

Rapport Interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER

## OBTENTION DE SOUCHES CONCHYLICOLES PERFORMANTES PAR POLYPLOIDISATION (3ème partie)

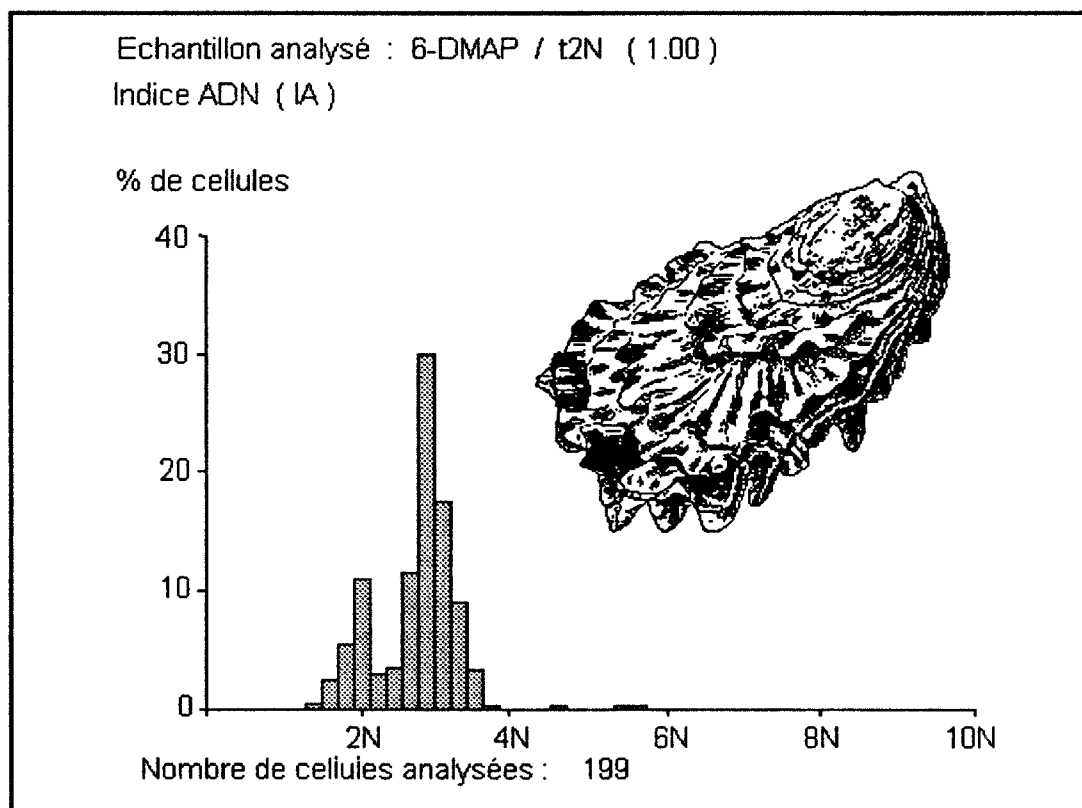
GERARD A.\*, PEIGNON J.M.\*, LEDU C.\*, PHELIPOT P.\*, NOIRET C.\*

BODOY A.\*\*, HEURTEBISE S.\*\*, GARNIER J.\*\*

\* Unité de Recherche en Génétique et Eclosion

\*\* Unité de Recherche Régionale en Aquaculture

La Tremblade



## PREAMBULE

Ce document présente le troisième volet du programme "Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation" réalisé dans le cadre du Contrat Etat-Région Poitou-charentes.

Il fait suite aux rapports intermédiaires présentant les résultats de 1989 et 1990 :

"Maîtrise des techniques de polyploïdisation, application aux espèces d'intérêt commercial en France (huîtres creuses et palourdes)". Rapport interne IFREMER - RIDRV - 90-29 - RA/LA TREMBLADE.

"Obtention de souches conchylicoles performantes par polyloïdisation (2ème partie)". Rapport interne IFREMER - RIDRV - 91-08 - RA/LA TREMBLADE

Ce bilan provisoire présente le travail de plusieurs laboratoires d'IFREMER regroupés au sein du "Réseau Génétique Mollusques":

L'Unité de Recherche de Génétique et Eclosion de La Tremblade pour la mise au point des techniques et des protocoles, la production des souches, le contrôle de la ploïdie par imagerie numérique, et le traitement des données.

L'Unité de Recherche Régionale en Aquaculture de La Tremblade pour le contrôle des performances biologiques et toutes les analyses biochimiques,

Les laboratoires RA d'Ouistreham, de Brest, de La Trinité/mer et de Palavas pour le contrôle des performances biologiques dans le milieu naturel,

L'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles pour les études physiologiques.

et la participation de structures externes :

Le Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole de l'île d'Oléron pour le suivi biométrique des palourdes triploïdes,

Le laboratoire de Zoologie de L'Université de Bretagne Occidentale pour l'histologie de la reproduction.

## SOMMAIRE

PREAMBULE .....	1
SOMMAIRE .....	2
1. INTRODUCTION .....	4
2. RAPPEL DES PROPOSITIONS DE TRAVAIL et des principaux acquis .....	4
3. RAPPEL DU PRINCIPE ET DES TECHNIQUES DE POLYPLOIDISATION .....	5
3.1. Induction de la triploïdie .....	5
3.2. Induction de la tétraploïdie .....	5
4. PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ANNEE 1991 .....	7
4.1. Contrôle de la ploïdie par imagerie numérique .....	7
4.1.1. L'analyse caryologique .....	7
4.1.2. Principe de l'analyse d'images .....	7
4.1.3. Préparation des échantillons .....	9
4.1.4. Traitement des données .....	9
4.2. Induction de la triploïdie chez la palourde indigène <i>Ruditapes decussatus</i> .....	12
4.2.1. Cinétique du développement embryonnaire .....	12
4.2.2. Essai de triploïdisation .....	12
4.2.3. Elevages larvaires et post-larvaires .....	16
4.2.4. Bilan provisoire et perspectives .....	16
4.3. Induction de la triploïdie chez l'huître plate <i>Ostrea edulis</i> .....	17
4.3.1. Maturation des géniteurs .....	17
4.3.2. Bilan des inductions par la technique <i>in vitro</i> .....	17
4.3.3. Bilan des inductions par la technique <i>in vivo</i> .....	19
4.3.4. Contrôle des performances dans le milieu naturel .....	21
4.4. Mise au point d'une nouvelle méthode d'induction de la polyploïdie .....	22
4.4.1. Principe de la méthode .....	22
4.4.2. Résultats des premiers essais .....	22
4.4.3. Conclusions et perspectives .....	25

4.5. Mise en place du contrôle des performances biologiques des populations diploïde et triploïde de <i>Ruditapes philippinarum</i> .....	26
4.6. Début du contrôle des performances biologiques des populations diploïdes et triploïdes de <i>Crassostrea gigas</i> .....	28
4.6.1. Elevage en claire: La Tremblade.....	28
Choix du site .....	28
Evolution des paramètres biométriques .....	28
Evolution des paramètres biochimiques.....	33
4.6.2. Elevage sur l'estran: Ouistreham .....	33
4.6.3. Etude physiologique.....	33
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	34
BIBLIOGRAPHIE .....	35

## 1. INTRODUCTION

L'effort de reproduction chez les mollusques bivalves est prioritaire sur la croissance somatique. Dès le printemps, il monopolise le métabolisme énergétique pour la gamétogenèse induisant ainsi un retard de croissance et une modification des qualités organoleptiques de la chair (Héral et Deslous-Paoli, 1983).

La réduction de la gonadogenèse par induction de la triploïdie permet de réorienter ce flux énergétique vers la croissance somatique. La triploïdisation est une des premières techniques de cytogénétique à déboucher sur des applications aquacoles. Chez les mollusques, les recherches ont surtout été menées aux Etats Unis sur plusieurs espèces : *Crassostrea virginica* (Stanley *et al.*, 1981), *C. gigas* (Downing et Allen (1990), Allen et Downing(1990)), *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984), *Haliotis discus* (Arai *et al.*, 1986). Ces expériences ont mis en évidence, notamment chez *C. gigas*, une stérilité partielle des individus triploïdes accompagnée d'une amélioration des performances de croissance et du maintien d'une teneur élevée en glycogène tout au long de l'année.

En France, cette technique a surtout été développée dans le domaine piscicole par l'INRA. La production de poissons triploïdes a ainsi permis d'obtenir des gains de croissance (Chourrout, 1989) et une stabilité de la qualité de la chair (Chevassus, 1987) résultant d'une réduction de l'activité gonadique. Chez les mollusques les recherches ont surtout été approfondies depuis la création de l'écloserie de La Tremblade, notamment dans le cadre du présent contrat Etat-Région Poitou-Charentes qui a permis d'appliquer les techniques de triploïdisation aux principales espèces françaises d'intérêt commercial : l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Ledu (1989), Diter (1990)), l'huître plate *Ostrea edulis* (Gendreau et Grizel, 1990), la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Dufy, 1988) et la palourde européenne *Ruditapes decussatus*.

## 2. RAPPEL DES PROPOSITIONS DE TRAVAIL ET DES PRINCIPAUX ACQUIS

Tenant compte de l'état d'avancement des recherches et de l'intérêt des applications possibles résultant de l'obtention d'animaux tri et tétraploïdes, le programme proposé s'articule en trois grandes parties :

- acquisition des techniques de triploïdisation et leurs applications aux espèces françaises d'intérêt commercial (l'huître creuse *C. gigas*, l'huître plate *Ostrea edulis*, la palourde du Pacifique *Ruditapes philippinarum*, la palourde indigène *R. decussatus*),
- production de populations diploïdes et triploïdes : comparaison de leurs performances de croissance dans les eaux littorales françaises, comparaison de la qualité de la chair et étude de la fonction de reproduction,
- mise au point de techniques de tétraploïdisation et essais d'obtention de géniteurs tétraploïdes viables. En cas de succès, essais de croisement avec des géniteurs diploïdes et vérification de la descendance.

L'année 1989 (Anonymes, 1990) a été consacrée à :

- la mise en place de systèmes expérimentaux,
- l'acquisition et l'amélioration des techniques de triploïdisation pour *C. gigas*, l'huître creuse,
- l'application de ces techniques à *R. philippinarum*, la palourde du Pacifique.

L'année 1990 (Gérard, 1991) a été consacrée :

- à la production de populations di et triploïdes de *Crassostrea gigas* et de *Ruditapes philippinarum*,
- aux premiers essais d'induction de la triploïdie chez *Ruditapes decussatus*,
- au début de la mise au point d'une technique de contrôle de la ploïdie par imagerie numérique,
- au début du contrôle des performances dans le milieu naturel des populations diploïdes et triploïdes de *C. gigas*,
- aux premiers essais d'induction de la tétraploïdie.

### 3. RAPPEL DU PRINCIPE ET DES TECHNIQUES DE POLYPLOIDISATION

Un animal est polyploïde quand il possède plus de deux génomes de base, ceux-ci pouvant être homologues ou non selon que la ploïdie provient d'un doublement chromosomique ou d'une hybridation interspécifique naturelle ou artificielle (Sournia *et al.*, 1991). Chez les mollusques, la polyploïdisation n'est envisageable que sur les ovocytes qui sont bloqués au stade prophase ou au début de la métaphase de la 1ère division méiotique (Lucas, 1971). L'achèvement de la méiose qui se concrétise par l'expulsion de deux globules polaires, n'est provoquée que par la pénétration du spermatozoïde (Fig. 1).

#### 3.1. Induction de la triploïdie

La triploïdisation peut être obtenue par:

- rétention d'un des deux globules polaires en soumettant les oeufs, quelques minutes après la fécondation, à des chocs physiques (température, pression) ou à un traitement chimique (Fig. 1),
- le croisement d'un individu diploïde (2N) avec un individu tétraploïde (4N) qui engendre des individus triploïdes. Cette méthode, qui est la plus fiable et qui évite le traitement des oeufs à chaque génération, ne sera applicable que si des tétraploïdes viables et fertiles sont obtenus.

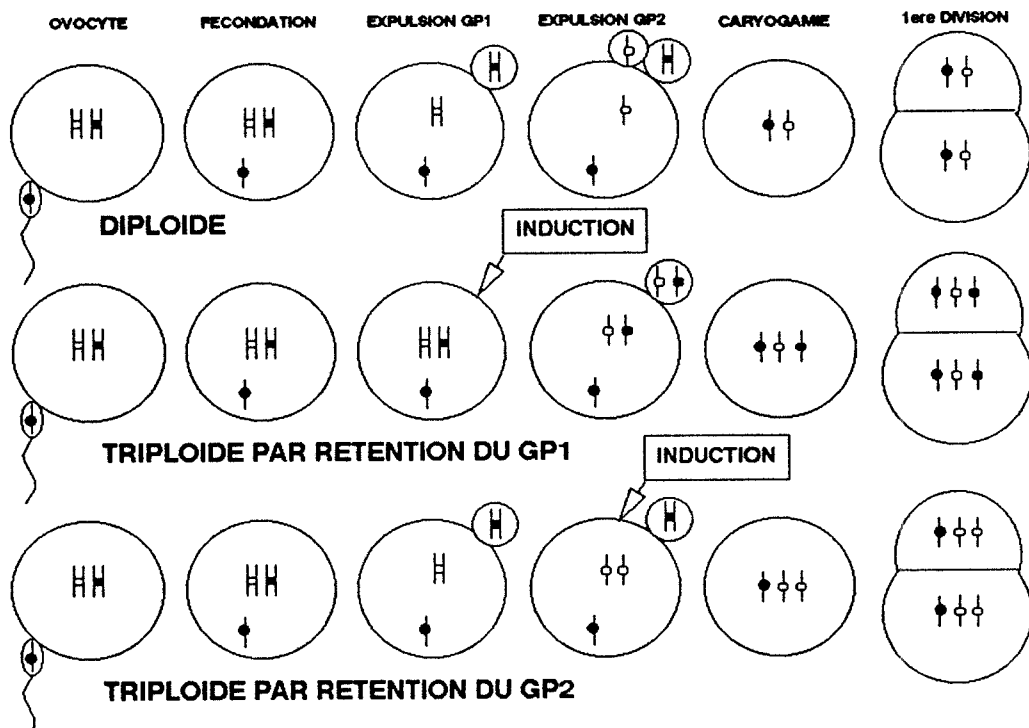
A l'issue des premiers essais, la technique d'induction chimique à la cytochalasine B a été retenue. Son efficacité dépend de la concentration, de la température, de la durée et du moment d'application du traitement. Ces paramètres qui sont fonction de la biologie et du développement embryonnaire doivent être déterminés pour chaque espèce.

#### 3.2. Induction de la tétraploïdie

Diverses techniques (traitements chimiques, chocs de pression, chocs thermiques, électrofusion) sont utilisables dont le but principale est:

- la rétention des deux globules polaires précédée d'une inactivation du stock chromosomique du spermatozoïde (tétraploïdie gynogénétique),
- la suppression de la première division mitotique (tétraploïde endomitotique).

Fig.1: Induction de la triploïdie  
chez les mollusques bivalves



GP1 : Premier globule polaire  
GP2 : Second globule polaire

## 4. PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ANNEE 1991

### 4.1. Contrôle de la ploïdie par imagerie numérique

#### 4.1.1. L'analyse caryologique

Amorcé en 1990, le contrôle de la ploïdie par imagerie numérique est devenue une réalité en 1991. Précédemment, pour estimer les résultats d'un traitement d'induction et juger de son efficacité, seule l'étude caryologique était réalisable au laboratoire. Cette technique fiable et peu coûteuse en produits et matériel présente pourtant de multiples inconvénients:

- elle n'est utilisable qu'à certaines périodes de la vie du bivalve (sur l'embryon de quelques heures ou sur du naissain de 1 à 2 cm) limitant ainsi considérablement son champ d'application,
- elle nécessite de nombreuses heures de lecture au microscope
- réalisée sur les embryons de 6 à 8 heures, elle ne donne qu'une estimation peu précise du taux de polyploïdie, puisque la mortalité peut atteindre 80% dans les 48 heures qui suivent le traitement.

Un contrôle de la ploïdie de naissains de palourde et d'huître creuse a été réalisé en utilisant la caryologie et l'imagerie numérique. La comparaison des résultats et des avantages respectifs des deux méthodes a motivé l'achat, en mars 1991, d'un analyseur d'image SAMBA 2005 de TITN Alcatel.

#### 4.1.2. Principe de l'analyse d'images

Le système de base utilisé est le SAMBA TM 2005 de TITN-Alcatel complété par un logiciel d'application "Ploïdie version 1.04" mis au point pour la cancérologie et de "Stat 2005 version 1.10" pour le traitement des données (Fig. 2). Ce système d'analyse d'images a été développé sur la base des travaux présentés par Giroud (1987).

Le SAMBA TM 2005 est organisé autour d'un capteur connecté à un dispositif qui digitalise l'image en combinant un procédé de balayage et un photodétecteur. Chaque point image est représenté par ses coordonnées et par une valeur numérique correspondant à son niveau de gris (256 niveaux analysés). Le processeur interne de commande et de traitement, qui permet la réalisation physique des mesures et des calculs, se décompose en deux modules :

- un module de commande du capteur et de gestion de l'acquisition,
- un module de traitement et d'analyse des images.

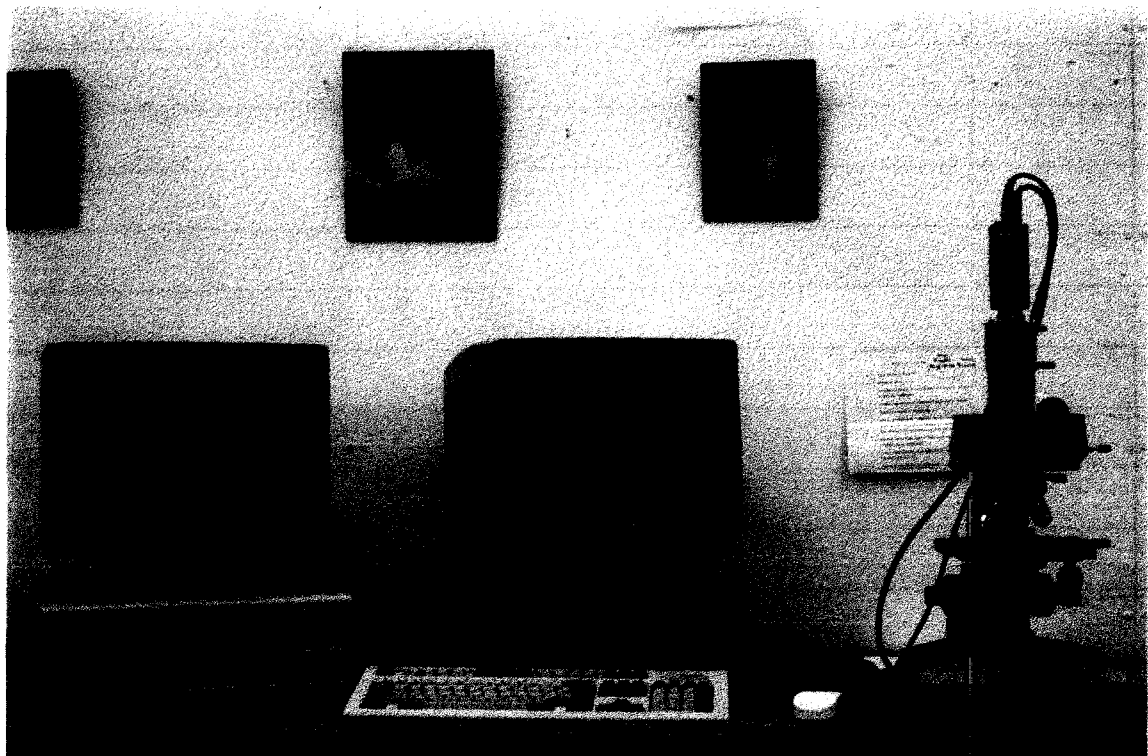
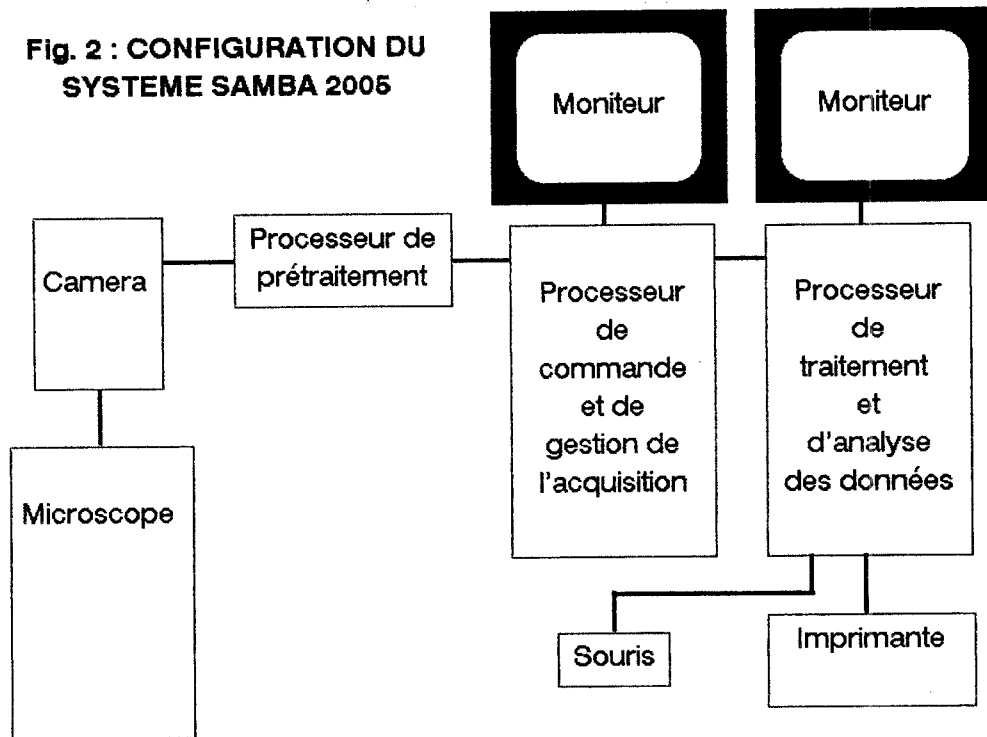
Le matériel est composé principalement d'un microscope relié à une caméra noir et blanc à 256 niveaux de gris, d'un ensemble de cartes de numérisation et de traitement en temps réel des images, d'un micro-ordinateur compatible AT-386 et de deux moniteurs de contrôle, l'un pour la visualisation des images et l'autre pour le traitement des données.

Les étapes du processus complet de traitement et d'analyse des images sont les suivantes:

- acquisition (digitalisation, numérisation),
- prétraitement (amélioration de l'image),
- segmentation et étiquetage des objets,
- paramétrisation
- traitement des données.



**Fig. 2 : CONFIGURATION DU  
SYSTEME SAMBA 2005**



L'analyse de l'image numérisée donne deux mesures de base :

- l'aire en pixels du noyau analysé, surface définie par l'opération de seuillage,
- la densité optique intégrée qui est proportionnelle à la quantité d'ADN dans le noyau.

Pour l'interprétation des mesures il est nécessaire de connaître la densité optique intégrée correspondant au contenu en ADN d'une cellule diploïde. Toutes les valeurs de densité sont ensuite exprimées en unités relatives à cette référence diploïde. Son calcul est réalisé automatiquement à partir de la mesure d'une centaine de cellules diploïdes, la moyenne de leur densité optique intégrée est retenue par l'analyseur comme valeur diploïde de référence. Après chaque analyse d'échantillon, les paramètres dépendants de la valeur de densité optique sont recalculés automatiquement en tenant compte de cette valeur de référence.

#### **4.1.3. Préparation des échantillons**

Au cours de l'année 1991, différentes techniques permettant de contrôler la ploïdie à tous les stades de la vie du bivalve ont été mises au point:

- sur les embryons, les larves et les post-larves, la fréquence des cellules polyploïdes est estimée à partir d'une population cellulaire obtenue après broyage, dissociation et coloration de l'échantillon,
- sur le naissain de 2 à 10 mm, l'analyse se fait individuellement à partir d'empreintes de l'ensemble des parties molles du bivalve,
- sur les juvéniles et les adultes, l'analyse se fait individuellement à partir d'empreintes branchiales. Un contrôle par biopsie sur les adultes permet de trier les animaux en fonction de leur ploïdie ce qui constitue un atout majeur pour nos travaux sur la tétraploïdie, la gynogenèse et le contrôle des performances physiologiques.

L'ADN est mis en évidence par la réaction nucléale de Feulgen-Rossenbeck (Giroud (1987), Lavail *et al.* (1988)). Les lames sont fixées pendant 10mn dans du Bohm-Sprenger, réhydratées dans de l'eau distillée pendant 10 minutes, hydrolysées pendant 1 heure dans de l'HCl 5N puis rincées à l'eau distillée pour bloquer l'hydrolyse. Trempées dans le réactif de Schiff pendant 1h30 à température ambiante, elles sont ensuite rincées à l'eau sulfureuse, 4 fois pendant 1 minute, pour éliminer le Schiff en excès. A nouveau rincées à l'eau distillée, les lames sont alors déshydratées à l'alcool absolu (2 fois 3 minutes), puis au xylène (2 fois 3 minutes) et protégées par une lamelle de verre.

#### **4.1.4. Traitement des données**

Dans le cas des analyses individuelles sur du naissain, des juvéniles ou des adultes la mesure de la ploïdie est immédiate, puisque toutes les valeurs de densité optique de l'échantillon sont exprimées en unités relatives de la valeur moyenne de densité optique intégrée des cellules de référence (Fig. 3).

Pour l'interprétation des mesures obtenues sur des populations cellulaires, une étape supplémentaire est nécessaire: la fréquence des cellules polyploïdes est recherchée par une décomposition en courbes gaussiennes (Fig. 4 et 5).

Ces premiers résultats ont fait l'objet d'une communication au CIEM de La Rochelle au mois d'octobre 1991 (Gérard *et al.*, 1991), le système d'analyse d'images et un poster seront également présentés au congrès de Bordeaux Aquaculture en mars 1992.

Figure 3 : Contrôle de la ploïdie sur individus adultes.  
 Individu diploïde en haut, triploïde en bas.

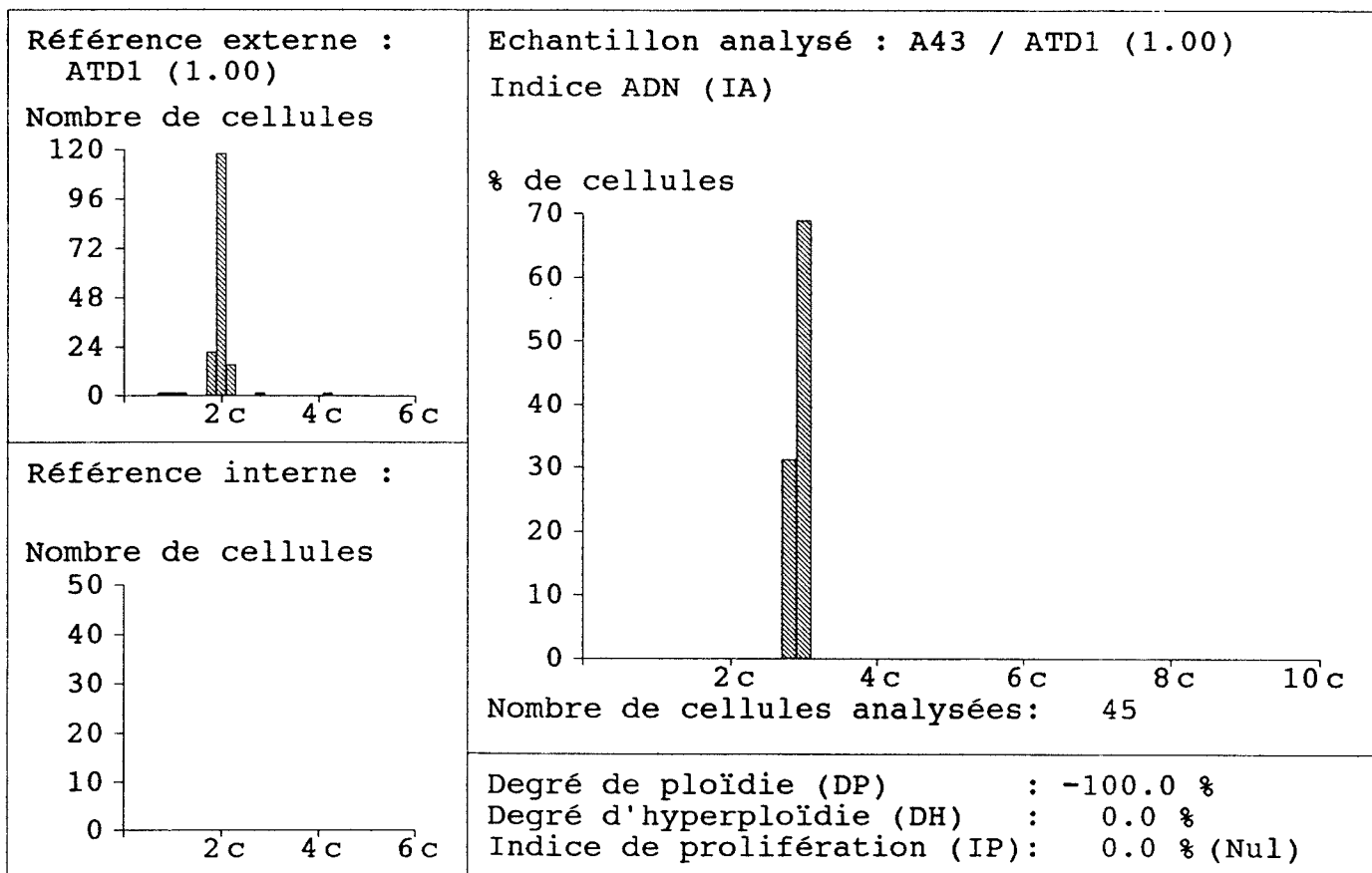
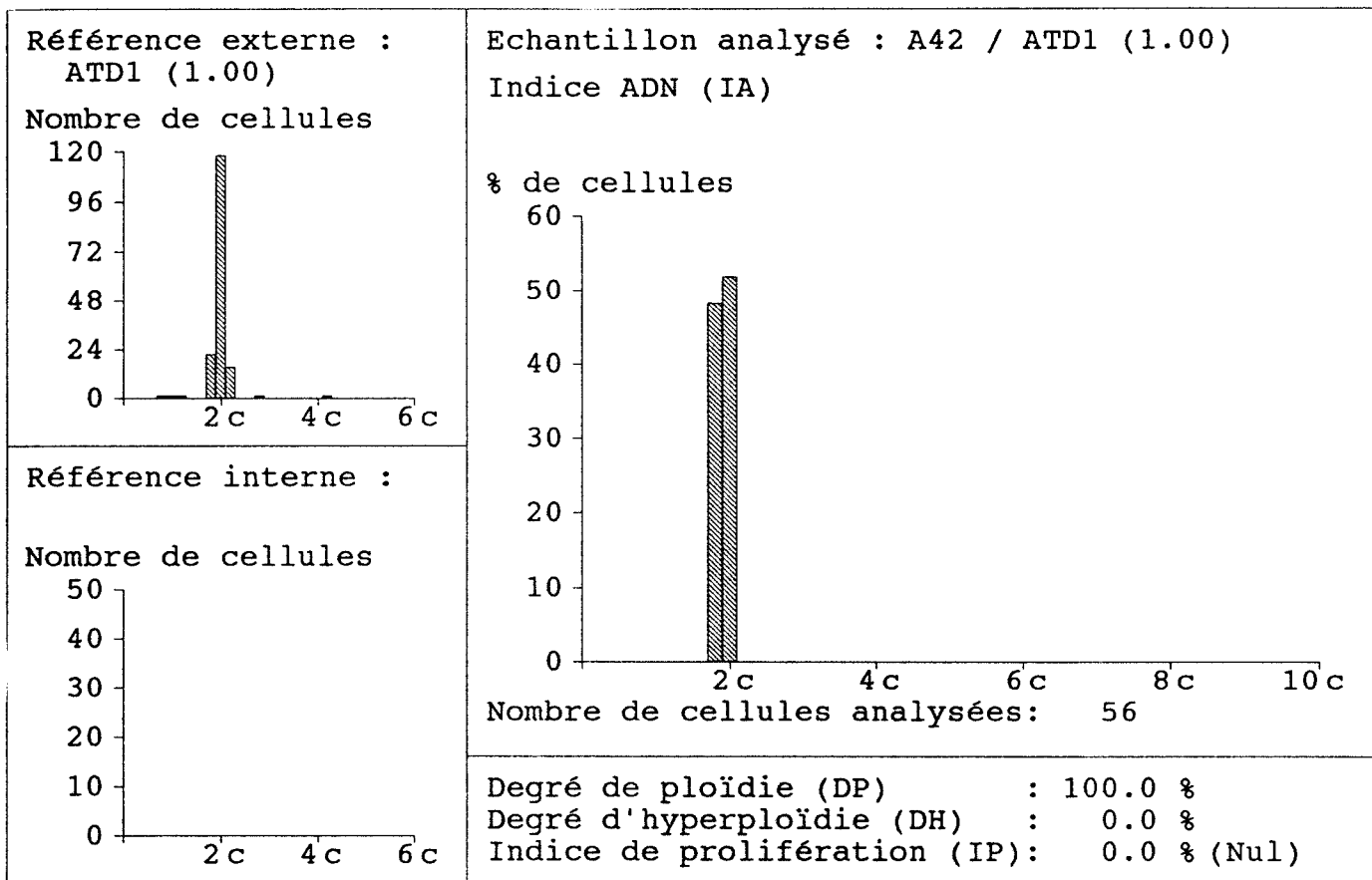


Figure 4 : Analyse d'une population cellulaire.

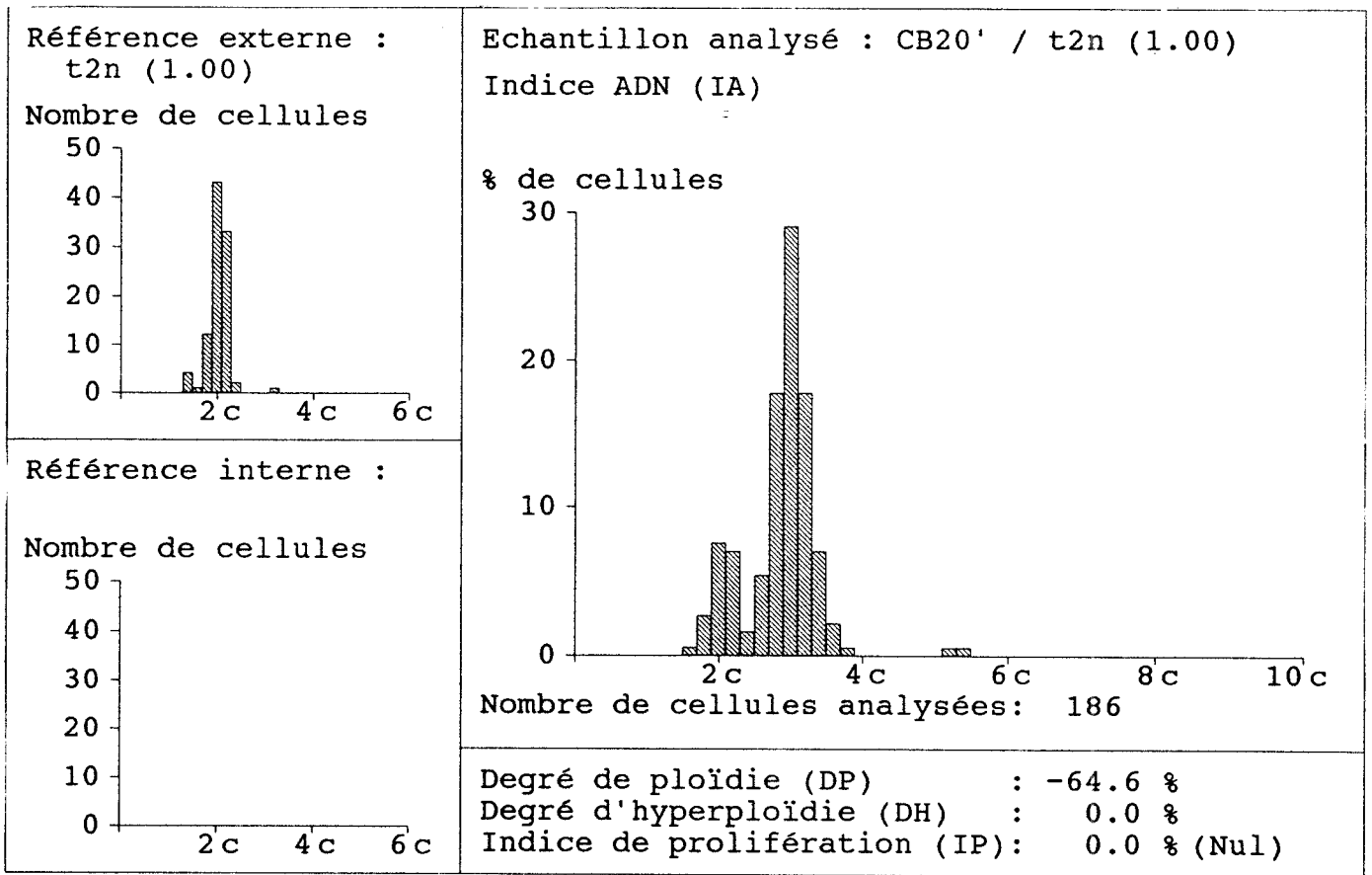
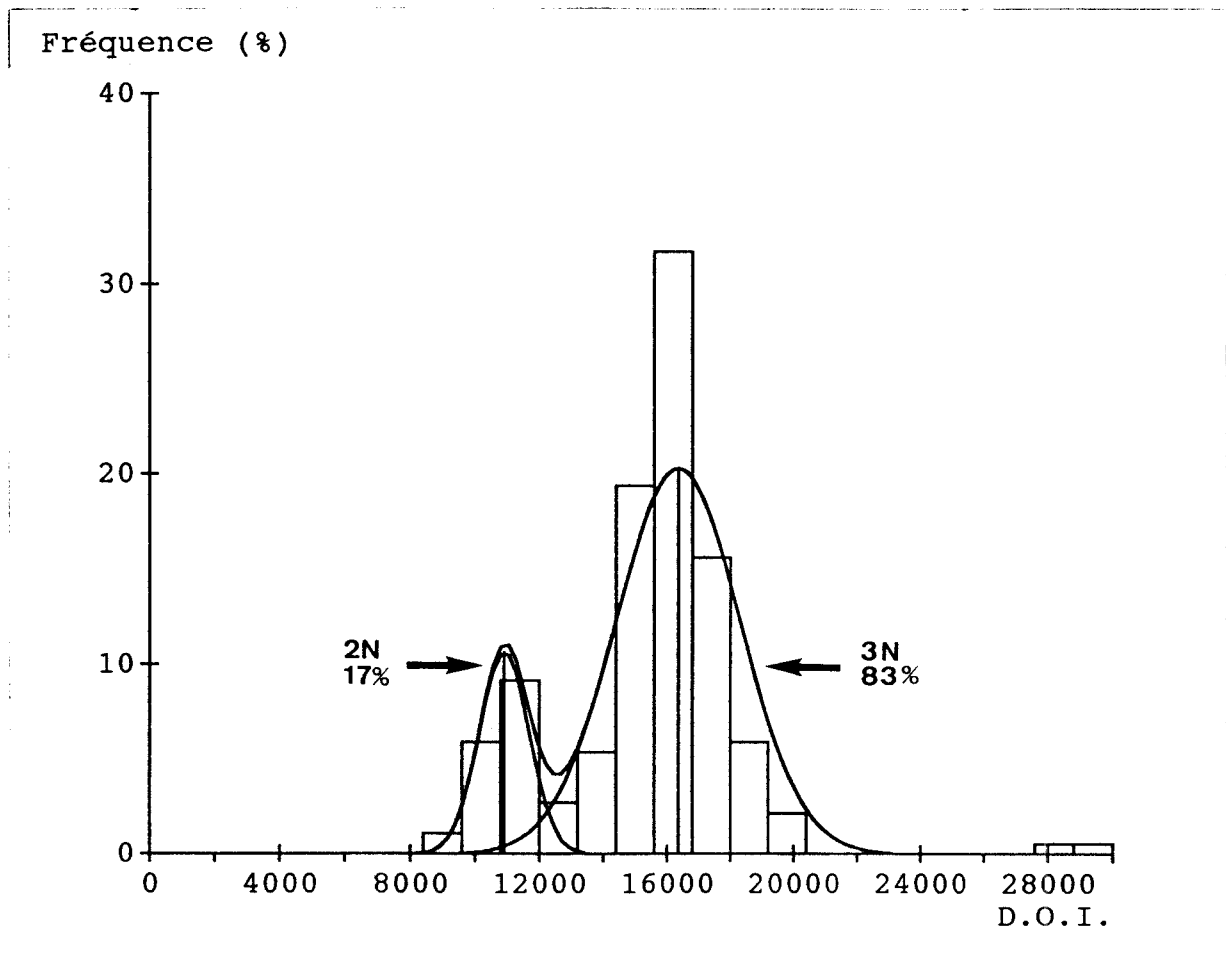


Figure 5 : Décomposition en gaussiennes de la même population cellulaire.



## 4.2. Induction de la triploïdie chez la palourde indigène *Ruditapes decussatus*

Débutés en 1990, les essais d'induction de la triploïdie chez la palourde indigène ont été repris en 1991 dans le cadre d'un stage effectué par C. Noiret (1991).

### 4.2.1. Cinétique du développement embryonnaire

Le moment optimal d'application de la Cytochalasine B pour une température donnée, est en partie déterminé par l'étude de la cinétique du développement embryonnaire précoce jusqu'au stade 2 cellules.

A partir du temps t0 correspondant au mélange des gamètes, des prélèvements sont effectués toutes les 5mn pendant 90mn. Après fixation dans une solution de formaldéhyde à 8% dans de l'eau de mer et coloration à l'Acridine Orange, les échantillons sont observés au microscope à épifluorescence. Le pourcentage de chaque stade du développement est calculé à partir de l'observation de 50 embryons par prélèvement.

Les courbes de cinétique embryonnaire pour deux températures (22 et 25°C) sont présentées dans les figures 6 et 7 (GP1: 1er Globule Polaire, GP2: 2ème Globule Polaire, 2C: stade 2 cellules, 4C: stade 4 cellules).

### 4.2.2. Essai de triploïdisation

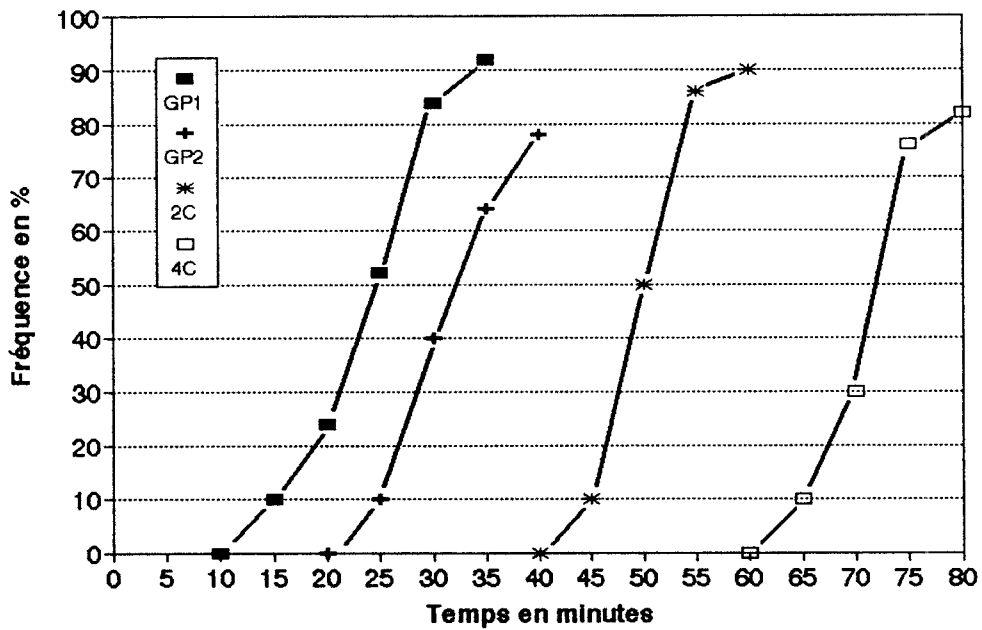
Les données des trois expériences de triploïdisation menées pendant l'année 1991, et celles de l'expérience de 1990, sont consignées dans le tableau 1 et illustrées dans les figures 8 et 9.

Tableau 1: Bilan des inductions de la triploïdie chez *Ruditapes decussatus*

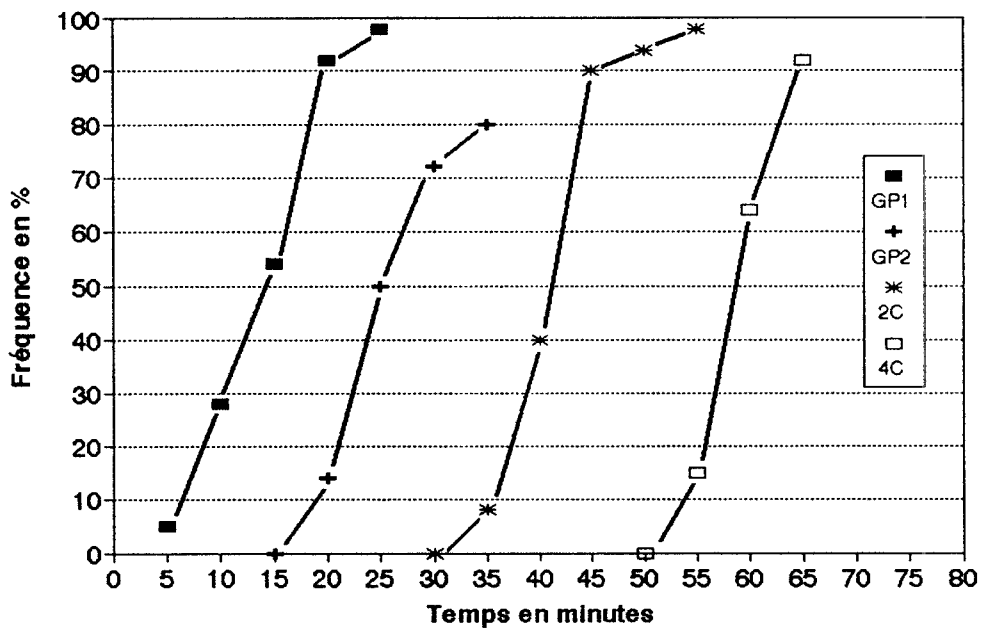
Référence élevage	Date	Température	Dose de CB	Durée d'application en minutes	Moment d'application en minutes	% de triploïdes analyse caryologique
RD3N9028	18/09/90	22°C	1mg/l	15mn	15mn 20mn 25mn	60 66 44
RD3N9107	27/05/91	25°C	0.5mg/l	15mn	10mn 15mn 20mn 25mn	63 63 36 03
RD3N9110	02/07/91	25°C	1mg/l	15mn	10mn 15mn	70 60
RD3N9112	04/07/91	25°C	0.5mg/l	15mn	10mn 15mn	50 63

Une plus grande précision dans l'étude du développement embryonnaire ayant été obtenue à 25°C, c'est à cette température que les traitements ont été appliqués en 1991.

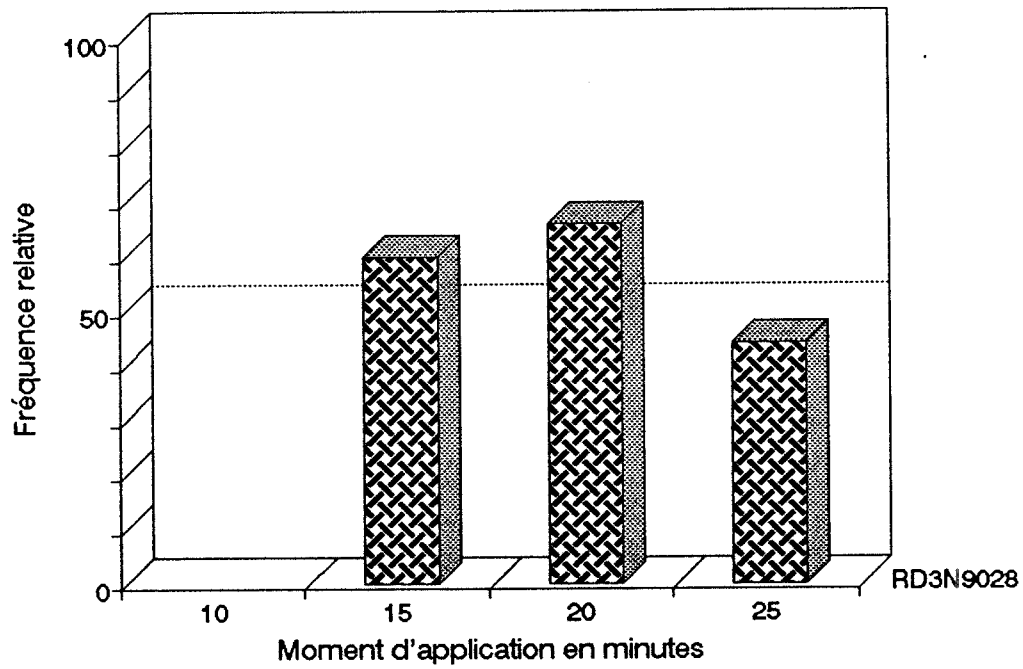
**Fig. 6 : Développement embryonnaire de Ruditapes decussatus à 22°C**



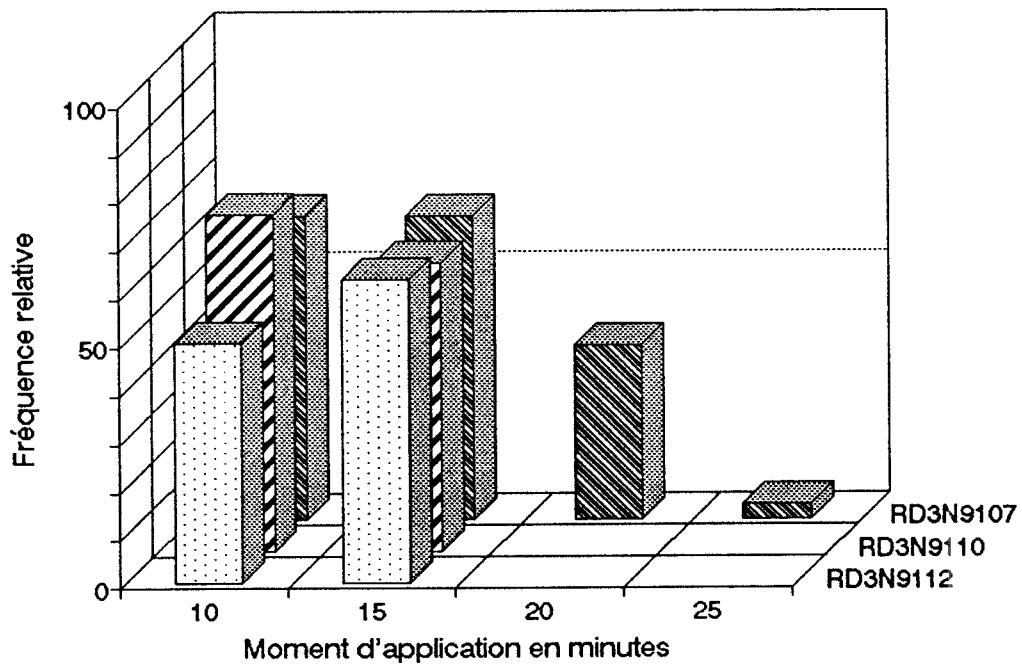
**Fig. 7 : Développement embryonnaire de Ruditapes decussatus à 25°C**



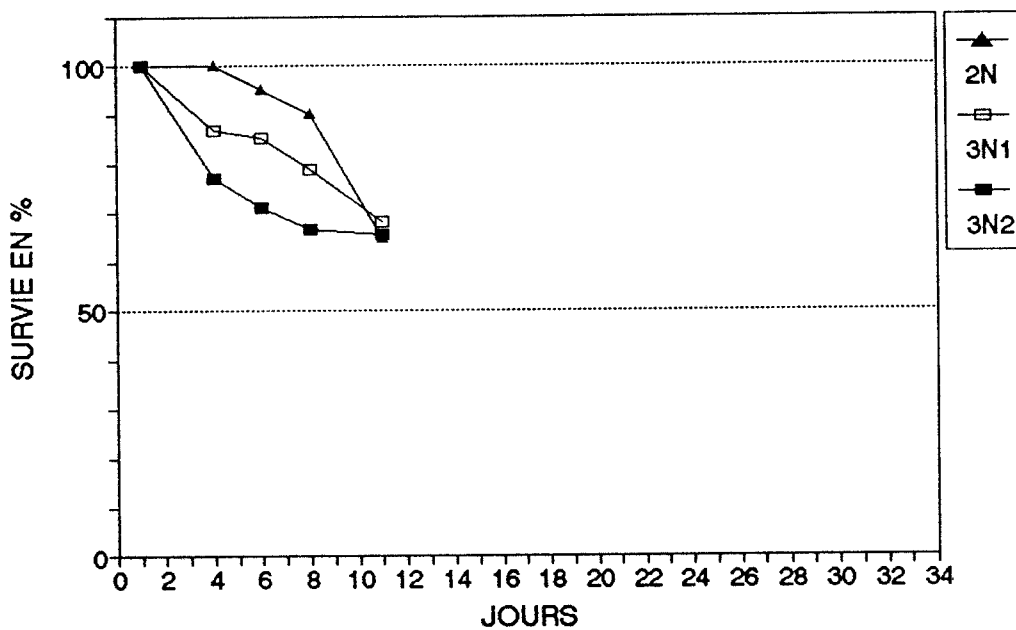
**Fig.8: TAUX DE TRIPLOIDES A 22°C  
EN FONCTION DU MOMENT D'APPLICATION**



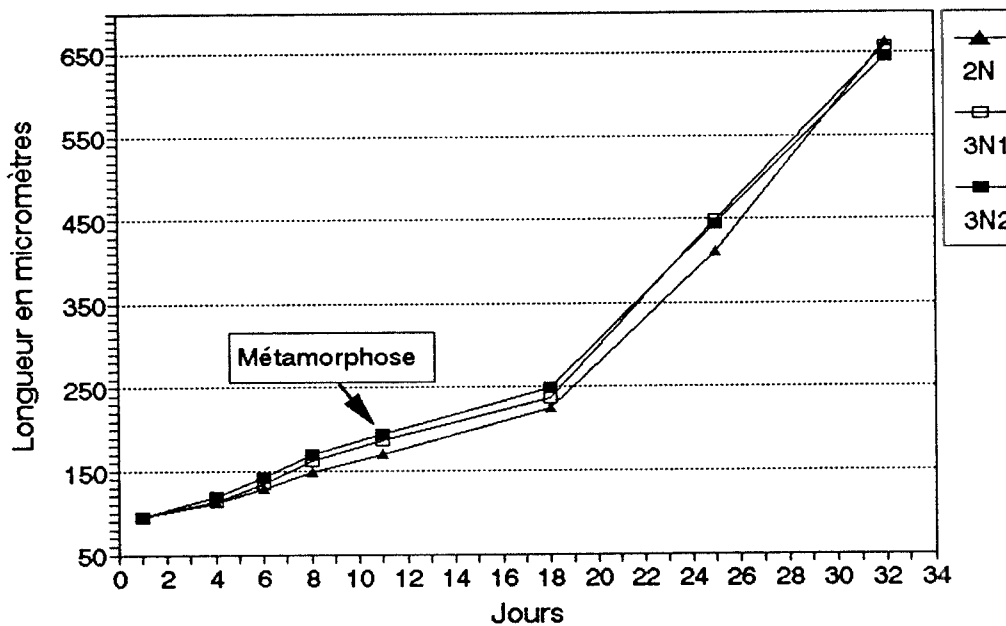
**Fig.9: TAUX DE TRIPLOIDES A 25°C  
EN FONCTION DU MOMENT D'APPLICATION**



**Fig.10: ELEVAGE LARVAIRE RD3N9112**  
MORTALITES COMPAREES



**Fig.11: ELEVAGE RD3N9112**  
Croissances larvaires et postlarvaires





A l'issue de ces expériences, il semble que le traitement appliqué 15mn après fécondation, pour une dose de 0.5 mg/l de Cytochalasine B soit pour l'instant, le plus approprié. Les taux de triploïdie (63%) sont toutefois faibles en regard de ceux réalisés chez *Ruditapes philippinarum* (80 à 90%). Une dose de CB deux fois plus forte n'améliore que très faiblement le taux de triploïdes induits, et par contre, elle affecte considérablement le taux de survie au sein des lots. Ces observations rejoignent celles de Beaumont et Contaris (1988) qui avaient déjà montré, chez la palourde du Pacifique, qu'une dose de 0.5 mg/l n'était pas moins efficace qu'une dose de 1 mg/l, et qu'elle peut améliorer la survie initiale (Tabarini (1984), Stanley *et al.* (1981), Beaumont et Kelly (1989)).

#### **4.2.3. Elevages larvaires et post-larvaires**

Seule la ponte du 04/07/91 (réf RD3N9112) a fait l'objet d'un élevage larvaire jusqu'à la métamorphose. Les 1 365 000 oeufs obtenus ont été divisés en 3 lots d'égale densité: un témoin diploïde et deux lots traités. Les courbes de survie et de croissance de ces 3 lots sont présentées dans les figures 10 et 11.

Durant la phase larvaire et post-larvaires (jusqu'à 650 µm de taille moyenne), aucune différence significative de croissance entre les lots n'a été enregistrée, contrairement aux observations de Dufy et Diter (1990) sur la palourde du Pacifique *Ruditapes philippinarum*. Au 11ème jour, lors du transfert en micronurserie pour la métamorphose, les taux de survie étaient sensiblement les mêmes, de l'ordre de 65%, chez le lot témoin et les lots traités.

Les élevages, conduits sans difficulté majeure jusqu'à une taille proche du millimètre, ont connu à la mi-août, une très forte mortalité d'origine indéterminée. Tous les lots ont été supprimé pour des raisons sanitaires.

#### **4.2.4. Bilan provisoire et perspectives.**

Une optimisation du traitement est nécessaire, les recherches qui seront reprises en 1992, devront surtout porter sur le moment d'application et sur la durée du traitement. Des recherches complémentaires au niveau zootechnie devront être réalisées pour essayer d'améliorer la survie post-larvaires afin d'obtenir des populations diploïdes et triploïdes de taille significative pour pouvoir réaliser le contrôle des performances biologiques dans le milieu naturel.

### 4.3. Induction de la triploïdie chez l'huître plate *Ostrea edulis*

En reprenant les techniques d'induction de la triploïdie *in vitro* mises au point à La Tremblade par Gendreau (1988), Gendreau et Grizel (1990), nous avons tenté de produire des populations diploïdes et triploïdes d'huître plate en vue de contrôler leurs performances biologiques dans le milieu naturel.

Cette technique basée sur une fécondation *in vitro* chez une espèce larvipare, permet de bien contrôler l'induction mais elle comporte des inconvénients majeurs:

- elle implique automatiquement un sacrifice des huîtres femelles
- elle nécessite un élevage larvaire extrapalléal qui se traduit toujours par de faibles survies

Pour améliorer les survies larvaires, élément indispensable avant d'envisager un transfert technologique dans les écloseries, une nouvelle technique d'induction *in vivo* a été recherchée en 1991.

#### 4.3.1. Maturation des géniteurs

L'induction de la triploïdie chez une espèce larvipare comme *Ostrea edulis* suppose un conditionnement préalable des géniteurs dans des structures individuelles. Les huîtres, originaires de la baie de Quiberon, ont été placées individuellement dans des cuvettes en plastiques à fond noir de deux litres, alimentées à un débit de 5 l/h, par de l'eau de mer brute enrichie en phytoplancton et thermostatée à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Après trois semaines de maturation, la ponte a été provoquée par choc thermique.

#### 4.3.2. Bilan des inductions par la technique *in vitro*

En se basant sur l'étude de la chronologie des stades embryonnaires précoces et sur les meilleurs paramètres d'induction déterminés par Gendreau (1988), quatre traitements d'induction de la triploïdie ont été tentés. Les principaux paramètres sont présentés dans le tableau 2 et les figures 12 et 13. La rétention du premier globule polaire était recherchée dans les élevages 3N1 et 3N2, et la rétention du deuxième globule polaire dans les élevages 3N3 et 3N4.

Tableau 2: Induction de la triploïdie *in vitro* chez *Ostrea edulis* (Réf OE3N9114)

	Témoin	Lot 3N1	Lot 3N2	Lot 3N3	Lot 3N4
Température	20°C	20°C	20°C	20°C	20°C
Début traitement		30mn	40mn	90mn	100mn
Durée		20mn	20mn	20mn	20mn
Pourcentage de triploïdes à J5		79%	78%	68%	52%
% de triploïdes à la métamorphose		élevage supprimé	42%	60%	élevage supprimé
% de survie avant métamorphose	53.3		23	42.1	
Pourcentage de survie après 5 mois	0.9		0.43	0.45	

Les traitements sur les premiers globules polaires ont été apparemment plus efficaces. Toutefois pour conclure à ce niveau, une étude parallèle de la chronologie du développement embryonnaire aurait été nécessaire pour savoir si les traitements ont bien coïncidé avec l'expulsion des globules polaires.

La survie des larves élevées hors de la cavité palléale de l'huître femelle est extrêmement faible surtout après métamorphose (fig 12 et tableau 2), le lot 3N1 a du être abandonné au 16ème jour en raison d'une très mauvaise croissance, le lot 3N4 est mort immédiatement après le 5ème jour. Une mortalité différentielle significative a été enregistrée entre les autres lots traités et le lot témoin. La survie après 5 mois d'élevage est insignifiante dans tous les lots.

Au niveau croissance, il n'y a pas eu de différence significative entre les lots traités (3N2 et 3N3) et le lot témoin, aussi bien pendant la phase larvaire que pendant la phase de prégrossissement (fig. 13).

#### **4.3.3. Bilan des inductions par la technique in vivo**

Une induction de la triploïdie par baignation dans la cytochalasine B suivi d'un rinçage dans le DMSO a été tentée sur 3 huîtres femelles à partir du même lot de géniteurs. Les principaux paramètres sont présentés dans le tableau 3 et les figures 14 et 15.

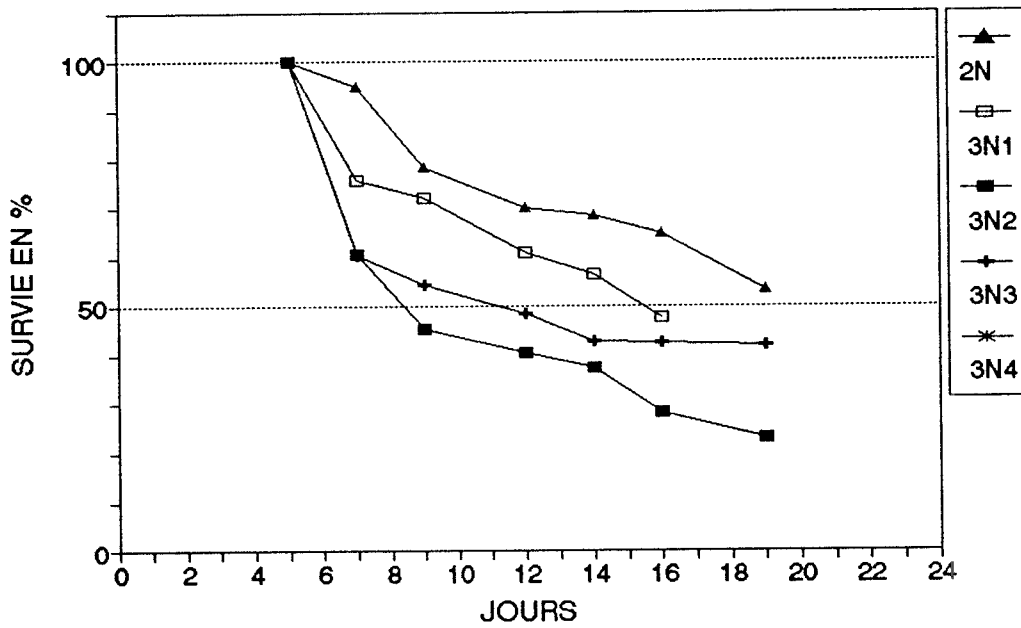
Tableau 3: Induction de la triploïdie in vivo chez *Ostrea edulis*

	Témoin	30 min.-1	40 min.-1	40 min.-2
Température	20°C	20°C	20°C	20°C
Début traitement		30 mn	40 mn	40 mn
Durée		20mn	20mn	20mn
Pourcentage de triploïdes à J7		0 %	31 %	82 %
% de triploïdes à la métamorphose		0 %	44 %	92 %
% de survie avant métamorphose	40	41.1	52.3	61.4
% de survie après 5 mois	1	Elevage supprimé	17.1	11.4

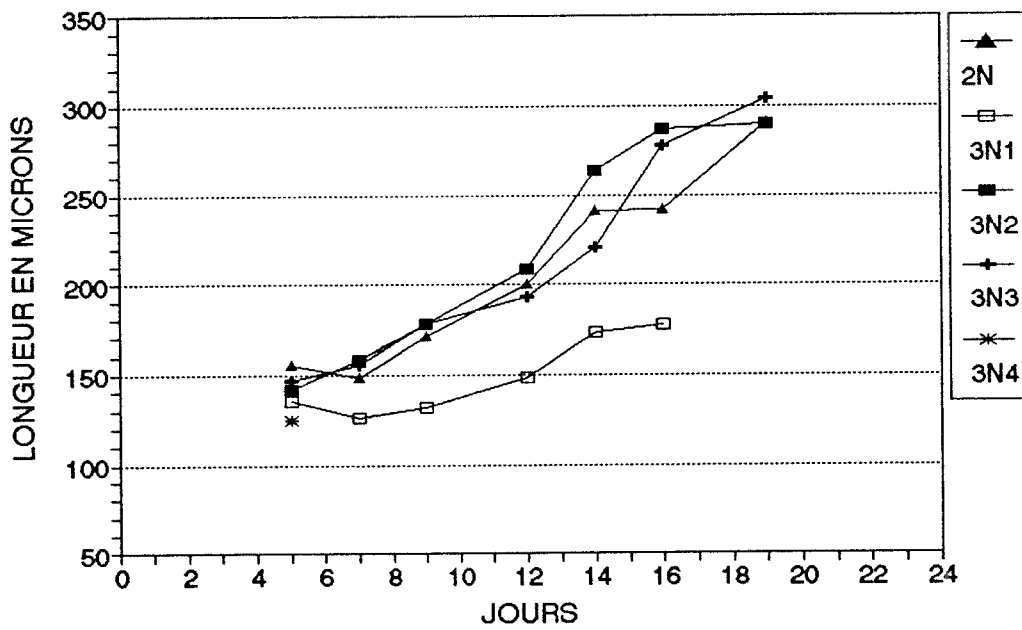
Une des trois huîtres traitées a été totalement réfractaire au traitement d'induction, la fermeture des valves au moment de l'addition de la cytochalasine est certainement à l'origine de ce résultat. Par contre les deux autres huîtres ont accepté le traitement, toutefois les taux de triploïdisation obtenus sont très différents malgré un protocole d'induction rigoureusement identique.

La survie, pendant l'élevage larvaire, a été supérieure dans les lots triploïdisés, y compris par rapport au lot "30 min-1" réfractaire au traitement (fig. 14). Cette supériorité des triploïdes est à prendre avec prudence, surtout que la survie du lot témoin diploïde a été anormalement basse par rapport aux élevages standards d'*Ostrea edulis* habituellement réalisés au laboratoire, et que contrairement aux expériences opérées *in vitro*, la comparaison ne repose pas sur un même pool de produit gamétique. La survie après 5 mois est satisfaisante pour les lots traités (tableau 3).

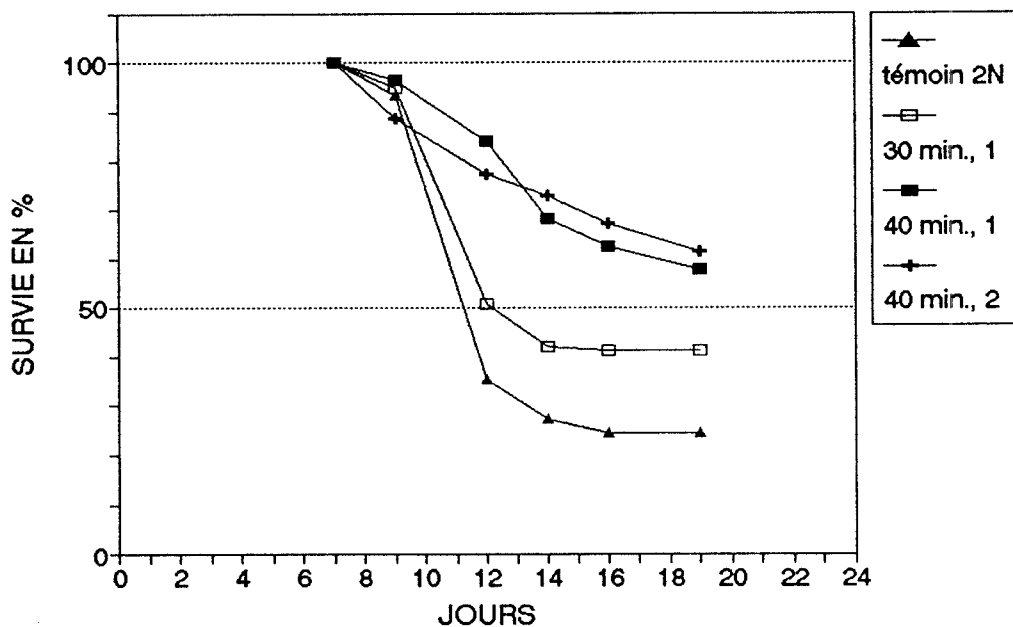
**Fig.12: ELEVAGE LARVAIRE OE3N9114**  
MORTALITES COMPAREES



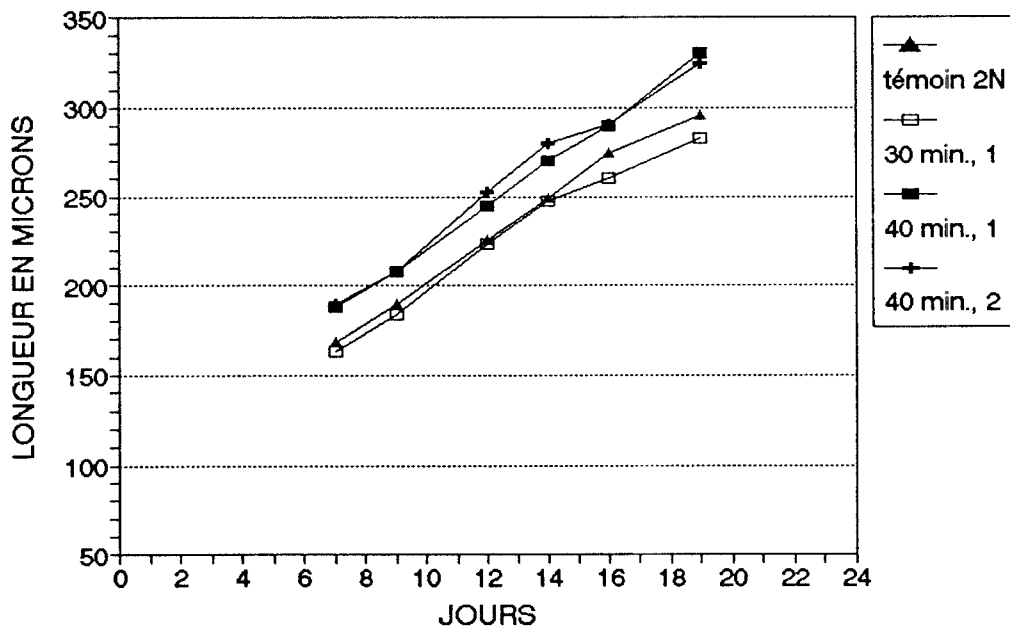
**Fig.13: ELEVAGE LARVAIRE OE3N9114**  
CROISSANCES COMPAREES



**Fig.14: ELEVAGE LARVAIRE OE3N9115**  
MORTALITES COMPAREES



**Fig.15: ELEVAGE LARVAIRE OE3N9115**  
CROISSANCES COMPAREES



Cette supériorité apparente des triploïdes se retrouve également au niveau de la croissance larvaire (fig. 15) mais pour les raisons explicitées précédemment ce résultat doit être pris avec circonspection.

Le bilan de ces essais *in vivo* reste néanmoins très positif puisque:

- le traitement d'induction par balnéation est accepté par certaines huîtres
- les taux de triploïdisation obtenus peuvent être excellents,
- les survies larvaire et post-larvaire sont nettement supérieures à celles de la technique *in vitro*

#### **4.3.4. Contrôle des performances dans le milieu naturel**

Ce contrôle débutera à partir de 1992 après la période de prégrossissement. Ce sont surtout les huîtres issues des essais d'induction *in vivo* qui serviront à ces tests. Des lots produits par rétention du GP1 et du GP2 seront également comparés dans le cadre d'une étude physiologique sur le turn-over des protéines relié au degré d'hétérozygotie.

#### 4.4. Mise au point d'une nouvelle méthode d'induction de la polyplôïdie

Sur les conseils de P. Guerrier du CNRS, responsable du laboratoire de Biologie du Développement à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, nous avons testé en 1991 une nouvelle molécule susceptible d'induire la polyplôïdie chez les mollusques bivalves.

##### 4.4.1. Principe de la méthode

La substance utilisée, le 6-diéthylaminopurine (6-DMAP), ne touche pas la synthèse protéique mais seulement les phosphorylations ( Néant et Guerrier, 1988). Cet inhibiteur des protéines kinases entraîne la décondensation de la chromatine; les chromosomes métaphasiques donnent alors des noyaux au repos et le fuseau est détruit par dépolymérisation de la tubuline.

L'effet est parfaitement réversible, il suffit de laver les oeufs avec de l'eau de mer pour que les protéines se rephosphorylent, les chromosomes se recondensent, et les microtubules se reforment.

##### 4.4.2. Résultats des premiers essais

Après quelques expériences préliminaires qui avaient pour but de vérifier l'efficacité de l'induction de la triploïdie par le 6-DMAP et de cerner la dose de produit à employer (figure 16), nous avons essayé de comparer, à partir d'un même pool d'oeufs, les traitements au 6-DMAP et à la Cytochalasine B.

Les différents paramètres de cette expérimentation sont consignés dans le tableau 4 et illustrés dans la figure 17.

Tableau 4: Induction de la triploïdie par le 6-DMAP et la Cytochalasine B (CB) chez *Crassostrea gigas* (réf.: CG3N9117)

	Témoin	3N1	3N2	3N3	3N4
Produit d'induction		6-DMAP	6-DMAP	CB	CB
Dose		150µM/l	300µM/l	0.5mg/l	1mg/l
Température	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Début traitement		15mn	15mn	20mn	20mn
Durée		20mn	20mn	20mn	15mn
% de triploïdes à 24h		11%	90%	94%	100%

Le contrôle de ploïdie effectué 24 heures après la fécondation, au stade larve D (fig. 17), montre que le taux de triploïdisation, obtenu avec une dose de 300µM/l de 6-DMAP administrée 15mn après la fécondation pendant 20mn, est aussi bon que ceux obtenus avec la Cytochalasine B.

Le lot 3N1 a été abandonné après les résultats du contrôle de ploïdie, le taux de triploïdes enregistré étant jugé insuffisant. La croissance larvaire (fig.18) a été légèrement supérieure dans le lot témoin, mais la différence n'est pas significative. Par contre une mortalité différentielle significative (fig.19) en défaveur de tous les lots traités a été enregistrée.

Fig. 16: Taux d'éclosion et pourcentage de triploïdes / dose de 6-DMAP

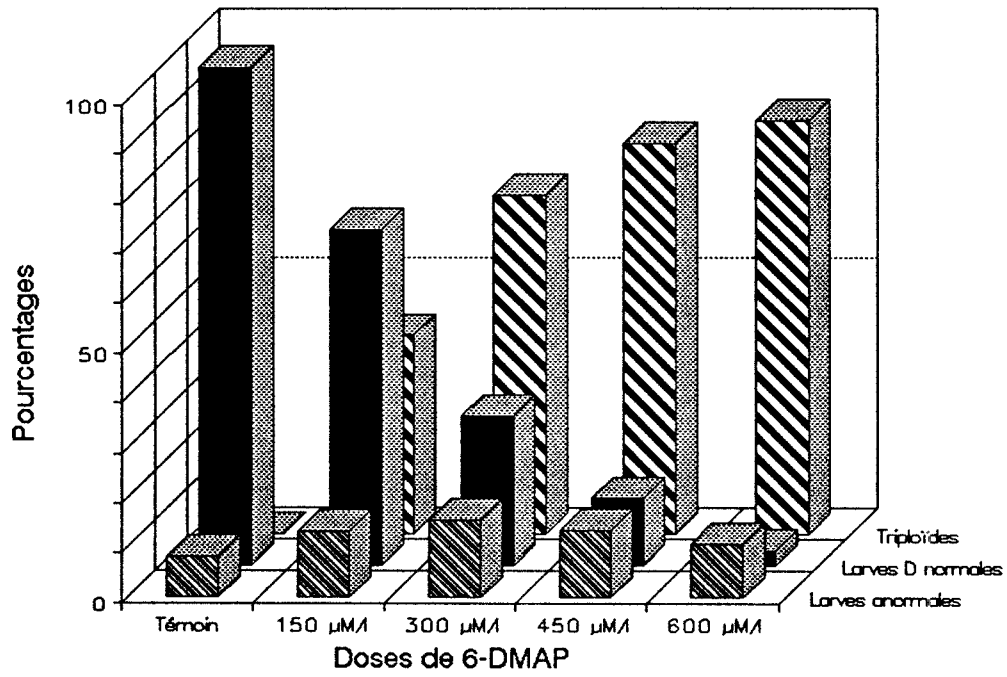
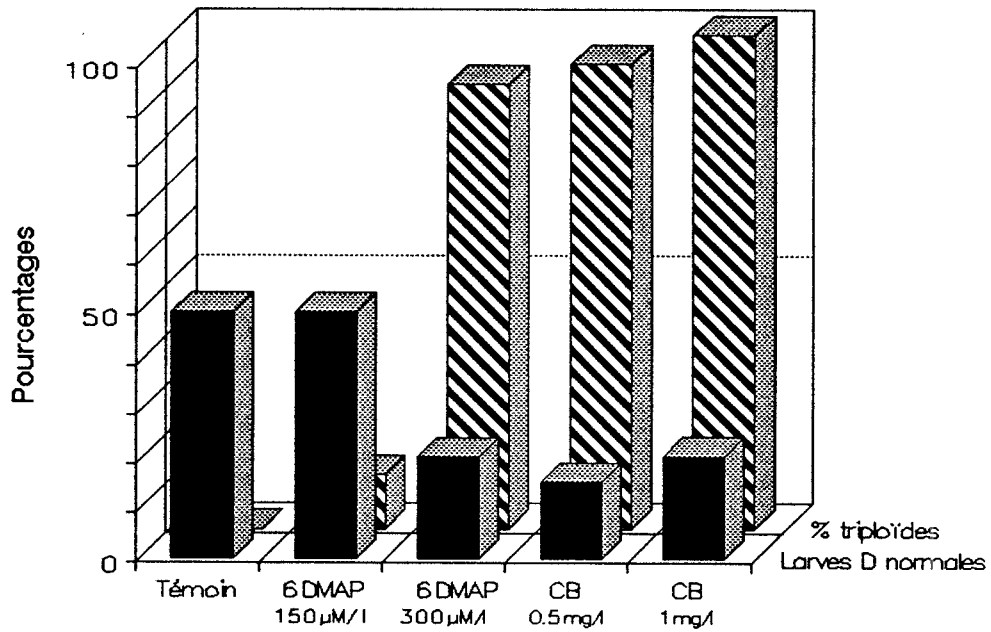
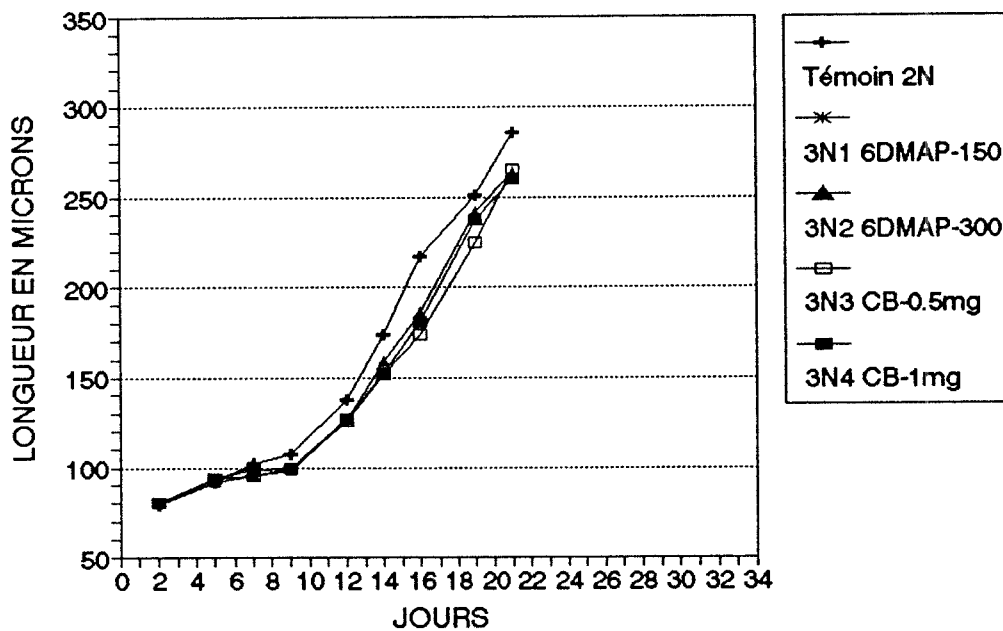


Fig.17: Induction de la triploïdie par le 6-DMAP et la Cytochalasine B

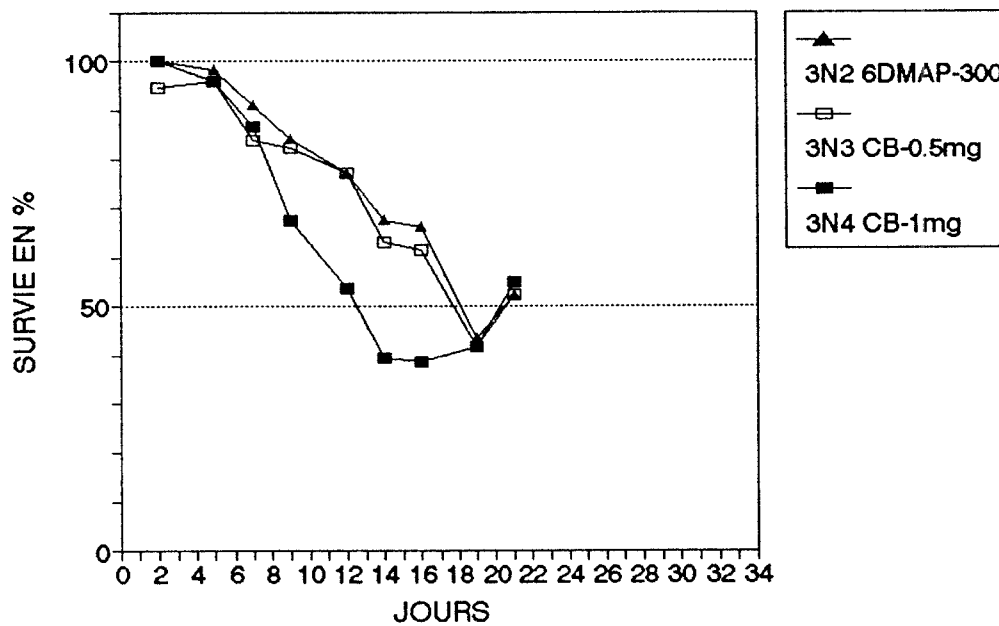




**Fig.18: Elevage larvaire CG3N9117**  
CROISSANCES COMPAREES



**Fig.19: Elevage larvaire CG3N9117**  
MORTALITES RELATIVES / TEMOIN



#### **4.4.3. Conclusions et perspectives**

Les premiers essais d'induction de la polyploïdie par la 6-DMAP sont très encourageants, ce produit présente de multiples avantages par rapport à la cytochalasine B :

- il se dissout directement dans l'eau de mer contrairement à la cytochalasine B qui nécessite un solvant, le DMSO, pour pouvoir être utilisée,
- il ne nécessite pas de phase de rinçage pour stopper son action, il suffit de laver les oeufs à l'eau de mer. Par contre, l'effet de la cytochalasine ne peut être arrêté que par un rinçage dans une solution de DMSO,
- il n'est pas recensé dans la liste des poisons, contrairement à la cytochalasine B qui est un produit dangereux (carcinogène, tératogène) devant être manipulé avec précaution
- il est nettement plus économique que la cytochalasine B.

Des recherches complémentaires seront nécessaires en 1992 pour affiner la dose de produit à employer, le moment d'application du traitement et sa durée.

#### 4.5. Mise en place du contrôle des performances biologiques pour les populations diploïdes et triploïdes de *Ruditapes philippinarum*

Au mois d'avril 1991, après prégrossissement et vérification du taux de triploïdie par imagerie numérique, les populations diploïdes et triploïdes de *Ruditapes philippinarum* produites le 10 juillet 1990 (Gérard, 1991) ont été expédiées dans trois sites du littoral français en vue de réaliser un contrôle de leurs performances biologiques.

Les trois sites retenus sont:

- les claires du CREEA sur l'île d'Oléron (Charente Maritime),
- la concession expérimentale IFREMER de La Trinité sur mer (Morbihan),
- une concession privée à Brouennou (Finistère) qui est un site très touché par la maladie des anneaux bruns.

Les deux premiers sites font l'objet d'une étude expérimentale pour laquelle un protocole de suivi biologique a été établi. Le troisième site a surtout été choisi pour réaliser une production expérimentale dans un site où sévit le vibrio P1 responsable de la maladie des anneaux bruns.

Pour les deux sites Oléron et Morbihan, le contrôle des performances (fig.20) prévoit de suivre l'évolution de différents paramètres: la croissance et la mortalité, les indices de condition et les rapports allométriques, les constituants biochimiques (protides, lipides, glucides et glycogène). Des prélèvements particuliers sont réalisés pour l'étude histologique de la reproduction. L'apparition de l'anneau brun est également recherchée sur les palourdes ouvertes lors des différentes analyses. Chaque analyse est bien entendu, rapportée à la ploïdie de l'animal déterminée par imagerie numérique.

Si les performances des triploïdes sont supérieures à celles des diploïdes, elles ne le sont réellement qu'au début de la maturation sexuelle. En conséquence, le protocole de suivi prévoit un rythme très lâche d'échantillonnage en 1991 (2 prélèvements), et un contrôle mensuel de tous les paramètres en 1992.

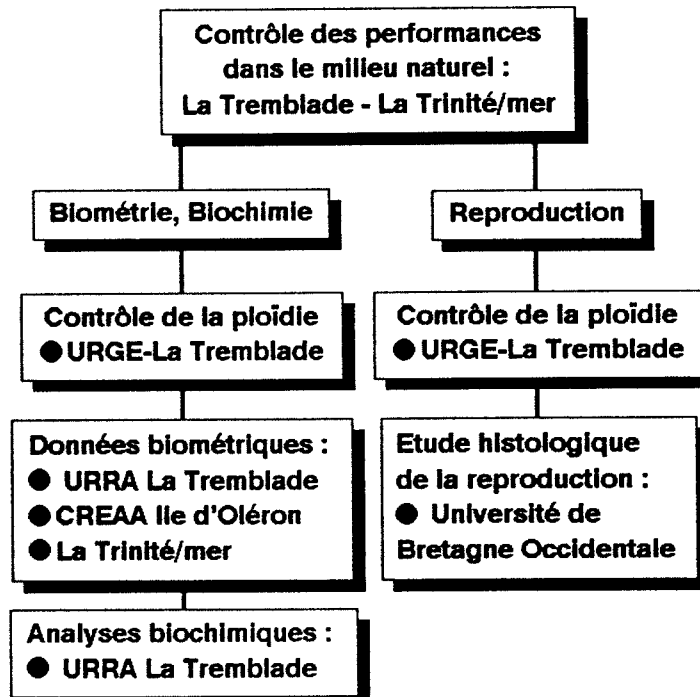
Ce suivi met à contribution différents laboratoires d'IFREMER:

- l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion de La Tremblade,
- l'Unité de Recherche Régionale Aquacole de La Tremblade,
- le laboratoire RA de La Trinité/mer,
- le laboratoire PMDC de Brest,

et des structures externes:

- le Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole de l'île d'Oléron,
- le laboratoire de Zoologie de l'Université de Bretagne Occidentale

**Fig. 20 : CONTROLE DES PERFORMANCES  
DES POPULATIONS DIPLOIDES ET TRIPLOIDES DE *Ruditapes philippinarum***



#### **4.6. Début du contrôle des performances biologiques pour les populations diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas***

Le contrôle des performances des populations diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas* a débuté en mars 1991, à La Tremblade et à Ouistreham conformément au protocole établi en 1990 (fig. 21).

##### **4.6.1. Elevage en claire: La Tremblade**

Sur le site de La Tremblade, l'Unité de Recherche Régionale Aquacole a pris en charge l'élevage des huîtres et le suivi des paramètres biométriques et biochimiques, l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion assurant le contrôle de la ploïdie sur chaque animal analysé. L'étude histologique de la reproduction a été confiée au laboratoire de Zoologie de l'Université de Bretagne Occidentale dans le cadre d'un contrat d'incitation.

##### **Choix du site**

L'élevage en claire a été retenu afin d'accélérer les processus de première maturation qui doivent théoriquement entraîner des différences de performances entre les lots diploïdes et triploïdes. En attendant l'achèvement des travaux des "claires expérimentales" d'IFREMER prévu pour 1992-1993, l'élevage a été réalisé dans les claires de la Section Régionale Conchylicole.

De gros problèmes d'infrastructures ont été rencontrés; une réfection des claires a même été nécessaire en cours d'expérience, nous obligeant à transférer provisoirement les huîtres dans un autre site. La dégradation du milieu s'est traduite par de très fortes mortalités dans les lots diploïdes et triploïdes, et par une distorsion dans les performances biologiques enregistrées. Autre conséquence de cette mortalité, l'expérience qui devait se dérouler sur deux années, a dû être écourtée par manque d'huîtres pour les échantillonnages.

##### **Evolution des paramètres biométriques**

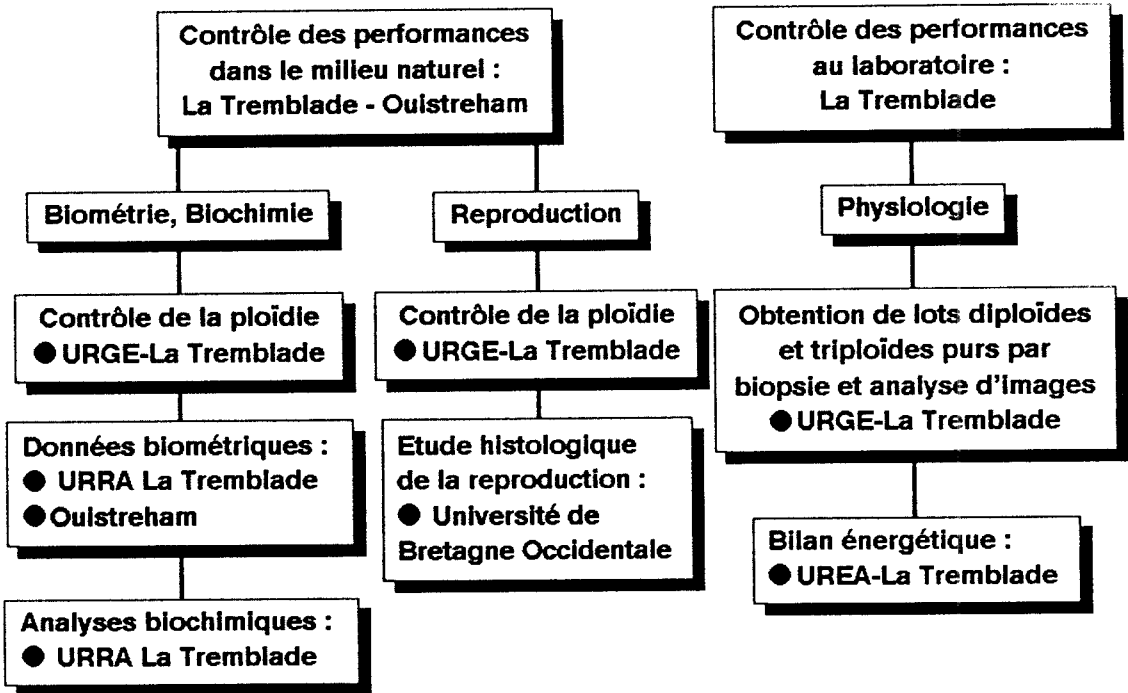
Malgré les problèmes environnementaux rencontrés, la croissance a été satisfaisante pour les huîtres qui ont survécu. D'un poids moyen d'environ 3,5g au mois de février, elles ont atteint 41g au mois de novembre pour le lot diploïde et 53g pour le lot triploïde. La différence entre les deux lots n'est sensible qu'après la période estivale (fig.22).

L'évolution du poids sec de chair et de l'indice de condition (fig. 23 et 24) nous renseigne un peu mieux sur les différentes phases de l'élevage. Les deux premiers prélèvements, février et mars, correspondent à la fin du prégrossissement dans l'écloserie de La Tremblade, l'indice de condition juste avant le transfert en mer étant particulièrement élevé.

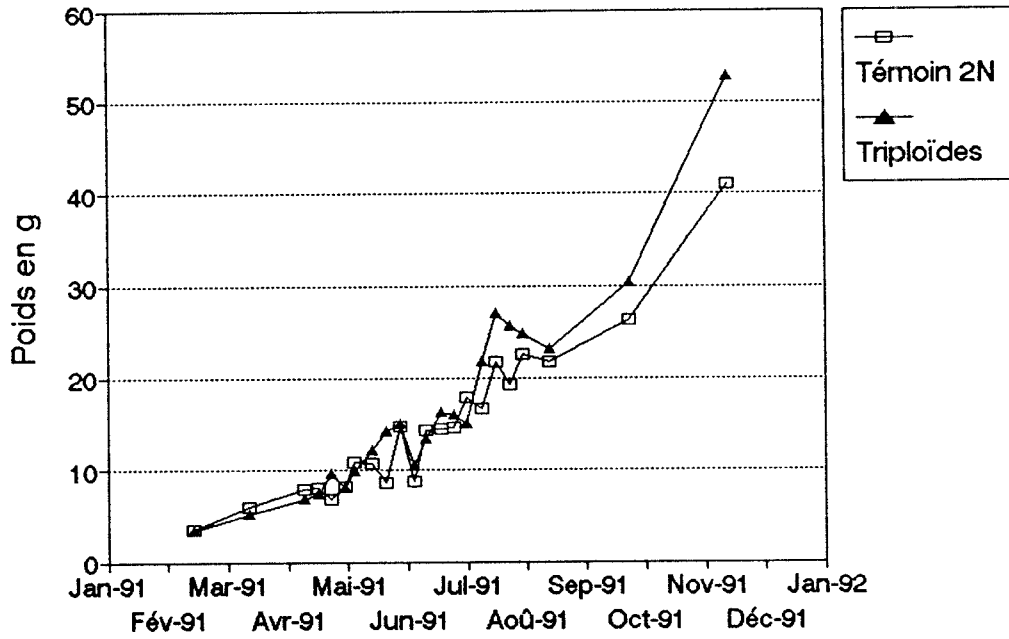
Du mois d'avril à la fin juin, les prélèvements ont été réalisés dans les claires de la Section Régionale à Avallon. Le poids sec de chair (fig.23) qui n'évolue plus, et l'indice de condition (fig.24) qui chute au plus bas, sont de bons indicateurs d'un stress nutritif. Une amorce de reprise de croissance est toutefois enregistrée à partir de la mi-juin, 15 jours avant le transfert des huîtres dans un autre site. Cette manipulation a été suivie de fortes mortalités.

C'est à partir du mois de juillet que sont enregistrées les premières différences entre les lots diploïdes et triploïdes. Entre juillet et novembre, l'indice de condition fluctue très peu chez les triploïdes (entre 65 et 75). Pendant la même période chez les diploïdes, deux phases peuvent être distinguées: une phase de maturation entre juillet et début août pendant laquelle l'indice monte jusqu'à 90, suivie d'une phase d'émission des gamètes entre le début et la mi-août durant laquelle l'indice chute brutalement.

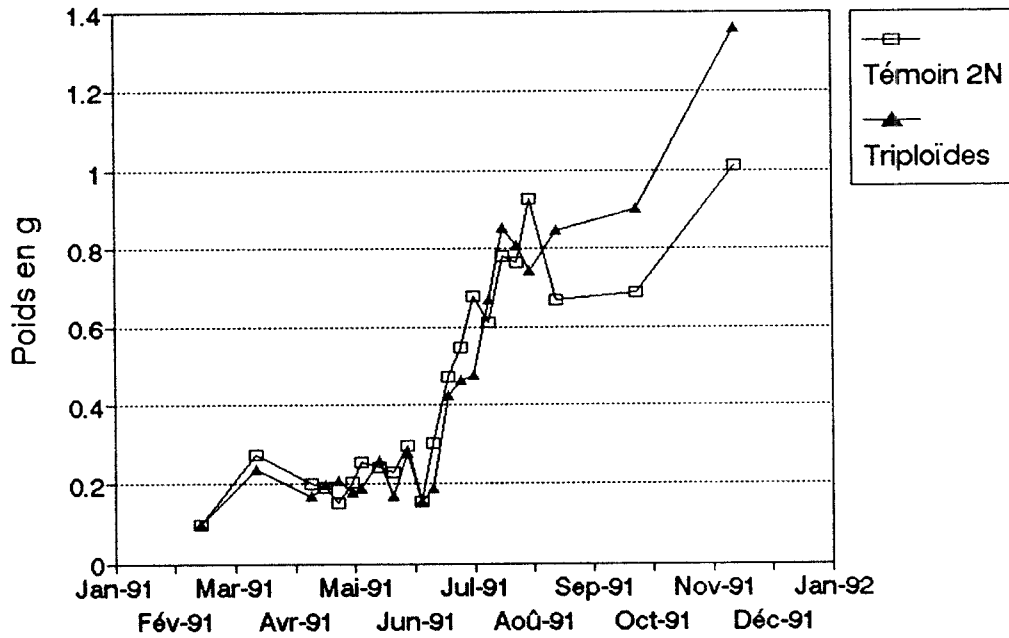
**Fig. 21: CONTROLE DES PERFORMANCES  
DES POPULATIONS DIPLOIDES ET TRIPLOIDES DE Crassostrea gigas**



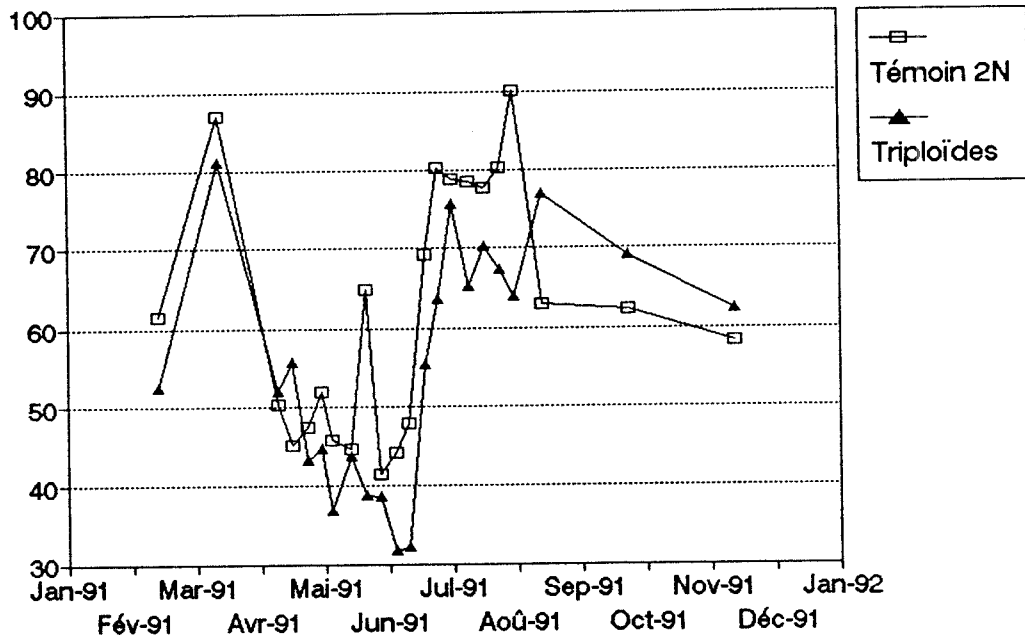
**Fig.22: POIDS TOTAL MOYEN**



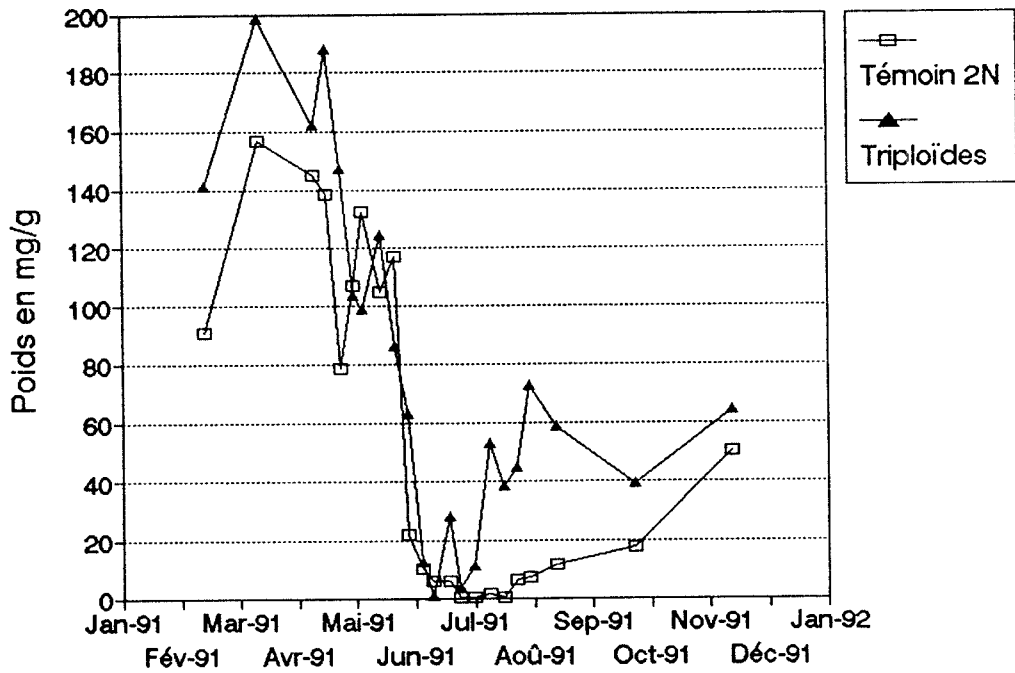
**Fig.23: POIDS SEC DE CHAIR**



**Fig.24: INDICE DE CONDITION Ps/(Pt-Pc)**

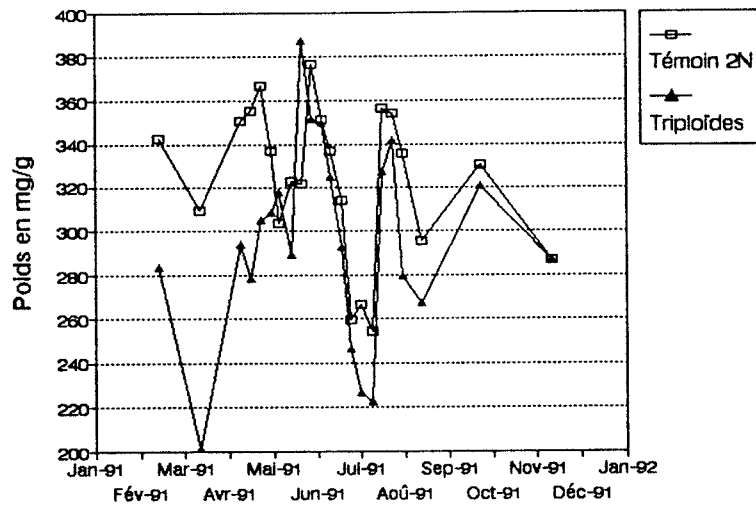


**Fig.25: TENEUR EN GLYCOGENE**

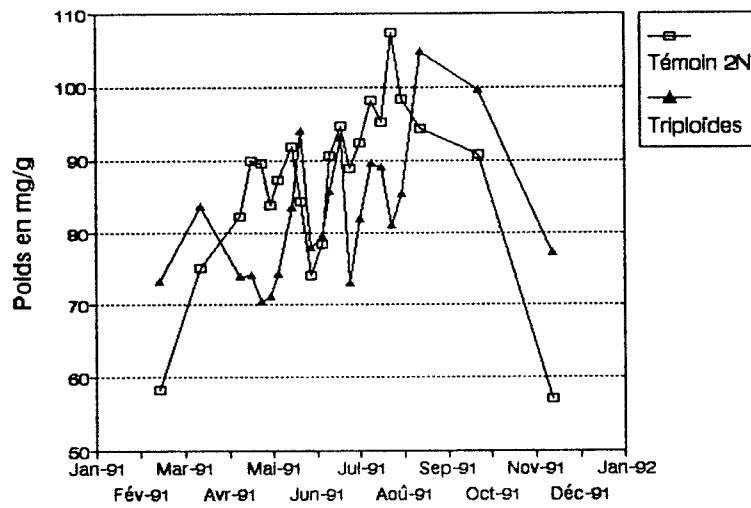




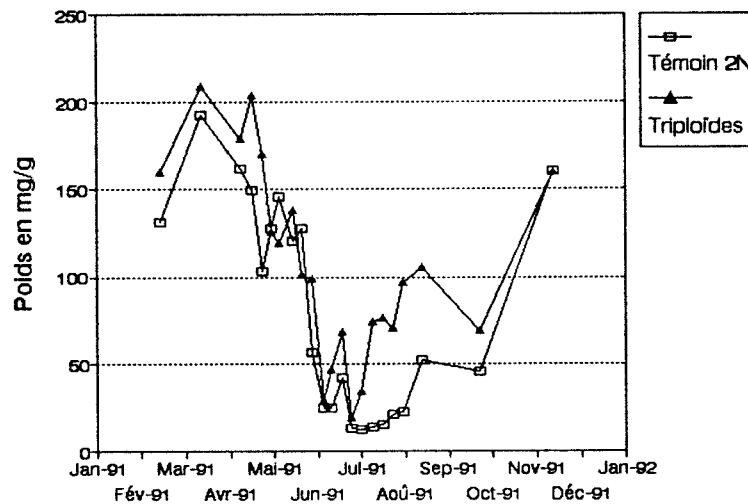
**Fig.26: TENEUR EN PROTEINES**



**Fig.27: TENEUR EN LIPIDES**



**Fig.28: TENEUR EN GLUCIDES**



Les résultats de l'étude histologique de la reproduction, quand ils seront connus, permettront de vérifier ces hypothèses, et également de voir si, chez les triploïdes, la faible augmentation de l'indice observée pendant la première quinzaine d'août, et sa diminution progressive entre septembre et novembre, correspondent réellement à une maturation et à une vidange de produits gamétiques, phénomène déjà signalé par Allen et Downing (1990) chez des triploïdes de *Crassostrea gigas*.

#### **Evolution des paramètres biochimiques**

Les résultats obtenus (fig. 25 à 28), si l'on excepte la période de stress trophique, sont dans l'ensemble conformes aux teneurs déjà enregistrées à Marennes-Oléron par Deslous-Paoli *et al.* (1982), et Deslous-Paoli et Héral (1988).

Ces auteurs observent un pic de protéines pendant la gamétogenèse, au mois de juin et juillet, un phénomène totalement inverse est enregistré ici (fig. 26) pendant le stress de la fin du printemps.

Les teneurs en lipides (fig. 27) ont un cycle qui se rapproche plus de la normale, bien que les valeurs maximales soient un peu faibles par rapport à celles enregistrées par Deslous-Paoli *et al.* (1982). Les teneurs maximales qui sont atteintes au mois de juillet pour les diploïdes, correspondent à la fin de la gamétogenèse, la ponte entraînant ensuite une forte diminution. Les triploïdes présentent également un pic légèrement décalé au mois d'août. Les résultats de l'étude histologique de la reproduction devraient permettre de savoir si ce maximum doit être relié à une activité gonadique.

Pour résister aux mauvaises conditions trophiques du printemps, les huîtres diploïdes comme les triploïdes, ont épuisé leurs réserves glucidiques (fig.25 et 28). Dès que les conditions se sont améliorées, à partir de la mi-juin, la teneur en glycogène des huîtres triploïdes remonte rapidement alors qu'elle reste proche de zéro pour les diploïdes pendant la phase de gamétogenèse. Ce résultat très important, confirme qu'en l'absence de stress trophique, la réduction de la gonadogenèse chez les huîtres triploïdes entraîne une nette amélioration de la qualité de la chair qui se traduit par une teneur élevée en glycogène. Après la ponte, les teneurs en glucides totaux et en glycogène chez les diploïdes augmentent progressivement jusqu'au mois de novembre où elles rejoignent celles des triploïdes.

#### **4.6.2. Elevage sur l'estran: Ouistreham**

Sur le site d'Ouistreham, c'est le laboratoire Ressources Aquacoles qui a pris en charge l'élevage des huîtres et le suivi des paramètres biométriques. Les analyses biochimiques sont réalisées par l'Unité de Recherche Régionale Aquacole de La Tremblade et le contrôle de la ploïdie par l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion.

La croissance sur l'estran étant moins rapide qu'en claire, l'essentiel du contrôle des performances sera effectué en 1992.

#### **4.6.3. Etude physiologique**

Conformément au protocole établi en 1990, le lot qui ne contenait que 40% d'huîtres triploïdes, a été trié grâce à la mise au point de la technique de contrôle de la ploïdie par analyse d'image sur des fragments de branchie prélevés par biopsie. Les lots diploïde et triploïde purs obtenus, ont été fournis à l'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles pour l'étude du bilan énergétique qui sera réalisée en 1992 et 1993.

## 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La technique de contrôle de la ploïdie par imagerie numérique qui a été développée en 1991, permet désormais de vérifier à tout moment la ploïdie d'un bivalve juvénile ou adulte et, de contrôler le taux de polyploïdes dans une population larvaire ou post-larvaire. Des améliorations techniques seront néanmoins nécessaires en 1992, surtout dans la préparation des échantillons d'embryons et de larves.

Le protocole d'induction de la triploïdie par la cytochalasine B chez *Ruditapes decussatus*, la palourde indigène, a été mis au point en partie. Toutefois les taux de triploïdie sont encore faibles (entre 60 et 70%) en regard de ceux obtenus sur la palourde du Pacifique, et la survie après métamorphose reste très aléatoire. De nouveaux essais seront effectués en 1992 afin d'essayer d'optimiser les traitements d'induction, de tester l'induction au 6DMAP, et d'améliorer la survie post-larvaire.

Des populations diploïdes et triploïdes d'*Ostrea edulis* ont été obtenues, dans un premier temps par la technique d'élevage larvaire in vitro mis au point en 1988, et dans un deuxième temps par une technique de balnéation, beaucoup plus simple d'utilisation, qui améliore considérablement la survie larvaire et post-larvaire.

Un des résultats les plus importants obtenus en 1991, a été la mise au point d'une technique novatrice d'induction de la polyploïdie chez les mollusques bivalves, technique basée sur l'utilisation du 6-DMAP. Ce produit présente de multiples avantages par rapport à la cytochalasine B: il se dissout directement dans l'eau de mer, il n'est pas recensé comme poison, il ne nécessite pas l'utilisation d'un solvant comme le DMSO, et, il est plus économique et tout aussi efficace.

Au programme de l'année 1992, il est prévu :

- de poursuivre l'optimisation de la technique d'induction de la triploïdie chez la palourde indigène *Ruditapes decussatus*,
- de poursuivre la mise au point de la technique d'induction de la polyploïdie avec le 6-DMAP,
- d'améliorer la technique de contrôle de la ploïdie par imagerie numérique pendant les phases embryonnaire et larvaire,
- de poursuivre le contrôle des performances des populations diploïdes et triploïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas* et de palourde du Pacifique *Ruditapes philippinarum* dans le milieu naturel et au laboratoire,
- de mettre en place et d'organiser le contrôle des performances des populations diploïdes et triploïdes d'huître plate *Ostrea edulis*,

## BIBLIOGRAPHIE

- Anonymes, 1990.** Rapports internes IFREMER - RIDRV - 90.29 -RA/La Tremblade
- Allen, S.K., JR. and Downing, S.L., 1986.** Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 102 : 197-208.
- Allen, S.K., 1987.** Genetic manipulations : critical review of methods and performances, shellfish. *In Proc World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in aquaculture, Bordeaux 27-30 May 1986, Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, pp. 127-144.*
- Allen, S.K., JR., and Downing, S.L., 1990.** Performance of triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* : Gametogenèsis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47, 1213-1222.
- Arai, K., Naito, F. and Fujino, K., 1986.** Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52 : 417-422.
- Beaumont, A.R. and Contaris, M.H., 1988.** Production of triploid embryos of *Tapes philippinarum* by use of cytochalasin B. *Aquaculture*, 73 : 37-42.
- Beaumont, A.R. and Kelly, M.H., 1989.** Production of triploid *Mytilus edulis* larvae and heterotic effects on their growth. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 132 : 69-84.
- Chevassus, B., 1987.** Caractéristiques et performances des lignées uniparentales et de polyploïdes chez les poissons d'eau froide. *In Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture, Bordeaux 27-30 May, 1986. Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, PP. 145-161.*
- Chourrout, D., 1989.** Gynogenèse, polyploïdie et transfert de gènes chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, 60p.
- Deslous-Paoli, J.M., Zanette, Y., Heral, M., Masse, H. and Garnier, J., 1982.** Amélioration de la forme et de la qualité de l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans les claires de Marennes-Oléron. *Rev.Trav. Inst. Pêches Marit.*, 45 (3) : 181-194
- Deslous-Paoli, J.M. et Heral, M., 1988.** Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat. Living Resour.*, 1, 239-249.
- Diter, A., 1990.** Reproduction uniparentale et polyploïdie induites chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et chez les bivalves *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* et *Clamys varia*. Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI, 88p. et annexes.
- Downing, S.L. and Allen, S.K., Jr., 1987.** Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61 : 1 -15.

- Dufy, C. and Diter, A., 1990. Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. I - Chemical induction and larval performances of triploids. *Aquat. Liv. Resour.*, 3 : 55-60.
- Dufy, C., 1988. La Polyplôidie chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* : Induction et influence sur les performances larvaires. Mémoire de DEA, Univ. Aix - Marseille II. 40p.
- Gendreau, S., 1988. Fécondation *in vitro* et induction de la polyplôidie chez l'huître plate larvipare, *Ostrea edulis*, L., Mémoire de DEA, Univ. Bret. Occi., Brest, 30p.
- Gendreau, S. and Grizel, H., 1988. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L.. *Aquaculture*, 90 : 229-238.
- Gérard, A., 1991. Obtention de souches conchyliques performantes par polyplôidisation. Rapport Interne IFREMER, RIDRV-91.08 - RA La Tremblade.
- Gérard, A., Peignon, J.M. et Chagot, D., 1991. Contrôle de la ploïdie par imagerie numérique dans des expériences d'induction de la triploïdie chez les mollusques bivalves. CIEM La Rochelle Paper C.M. 1991/F : 12 réf K.
- Giroud, F., 1987. Approches cytométriques de la prolifération et de la différenciation: notion de faciès chromatinien. Thèse 87 /GRE1/0099 - 243p.
- Heral, M., et Deslous-Paoli, J.M., 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesure microcalorimétriques et par dosages biochimiques. *Oceanol. Acta*, 1983, 6,2 : 193-199.
- Lavaill, R., Lequeux, N., Radal, M., Ursule, E., 1988. Technique et quantification morphométrique de l'index d'aneuploïdie des tumeurs solides. étude de 70 cas de cancer au sein. *Rev. Fr. Histotechno.*, 1,1,31-34.
- Ledu, C., 1989. Applications de méthodes cytogénétiques aux mollusques bivalves. Mémoire de DTSM Intechmer. 30p.
- Lucas, A., 1971. Les gamètes des mollusques. *Haliotis*, vol 1, N° 2 : 185-214.
- Néant, I. and Guerrier, P., 1988. 6-diméthylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res.* 176 : 68-79.
- Noiret, C., 1991. Induction de la triploïdie chez la palourde européenne *Ruditapes decussatus*. RIDRV-91-17-RA/La Tremblade.
- Sournia, J.C., Amouroux, C., Belliard, J., Cauderon, Y., Duplan, J.M., Naciri, Y. et Novel, G., 1991. Dictionnaire de génétique. Edition du Conseil International de la langue Française . 21 bis, rue du Cardinal Lemoine, 75005 - Paris
- Stanley, J.G., Allen, S.K., Jr. and Hidu, H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 23: 1-10.
- Tabarini, C.L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42 : 151-160.