapidement dans un bain de glace.
- Diluer 2 ml de la solution obtenue dans un tube à hémolyse en verre avec 3 ml d'eau distillée.
- Homogénéiser à l'aide d'un vortex.
- Lire la densité optique à 360 nm.

Remarques :

- Les pesées de chair sèche s'effectuent en même temps pour les tubes de protéines et de lipides en retirant la balance entre les deux pesées des tubes posés sur le même plateau.
- La manipulation de l'acide concentré au moment du retrait des tubes du bloc chauffant nécessite l'emploi impératif de gants et lunettes de protection. L'ajout d'acide s'effectue le long de la paroi des tubes.

ANNEXE 8 :

Dosage colorimétrique des sucres par la méthode de Dubois et al, 1956 :

Principe :

Le dosage de Dubois s'appuie sur la formation de furfural ou d'hydroxyméthylfurfural en présence d'un acide minéral fort (H_2SO_4). Ces composés réagissent avec le phénol pour donner un complexe coloré (coloration jaune orangée).

Extraction :

- Récupération des culots "délipidés" (conservés à l'étuve) par la méthode de Bligh et Dyer (cf annexe 7).
- Effectuer l'extraction du culot de chair délipidé avec 3 ml d'acide trichloroacétique à 15% pendant 1 h à 4°C.
- Homogénéisation à l'aide d'une spatule et d'un vortex.
- Centrifuger 10 mn à 2800 tr/mn.
- Pipeter 0.5 ml du surnageant dans un tube en polypropylène pour le dosage des sucres totaux.
- Pipeter 0.5 ml du surnageant dans un tube de polypropylène, ajouter 4 ml d'éthanol absolu pour précipiter le glycogène, centrifuger 10 mn à 2800 tr/mn, jeter le surnageant, ajouter 0.5 ml d'eau distillée bouillante.

Courbe étalon :

- Préparation d'une solution étalon de glucose de 0 à 500 $\mu\text{g/ml}$ dont on prélève 0.5 ml.
- Les résultats sont exprimés en mg équivalent glucose.

Solutions de dosage :

- Phénol à 5 %
- H_2SO_4 concentré.

Mode opératoire :

- Ajouter 1 ml de phénol aux 0.5 ml des solutions étalons et des solutions à doser.
- Laisser reposer 40 mn à température ambiante.
- Ajouter 5 ml d' H_2SO_4 concentré.
- Laisser reposer 10 mn à température ambiante.

- Lire la densité optique à 490 nm.

La teneur en sucres libres (sucres réducteurs non glycogène) est la différence entre les sucres totaux et le glycogène.