
Impact de la dissémination accidentelle d'huîtres tétraploïdes : potentiel de dispersion et succès reproducteur



Rapport de fin de contrat entre l'IFREMER et le CNRS
concernant l' appel d'offres 2002 « Impact des
biotechnologies dans les agro-écosystèmes »

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	2
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	6
<u>CROISEMENTS</u>	6
<u>NIVEAU DE PLOÏDIE</u>	7
Par analyse d'image	7
Par cytométrie en flux	8
RÉSULTATS ET DISCUSSION	11
RÉFÉRENCES CITÉES	21
ANNEXE 1. MÉTHODE D'ANALYSE EN CYTOMÉTRIE EN FLUX	22

Cette étude a été soutenue par le programme « Impact des biotechnologies dans les agro-écosystèmes » lors de leur appel d'offres 2002. Les résultats obtenus, ainsi que ceux obtenus dans une étude complémentaire soutenue lors de l'appel d'offres 2001 et intitulée « Impact sociologique des huîtres triploïdes », devraient faire l'objet d'une publication en 2005.

L'ostréiculture française réalise une production très largement extensive, basée sur le recrutement de juvéniles dans le milieu naturel et la production sur des sites côtiers. Ainsi, l'huître est l'une des rares espèces cultivées à être encore considéré par le consommateur comme un produit alimentaire totalement « naturel ». L'utilisation de la polyploïdisation a permis d'ouvrir une nouvelle voie dans cette filière, en permettant d'obtenir des animaux à croissance plus rapide, plus homogènes et stériles. Cette dernière caractéristique est un gage de qualité gustative et permet aussi de positionner ce produit en priorité sur les mois en "r" traditionnellement bannis à cause de la présence de laitance.

Le but principal de la triploïdisation a été atteint: cette biotechnologie a permis de réorienter le flux énergétique vers la croissance somatique et non la reproduction. Avec l'arrivée des tétraploïdes, la production à grande échelle d'huîtres triploïdes est devenue plus facile grâce au croisement de ces animaux avec des animaux diploïdes. Malgré les arguments scientifiques avancés, cette innovation engendre des questions, voire inquiète, et est le sujet d'un débat polémique dans le milieu ostréicole et depuis peu au-delà, dans un contexte actuellement globalement négatif de la perception des biotechnologies.

Le but de notre étude est d'apporter des éléments de réponse aux différents acteurs du débat (pouvoirs publics, chercheurs, ostréiculteurs, et citoyens dans leur ensemble) sur les conséquences pour l'environnement d'échappements de tétraploïdes. Les deux phases de dispersion (gamètes et larves) de cette espèce animale vivant fixée seront abordées par des expériences en milieu contrôlé. La comparaison du potentiel de dispersion des huîtres diploïdes et tétraploïdes permettra d'améliorer les prédictions de l'impact de l'éventuel échappement de tétraploïdes dans les écosystèmes côtiers.

Introduction

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dite "huître japonaise" est l'espèce d'huître majoritairement produite et consommée dans le monde (>95 %, 3 millions de tonnes). En France, elle représente 150.000 t/an, correspondant à un chiffre d'affaires d'environ 3 milliards de francs. Malgré cette importance, la production ostréicole peut être considérée comme « extensive ». Elle repose en effet sur l'exploitation de sites côtiers (les estrans) où les huîtres croissent et se reproduisent dans le milieu naturel. L'ensemble des populations y sont diploïdes. Le travail de l'ostréiculteur consiste en la récolte de juvéniles issus de reproduction spontanée et de leur élevage, sans apport alimentaire ni traitements sanitaires. L'huître est

donc l'une des rares espèces cultivées à être encore considérée par le consommateur comme un produit alimentaire totalement « naturel ». Deux grands bassins français, Arcachon et Marennes-Oléron, présentent les conditions favorables à la reproduction et à la métamorphose de cette huître. Ainsi, cette "récolte" annuelle de jeunes huîtres, appelé naissain, est à la base de l'ensemble des bassins de production français. La maîtrise de la reproduction de cette espèce ayant été acquise au début des années 1970, la production de naissain issu d'écloserie est venue compléter le naissain issu de captage naturel (spécialement les mauvaises années de captage). Ceci a permis d'envisager une amélioration génétique de l'espèce.

La triploïdisation fut une des premières voies d'amélioration envisagée, et a débouché sur des applications commerciales en France dès 1994. En effet, chez les huîtres diploïdes, l'effort de reproduction est prioritaire sur la croissance somatique. Dès le printemps, l'animal monopolise le métabolisme énergétique pour la gamétogénèse induisant ainsi un retard de croissance et une modification des qualités organoleptiques (Héral et Deslous-Paoli, 1983). En période estivale, le poids des gamètes représente 7% de celui de la chair pour une huître de un an, 60% pour celle de 2 ans et 80 % à 3 ans. Or les huîtres sont commercialisées en majorité à 3 ans. Le retard de croissance dû à la gonadogénèse est donc particulièrement important. La réduction de la gonadogénèse par induction de la triploïdie avait donc pour objectif principal de réorienter ce flux énergétique vers la croissance somatique.

Chez les mollusques, les travaux visant à obtenir des triploïdes ont commencé dans le milieu des années 1980 (voir pour une revue Beaumont et Fairbrother, 1991). Chez les huîtres, les recherches ont tout d'abord été menées aux Etats-Unis sur plusieurs espèces dont l'huître américaine, *Crassostrea virginica* (Stanley *et al.*, 1981) et l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Allen et Downing, 1986). En France, les recherches ont été notamment menées par l'Ifremer, grâce à la création de l'écloserie de La Tremblade en 1986. Dans un premier temps, les méthodes de triploïdisation étaient basées sur la rétention d'un globule polaire lors de la méiose par utilisation de diverses substances chimiques. Utilisées commercialement dès 1994, elles présentaient l'inconvénient de ne pas produire 100% d'animaux triploïdes. L'obtention d'huîtres tétraploïdes (Guo et Allen, 1994; et en 1997 en France) a ouvert une nouvelle voie, le croisement de géniteurs tétraploïdes (ceux-ci étant fertiles) et diploïdes donnant une descendance 100% triploïde (Guo *et al.*, 1996) (comme cela est pratiqué chez plusieurs espèces végétales). La production à grande échelle d'huîtres triploïdes est ainsi devenue plus facile. Par crainte des conséquences possibles d'un

échappement dans le milieu naturel, les huîtres tétraploïdes sont maintenues en conditions confinées. Depuis 1999, du sperme d'huîtres tétraploïdes est fourni aux écloséries demandeuses par l'Ifremer, conformément aux directives du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, afin qu'elles réalisent dans leurs installations les croisements avec leurs géniteurs diploïdes pour produire du naissain triploïde.

Le naissain triploïde permet d'allier trois grands avantages :

- un meilleur taux de croissance, donc une commercialisation plus rapide du produit fini. Ce gain en croissance est particulièrement important dans un milieu limité d'un point de vue trophique comme celui de Marennes-Oléron. Les résultats de comparaison sur le terrain mettent en évidence une croissance supérieure de 30 à 40% sur 2 ans des triploïdes par rapport aux diploïdes (Gouletquer *et al.*, 1996). Cela permet, dans certaines conditions de production, de gagner un an sur le cycle d'élevage (Blachier, 2000).
- un produit plus homogène. Ce point provient plus directement de la production en éclosérie qui permet une homogénéité plus grande des lots par rapport aux lots issus du recrutement dans le milieu.
- des animaux stériles. Ceci a pour conséquence une amélioration de la qualité gustative, les sucres n'étant pas remplacés par les lipides qui constituent principalement les gamètes (Allen et Downing, 1991). Certaines huîtres primées au concours agricole à Paris en 2001 étaient des triploïdes. Cette stérilité élargit le marché jusqu'ici réduit aux mois en "r", les triploïdes non laiteuses pouvant être commercialisées tout au long de l'année. De plus, l'impact génétique sur l'environnement de l'élevage en milieu « ouvert » des triploïdes est nul du fait de leur stérilité.

Même si cette production ne représente aujourd'hui qu'une faible part du marché du naissain français, la demande s'intensifie. Cependant, ce produit ne fait pas l'unanimité dans le milieu ostréicole. En effet, le naissain d'éclosérie ayant pour certains une mauvaise image, le développement d'une « filière triploïde », s'appuyant nécessairement sur les écloséries, a mené à une certaine confusion entre les craintes (ou même les ressentiments) envers les triploïdes et celles envers les écloséries. De nombreuses questions se posent dans les rangs des ostréiculteurs mais aussi, plus récemment, des organisations de consommateurs. Les oppositions sont motivées par des craintes, ou des interrogations sur l'impact de ce produit issu des biotechnologies sur l'agro-système ostréicole.

Ainsi, fin 1998, une demande de renseignements avait émané du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche concernant les huîtres polyploïdes: "L'innovation tétraploïde chez les huîtres pose-t-elle des problèmes environnementaux ?". Le rapport remis par l'expert désigné, Bernard Chevassus Haut Louis, directeur de l'AFSSA et généticien à l'INRA, basé sur des simulations, indique que les risques de "pollution" de tétraploïdes dans le milieu sont faibles, même en cas d'échappements importants. Il a alors été décidé de poursuivre le strict respect du confinement des tétraploïdes, et d'obliger à une déclaration des échappements. Il a été également préconisé une surveillance du milieu consistant en une mesure bisannuelle de la fréquences des diploïdes, triploïdes et tétraploïdes dans le milieu (en cours de contractualisation avec notre laboratoire). Les connaissances sont encore limitées, notamment pour ce qui concerne les stades précoces (gamètes et larves) qui sont les seuls stades de dispersion des huîtres, animaux se fixant à la métamorphose. Une étude directe de la dissémination des gamètes des tétraploïdes n'étant ni réalisable ni envisageable (conformément aux exigences des pouvoirs publics) en milieu marin, nous avons proposé et réalisé une approche comparative en milieu confiné entre huîtres diploïdes et tétraploïdes, en réalisant des expériences visant à apprécier :

- au stade pré-zygotique, la compétition gamétique entre huîtres tétraploïdes et diploïdes. Des croisements ont été réalisés entre gamètes de géniteurs diploïdes et tétraploïdes, en faisant varier les proportions de gamètes diploïdes et tétraploïdes. Les descendances de ces croisements ont été analysés afin de déterminer leur niveau de ploïdie par analyse d'image (Gérard *et al.*, 1994), puis en cytométrie en flux.
- au stade post-zygotique, la viabilité relative des larves diploïdes et tétraploïdes. Une population de larves de un jour en mélange à part égale sera constituée et la survie relative des diploïdes et des tétraploïdes sera suivie jusqu'à fixation.

Matériel et Méthodes

Croisements

Des huîtres diploïdes (2n) et tétraploïdes (4n) ont été maturées en circuit ouvert à une température de 20°C pendant deux mois dans l'écloserie de La Tremblade (IFREMER). En 2003, les huîtres les plus mûres (10 diploïdes et 10 tétraploïdes dont la moitié de chaque sexe) ont été choisies pour participer aux croisements, sur la base de la quantité et de la qualité visuelle (forme des ovocytes, motilité des spermatozoïdes) des gamètes. Les rejets de ce circuit d'eau de mer ont été traités à l'ozone afin d'éviter tout échappement de gamètes dans le milieu naturel. Les spermatozoïdes de chaque mâle ont été collectés séparément en scarifiant les gonades. Le sperme a été dilué avec de l'eau de mer filtrée à 1 µm et la concentration en spermatozoïdes a été estimée en utilisant des cellules de Thoma et un système d'analyse d'images (Alcatel) en comptant 10 champs pour chaque lame. Les spermatozoïdes des 5 mâles (respectivement 2n et 4n) ont ensuite été mélangés de façon équilibrée. Les ovocytes de chaque ont été collectés en utilisant la même procédure que pour les mâles mais avec des cellules de Malassez.

Seize croisements différents ont été réalisés entre gamètes 2n et 4n en faisant varier les proportions des différents gamètes et en permettant ainsi différents niveaux de compétition entre eux. Le nombre d'ovocytes a été ajusté à 15000 par croisement et la fertilisation a été réalisée avec un ration de 100 spermatozoïde par ovocyte. Le tableau 1 présente le ratio des différents types de croisements pour les 16 croisements. Deux séries de croisements ont été réalisés : en 2003, ces seize croisements ont été réalisés alors qu'en 2004, ces seize croisements (1 à 16) ont été dupliqués (17 à 32). Par ailleurs, alors qu'en 2003, la ploïdie des géniteurs avait été vérifiées a posteriori, en 2004, cette vérification a été réalisée avant le croisement afin d'éviter des croisements entre des ploïdies non voulues en cas de mélanges de lots, mais aussi celui d'éviter d'utiliser des animaux « mosaïques », c'est-à-dire composés de cellules de ploïdies différentes.

	<i>Mâles</i>	2n (100%)	2n (90%) +	2n (50%) +	2n (10%) +	4n (100%)
<i>Femelles</i>			4n (10%)	4n (50%)	4n (90%)	
2n (100%)	1		2	3	4	5
2n (90%) + 4n (10%)	6					7
2n (50%) + 4n (50%)	8					9
2n (10%) + 4n (90%)	10					11
4n (100%)	12	13	14	15		16

Tableau 1. Plan de croisements indiquant le nom des différents croisements (1 à 16) ainsi que les pourcentages de chaque type de gamètes utilisé.

Après les croisements, les larves ont été élevées à une densité de 10 larves / ml pendant 24 heures dans des bacs d'élevage larvaire de 30 l.

Pour les expérimentations visant à estimer la viabilité relative des larves diploïdes et tétraploïdes, une population de larves de un jour en mélange à part égale a été constituée et a été répliqué dans deux bacs d'élevage. La survie relative des larves diploïdes et tétraploïdes a été suivie tous les deux jours ainsi que la fréquence respective des animaux diploïdes et tétraploïdes dans cette population.

Niveau de ploïdie

Par analyse d'image

Les larves D ont été collectées à un jour, comptées et concentrées dans un tube.

Les niveaux de ploïdie des échantillons ont été estimés par analyse d'image. Cette technique donne la densité optique de noyaux colorés d'après la méthode de Feulgen-Rosalin (Gérard *et al.*, 1994). Par comparaison avec un témoin diploïde, il est ainsi possible de déterminer le pourcentage de noyaux triploïdes et tétraploïdes. Pour chacun des 16 lots résultants des croisements, deux lames ont été réalisées et deux analyses par lame ont été effectuées (avec une moyenne de 200 noyaux à chaque fois).

Par cytométrie en flux

En 2004, grâce à l'achat d'un cytomètre en flux dédié à l'analyse de ploïdie (en grande partie grâce au soutien financier du programme "Impact des biotechnologies sur les agro-écosystèmes"), les analyses de ploïdie ont été rendues plus robustes. En effet, cette technique permet d'analyser un nombre beaucoup plus important de cellules (2000 au lieu de 200 en moyenne). Le protocole classique utilisé pour l'analyse de ploïdie d'huîtres adultes en cytométrie en flux est décrit dans les paragraphes suivants. Il a cependant nécessité des mises au point afin d'étudier des larves âgées de 1 jour (taille de l'organisme et présence de coquille) ce qui explique que nous n'avons pu utiliser cette technique que sur les expérimentations réalisées en 2004 et non en 2003.

Les échantillons sont préparés selon la méthode suivantes (solutions détaillées en Annexe 1). Pour résumer, 1 ml de tampon d'extraction d'ADN coloré au DAPI est ajouté au tissu ainsi qu'un témoin interne le tout étant appelé tampon DAPI. A l'aide d'une micropipette, l'extraction peut être accélérée en effectuant des va-et-vient. La suspension obtenue est ensuite filtrée sur une maille de 100 µm au-dessus d'un tube à analyse puis, 1 ml de tampon DAPI est ajouté sur le filtre afin de le rincer. Cette filtration permet de retenir les fragments de feuillet branchial et de laisser passer que les noyaux des cellules afin de ne pas saturer le cytomètre en flux. Le tube final contient 2 ml de tampon DAPI et les noyaux du fragment de branchie. Une incubation des échantillons à 4°C et durant une demi-heure à l'obscurité est nécessaire avant l'analyse au cytomètre. Ces 3 conditions permettent la fixation du DAPI sur l'ADN.

L'étalonnage du cytomètre est réalisé à l'aide de témoin interne de microbilles. Le réglage du gain permet de centrer le pic unique sur 300 nm. Un tube contenant le témoin interne est passé à chaque début d'utilisation du cytomètre. Ce tube contient 2 ml d'eau bi-distillée et 150 µl de microbilles. Une fois le cytomètre réglé les échantillons peuvent être étudiés.

Chaque échantillon est analysé individuellement et comparé au témoin interne. Un ratio est déterminé à partir de la position moyenne du ou des pic(s) de fluorescence émise par les cellules somatiques des individus mesurés divisé(s) par la position moyenne du pic de fluorescence émise par le témoin interne. L'équipe de l'IFREMER de La Tremblade a mis en évidence que les individus diploïdes présentent un ratio moyen de taille de génome standardisé de 0.27, les animaux triploïdes 0.43, et les animaux tétraploïdes 0.54.

Les résultats obtenus sont donnés sous forme d'histogrammes de fréquences, le logiciel permet d'obtenir une distribution gaussienne de chaque pic. La figure 1 permet d'observer différents pics :

-Le pic 1 représente le pic d'ADN dégradé.

-Le pic 2 représente le pic de fluorescence émise par les cellules somatiques de l'individu.

-Le pic 3 représente le pic de fluorescence émise par les microbilles (témoin interne).

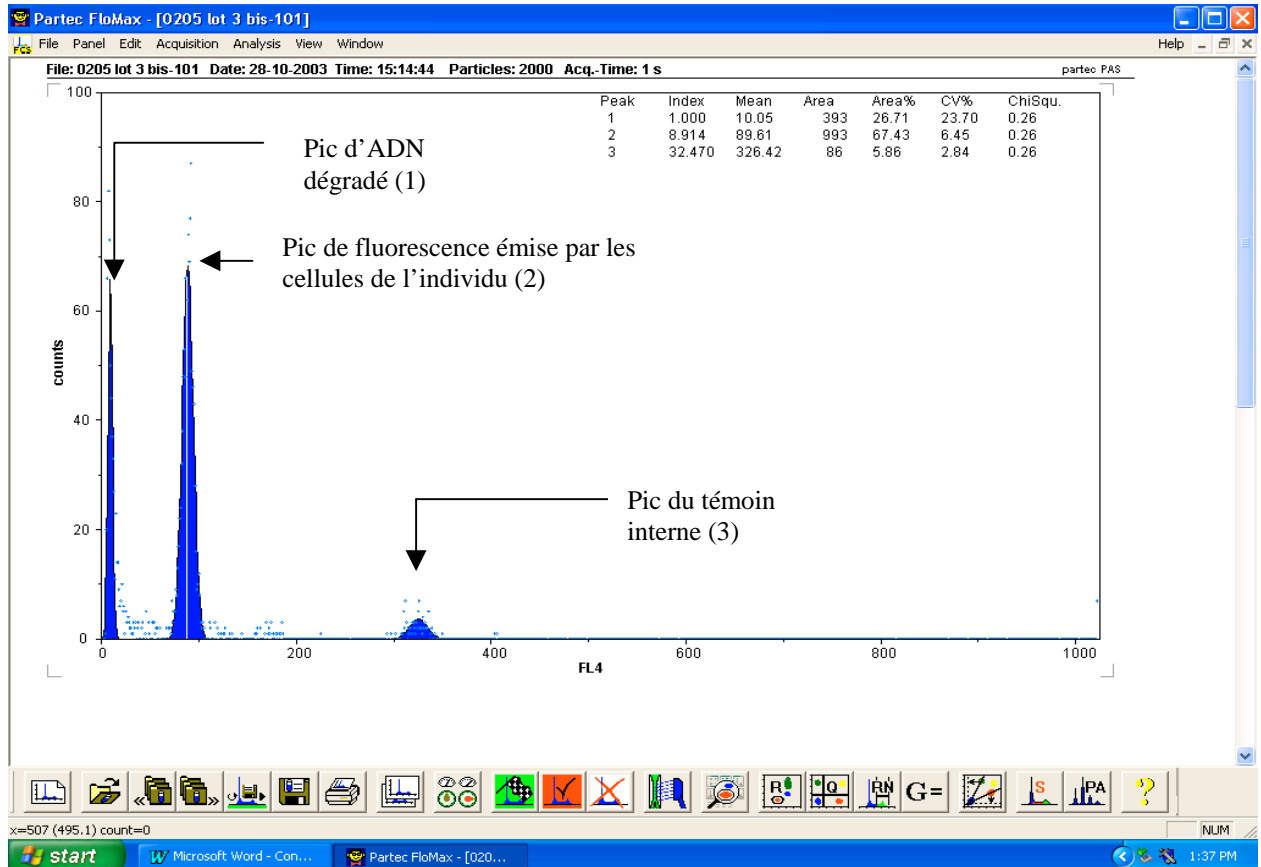


Figure 1. Exemple de résultat brut d'analyse de ploïdie

Explication des termes :

Peak : Numéro du pic (de gauche à droite).

Index : Position relative du pic en relation avec le premier pic.

Mean : Position moyenne des évènements du pic.

Area : Aire du pic, correspondant au nombre de particules appartenant au pic.

Area% : Pourcentage de l'aire du pic relatif de la somme de toutes les aires des pics.

CV% : Coefficient de variation relatif du pic (Largeur du pic).

ChiSqu : Mesure de la variation entre les données expérimentales et le modèle mathématique du pic. Plus le ChiSqu est petit et plus le modèle mathématique se rapproche des données expérimentales.

Résultats et discussion

En se basant sur l'hypothèse que les spermatozoïdes diploïdes et tétraploïdes ont la même capacité à féconder les ovocytes diploïdes et tétraploïdes, le même ratio en ploïdie est attendu dans les larves résultant des fécondations que dans les préparations de mélanges de gamètes (Tableau 2).

<i>Mâles</i>	2n (100%)	2n (90%) +	2n (50%) +	2n (10%) +	4n (100%)
<i>Femelles</i>		4n (10%)	4n (50%)	4n (90%)	
2n (100%)	2n (100%)	2n (90%) +	2n (50%) +	2n (10%) +	3n (100%)
		3n (10%)	3n (50%)	3n (90%)	
2n (90%) +	2n (90%) +				3n (90%) +
4n (10%)	3n (10%)				4n (10%)
2n (50%) +	2n (50%) +				3n (50%) +
4n (50%)	3n (50%)				4n (50%)
2n (10%) +	2n (10%) +				3n (10%) +
4n (90%)	3n (90%)				4n (90%)
4n (100%)	3n (100%)	3n (90%) +	3n (50%) +	3n (10%) +	4n (100%)
		4n (10%)	4n (50%)	4n (90%)	

Tableau 2. Pourcentages de larves des différentes ploïdie attendus dans les 16 croisements

Les résultats obtenus en 2003 en analyse d'image sont présentés dans le tableau 3.

Lot	Pourcentage attendu			Pourcentage observé											
				Lame 1						Lame 2					
	2n 3n 4n			Analyse 1			Analyse 2			Analyse 1			Analyse 2		
				2n	3n	4n	2n	3n	4n	2n	3n	4n	2n	3n	4n
1	100			100			100			100			100		
2	90	10		91	9		73	26		87	13		80	20	
3	50	50		42	58		53	46		49	51		58	42	
4	10	90		23	77		14	86		6	94		10	90	
5		100			100			100			100			100	
6	90	10		100						100			82	18	
7		90	10		94	6		100			89	11		100	
8	50	50		68	32		78	22		80	20		92	8	
9		50	50		71	29		61	39		75	25		70	30
10	10	90		25	75		38	62		20	80		40	60	
11		10	90		24	76		19	81		25	75		39	61
12		100			100			100			100			100	
13		90	10		100			70	30					100	
14		50	50		60	40		57	43		58	42			
15		10	90		34	66		40	60		33	66		30	70
16			100			100			100			100			100

Tableau 3. Pourcentages de ploïdie des différents lots de larves

Les résultats ont été également représentés sous la forme de l'écart par rapport à l'attendu standardisé (Figure 2). Cet écart correspondant à la différence entre les fréquences de larves triploïdes ou tétraploïdes (selon le cas du croisement) observées et attendues,

standardisé (c'est-à-dire divisé) par la fréquence attendue. Les quatre réplicats (L pour lame et A pour Analyse) sont représentés sur cette même figure.

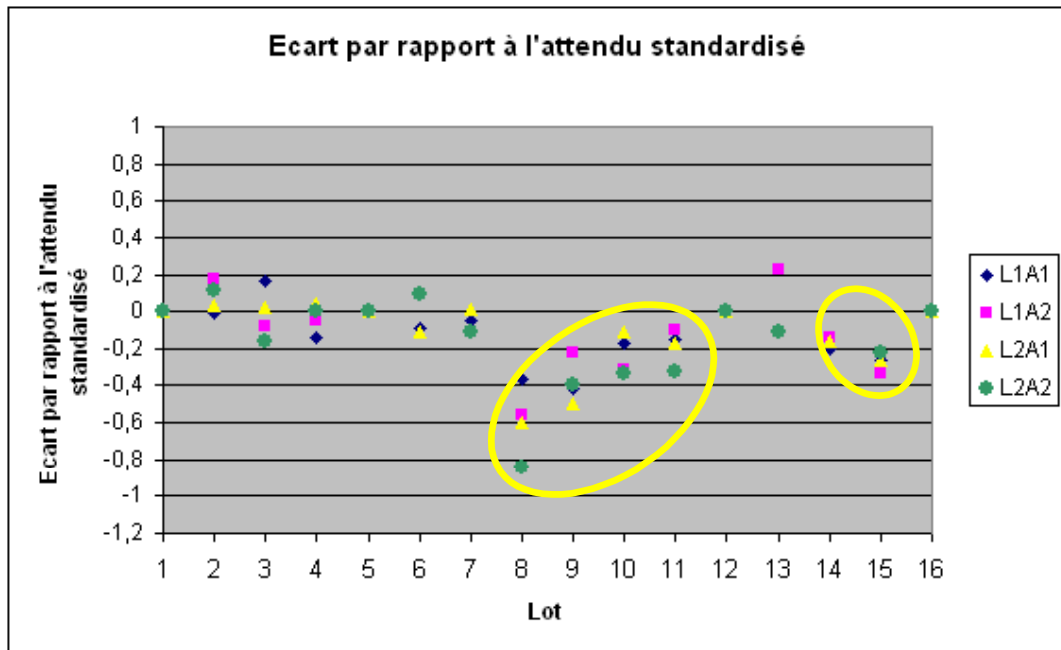


Figure 2. Résultats de ploïdie par rapport à l'attendu en 2003

Les résultats obtenus en 2004 avec deux réplicats sont représentés selon cette même forme dans la figure 3.

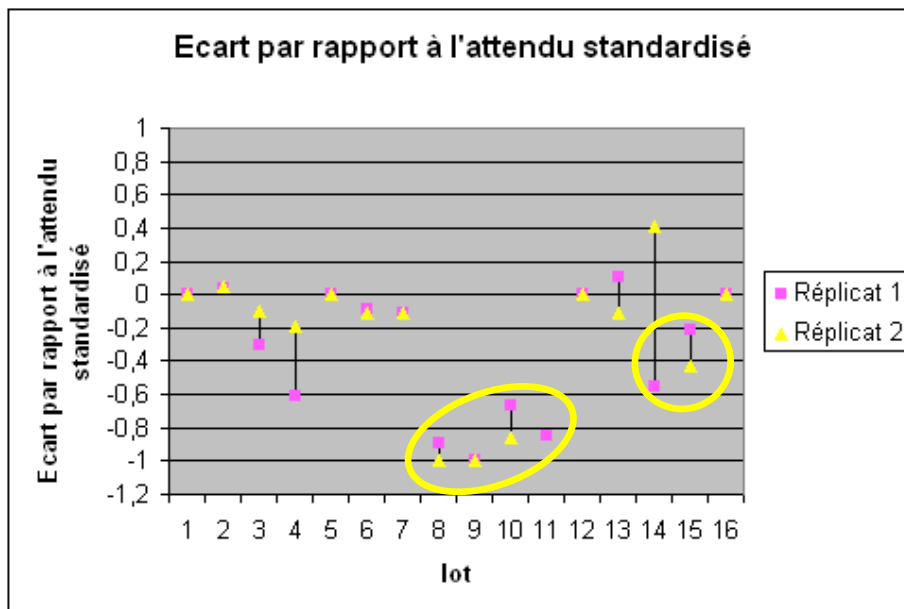


Figure 3. Résultats de ploïdie par rapport à l'attendu en 2004

Ces deux graphiques mettent en évidence le fait que l'on observe des différences par rapport à ce qui est attendu en terme de niveau de ploïdie dans certains croisements. Malheureusement, nous observons également des différences entre des réplicats pour certains lots. Alors que la technique d'analyse est moins robuste en 2003, les différences entre réplicats sont rarement significatives. En revanche, en 2004, deux lots, 4 et 14 montrent des différences significatives entre les deux réplicats certainement à des erreurs techniques ou des conditions d'élevage mal contrôlées.

Les lots présentant le plus d'écart à l'attendu sont les lots 8, 9, 10, et 11 ainsi que 14 et 15 dans une moindre mesure. Ces lots (Figure 4) correspondent à des croisements issus de gamètes femelles tétraploïdes en grande proportion (50% et 90%, lots 8, 9, 10, et 11) mais aussi à des gamètes mâles tétraploïdes en plus grande proportion (50 et 90%, lots 14 et 15). Ceci est vrai pour les deux années d'étude (malgré des réplicats très différents en 2004 pour le lot 14).

	<i>Mâles</i>	2n (100%)	2n (90%) + 4n (10%)	2n (50%) + 4n (50%)	2n (10%) + 4n (90%)	4n (100%)
<i>Femelles</i>						
2n (100%)		1	2	3	4	5
2n (90%) + 4n (10%)		6				7
2n (50%) + 4n (50%)		8				9
2n (10%) + 4n (90%)		10				11
4n (100%)		12	13	14	15	16

Figure 4. Caractéristique en composition gamétique des différents lots

Pour mieux comprendre ces différences, nous avons représenté cet écart à l'attendu en fonction du pourcentage de gamètes tétraploïdes (mâle ou femelle) mis en mélange avec 100% de gamètes (mâles ou femelles) diploïdes ou tétraploïdes (Figure 5).

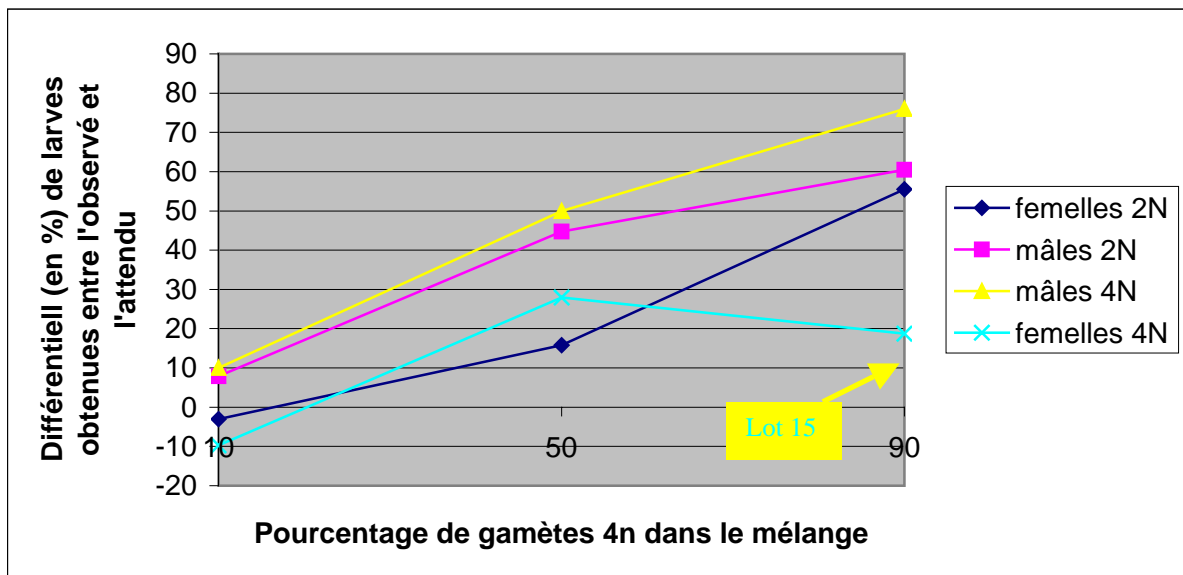


Figure 5. Ecart à l'attendu en fonction du pourcentage de gamètes 4N utilisés dans les croisements

Ce graphique montre tout d'abord que l'écart par rapport à l'attendu augmente avec le pourcentage de gamètes 4n utilisé (4 courbes globalement croissantes). De plus, les courbes (jaunes et rose) représentant les croisements avec 100% de gamètes mâles 2n et 4n sont nettement au-dessus des deux autres. Ces lots impliquant des femelles 4n en proportions variées (10, 50 et 90) montrent plus d'écart par rapport à l'attendu, et donc un déficit de larves triploïdes par rapport à diploïdes ou tétraploïdes par rapport à triploïdes selon les cas. Il semble donc que la qualité de ces gamètes femelles puisse être mise en cause. Le cas du lot 15 est particulièrement intéressant puisqu'il correspond à une fécondation entre 100% d'ovocytes 4n avec 90% de spermatozoïdes 4n. L'écart apparaît moins important que ce à quoi on pouvait s'attendre (courbe bleue claire « cassée »). Il est à comparer avec l'écart par rapport à l'attendu beaucoup plus important observé pour le lot 4, obtenu à partir d'une fécondation de 100% d'ovocytes 2n par 90% de spermatozoïdes 4n (point bleu foncé sur la même verticale). Il semblerait donc que la fécondation soit meilleure entre gamètes tétraploïdes, indiquant ainsi peut-être qu'il est plus facile à un spermatozoïde 4n de pénétrer et/ou féconder un ovocyte 4n au cytoplasme plus important qu'un ovocyte 2n.

La qualité des gamètes 4n femelles est clairement mise en cause si l'on s'intéresse au taux d'éclosion des différents lots en fonction du pourcentage d'ovocytes 4n impliqués (Figure 6).

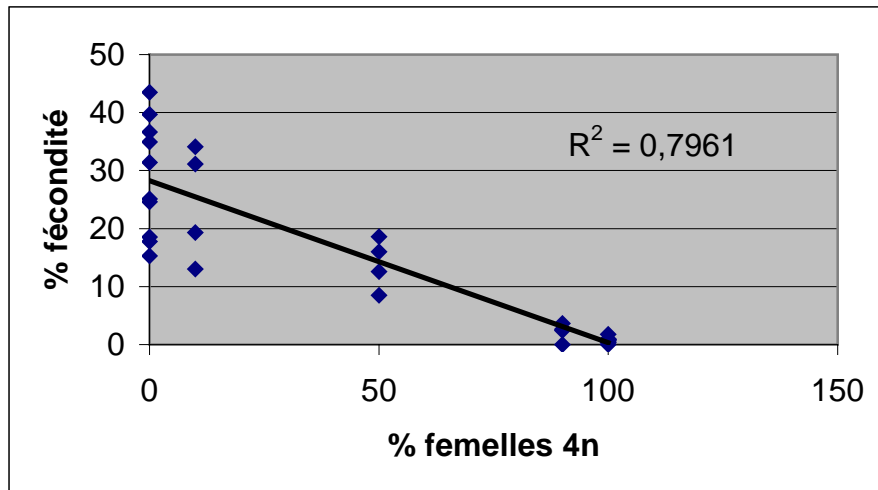


Figure 6. Régression linéaire en taux d'éclosion et pourcentage de femelles 4n impliquées

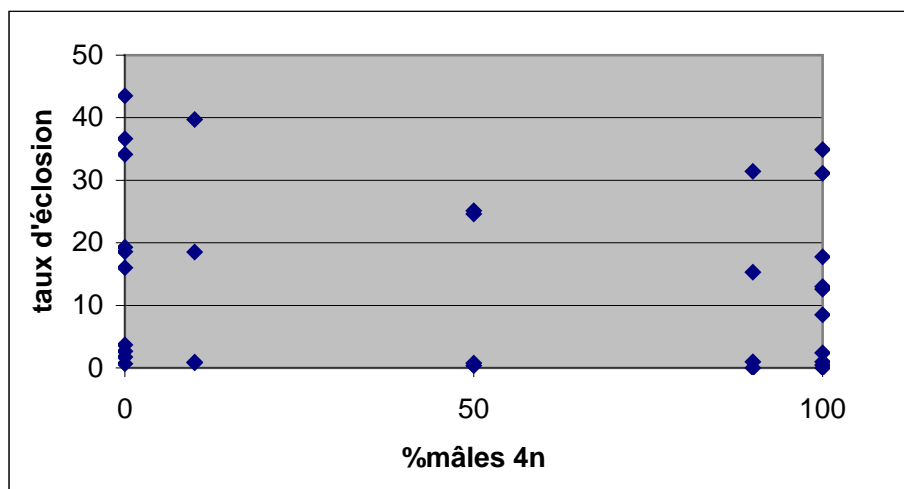


Figure 7. Régression linéaire en taux d'éclosion et pourcentage de mâles 4n impliquées

Ce n'est pas du tout le cas pour la qualité des gamètes mâles 4n (Figure 7) pour laquelle aucune corrélation n'a pu être mise en évidence.

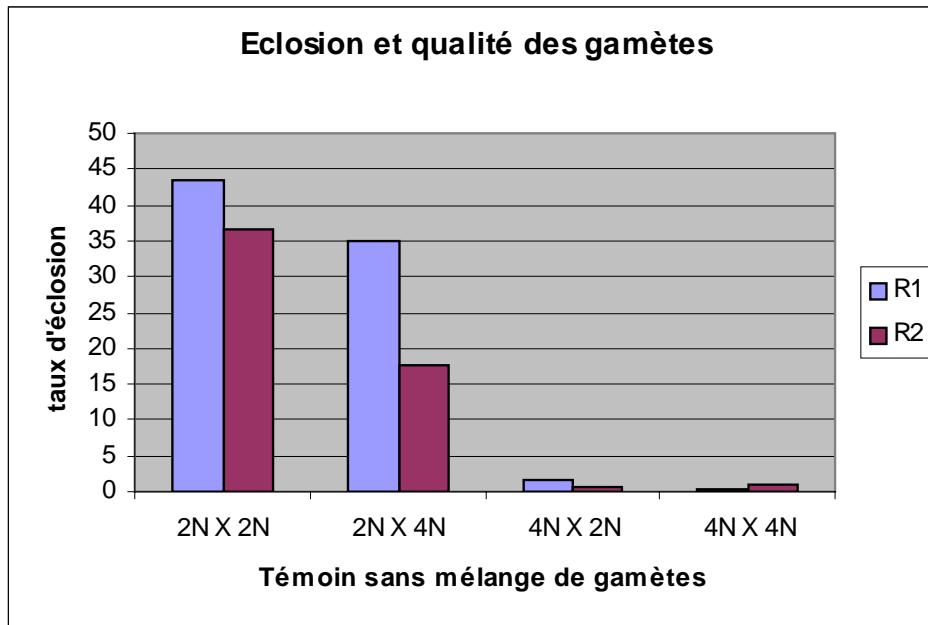


Figure 8. Taux d'éclosion dans les lots sans mélange
(les femelles sont indiquées en premier dans l'écriture des croisements)

Ceci est confirmé par les taux d'éclosion des lots sans mélange où les lots avec 100% de gamètes femelles 4n fécondés avec des spermatozoïdes 100% 2n ou bien 100% 4n ont un taux d'éclosion particulièrement faible. Les deux autres types de lots (avec 100% de gamètes femelles 2n) montrent des taux d'éclosion rencontrés classiquement.

Les observations microscopiques réalisées lors de ces expérimentations montrent bien que les ovocytes 4n ont souvent des parois abîmées d'où s'échappe du cytoplasme (Figure 9A), au contraire des ovocytes 2n (Figure 9B).



Figure 9A. Ovocytes d'huîtres 4n après maturation en 2004

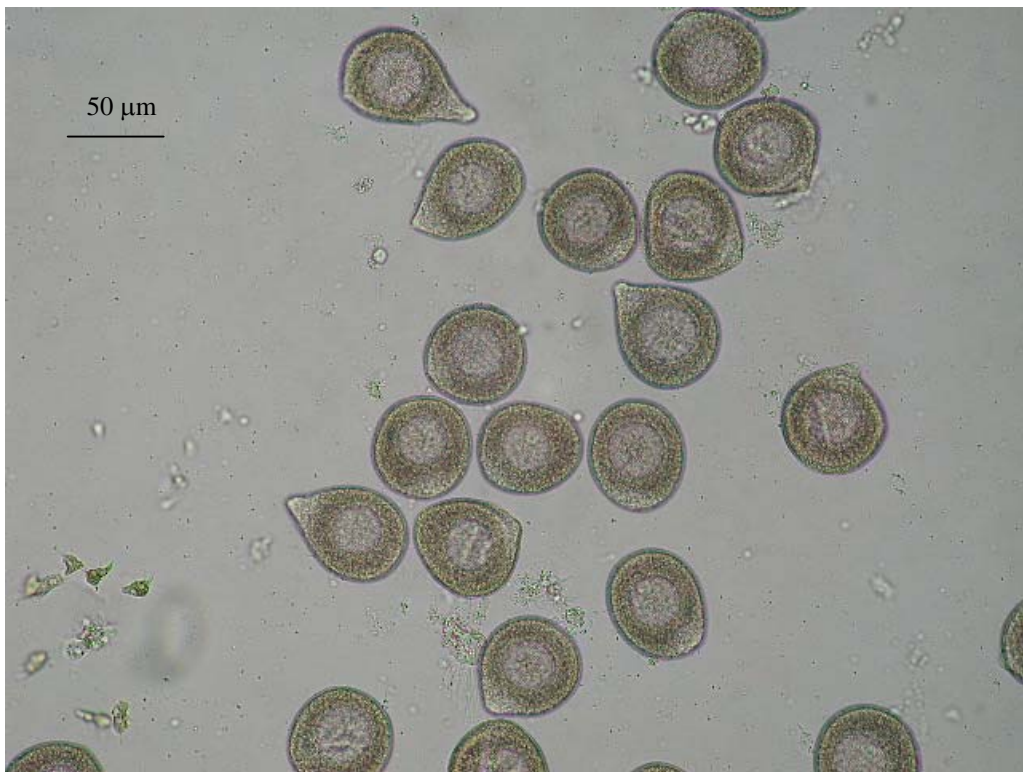


Figure 9B. Ovocytes d'huîtres 2n après maturation en 2004

Les résultats obtenus en compétition au niveau larvaire sont ainsi une conséquence de la mauvaise qualité des gamètes femelles utilisés (Figure 10). Ainsi, malgré plusieurs essais de croisements réalisés en 2003 et 2004, les meilleurs résultats obtenus correspondent à ceux de cette figure, c'est-à-dire une disparition (mort) des larves 4n dans le mélange dès le 12^{ième} jour d'élevage larvaire.

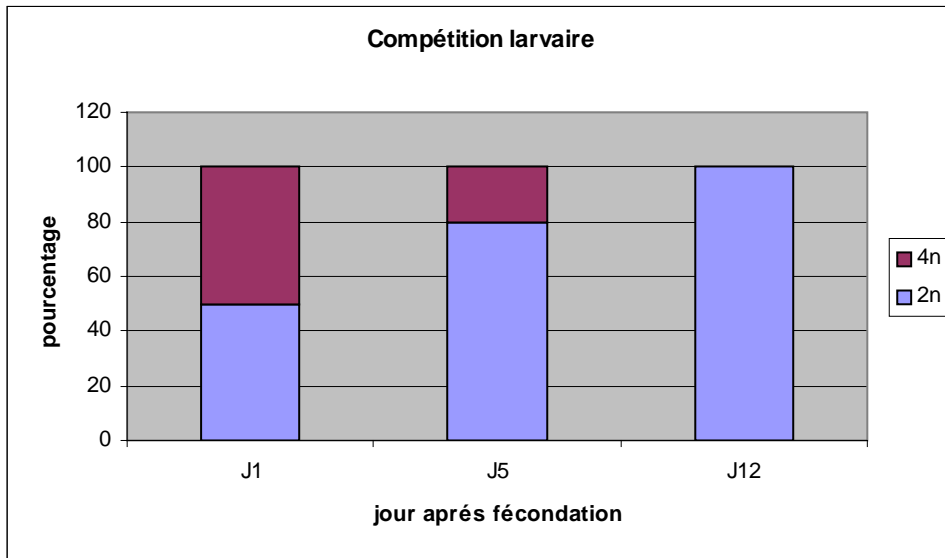


Figure 10. Evolution de la proportion de larves 2n et 4n au cours du temps

En 2004, tous les animaux avaient été maturés dans les mêmes conditions, c'est-à-dire des conditions non optimales car avec un renouvellement d'eau faible (à cause de la nécessité de traiter les eaux de rejet) malgré une augmentation de la température. Dans ces conditions, seules les huîtres tétraploïdes semblent réaliser une mauvaise maturation et donner des gamètes femelles de mauvaise qualité. Cette observation accompagne un ensemble d'observations réalisées en éclosion montrant une certaine fragilité de ces animaux par rapport aux huîtres diploïdes. Ainsi, une plus grande mortalité est généralement observée chez les huîtres tétraploïdes, mais aussi parfois une « réversion » de ploïdie de certaines cellules aboutissant à des animaux mosaïques ou bien des pertes chromosomiques dans des descendances de croisements entre tétraploïdes (McCombie et al., 2005). Même si tout ceci laisse à penser que ces animaux ont une « fitness » plus faible que les diploïdes, aucune certitude ne peut être acquise quant à leur comportement dans le milieu naturel.

Cette étude ouvre de nouvelles portes de recherche sur les premiers stades de développement embryonnaire afin d'observer comment se réalisent les croisements entre $2N$ et $4N$ et définir s'il existe des préférentiels lors de la fécondation entre animaux de même ploïdie par exemple à cause d'encombrement spatial dans les cytoplames. Par ailleurs, les expérimentations qui n'ont pu être menées sur la viabilité relative des gamètes après leur libération dans l'eau de mer (phase de dispersion gamétique) seront réalisées en estimant les pourcentages de fécondation, en croisements $2n \times 2n$, $2n \times 4n$ et $4n \times 4n$, au fonction du temps après libération des gamètes dans l'eau.

Enfin, il reste évident que, malgré le moins bon comportement de ces animaux tétraploïdes et de leurs descendants en éclosure, le principe de précaution fixé par nos ministères de tutelle consistant en un strict confinement de ces animaux en milieu totalement contrôlé reste appliqué par l'IFREMER pour ses recherches et les implications avec la filière ostréicole.

Références citées

- Allen S.K., 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., Downing S.L., 1991. Consumers and "experts" alike prefer the taste of sterile triploid over gravid diploid pacific oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793).
- Beaumont A.R., Fairbrother J.E., 1991. Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J. Shellfish Res.*, 1, 1-18.
- Blachier P., 2000. Atelier ostréicole en mer - Elevage d'huîtres di et triploïdes à Marennes-Oléron, Itinéraires zootechniques. Rapport annuel du Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA).
- Gérard, A., Naciri, Y., Peignon, J-M., Ledu, C., Phelipot, P. Noiret, C., Peudenier, I., Grizel, H. (1994). Image analysis: a new method for estimating triploidy in commercial bivalves. *Aquacult Fish Manage* 25:697-708.
- Gouletquer P., Joly J.-P., Gérard A., Le Gagneur E., Moriceau J., Peignon J.-M., Heurtebise S., Phelipot P., 1996. Performance of triploid pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem : survival, growth and proximate biochemical composition. *Haliotis*, 25, 1-12.
- Guo X.M., Allen S.K., 1994. Viable tetraploids in the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibiting polar body I in eggs from triploids. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3, 42-50.
- Guo X., DeBross G.A., Allen S.K., 1996. All-triploid pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture*, 142, 149-161.
- Héral M., Deslous-Paoli J.-M., 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesures microcalorimétriques et dosages biochimiques. *Oceanol. Acta*, 6(2), 193-199.
- H. McCombie, S. Lapègue, F. Cornette, C. Ledu, P. Boudry, 2005. Chromosome loss in biparental progenies of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Accepté dans *Aquaculture*.
- Stanley J.G., Allen S.K.Jr, Hidu H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 23, 1-10.

Annexe 1. Méthode d'analyse en cytométrie en flux

Le tampon d'extraction contient pour 1 litre :

5g de chlorure de sodium (NaCl). Il sert à casser la membrane plasmique des cellules.

0,939g de Triton X-100 (C₃₄H₆₂O₁₁). C'est un surfactant non ionique largement utilisé pour recouvrir les composants de la membrane cellulaire.

12,11 g de trizmabase (C₄H₁₁NO₃ Tris[hydroxyméthyl]aminométhane). Il sert à tamponner le milieu réactionnel.

1,07 g de chlorure de magnésium hexahydraté (MgCl₂, 6H₂O). Il interagit avec les charges négatives de la chaîne d'ADN limitant ainsi les forces de répulsion entre les brins d'ADN et de ce fait, stabilise la chaîne d'ADN.

Le pH est ajusté à 7 avec de l'acide chlorhydrique (HCl).

Le DAPI :

La solution de DAPI est préparée à partir de 1 mg de DAPI dans 10 ml d'eau bidistillée et conservée à -20°C. Des aliquots de 500µl sont préparés au préalable.

Le témoin interne :

La présence d'un contrôle interne est fondamentale pour étalonner le système car il comporte une fluorescence connue de référence, ici, nous utilisons des microbilles qui fluorescent à 300nm.

La solution du témoin interne contient 1 goutte de microbilles (Partec GmbH calibration beads, catalogue number 05-4020) dans 14 ml d'eau bi-distillée.