

Rapport de stage

ETUDE DE L'INDUCTION DE LA TRIPLOÏDIE CHEZ LES
MOLLUSQUES BIVALVES



Claire
CORNILLIER
Septembre
1992

Maître de Stage : André GERARD

Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie
Ronce les Bains, BP 133
17 390 La Tremblade



SOMMAIRE

1. -INTRODUCTION	2
2. -PROGRAMME DE CYTOGENETIQUE.....	5
2.1. -Objectifs.....	5
2.2. -Enjeux socio-économiques et scientifiques.....	5
2.3. -Bases scientifiques.....	5
2.4. -Programme	6
2.5. -Partenaires et coopérations internationales	6
3. -MATERIELS ET METHODES	8
3.1. -Production de phytoplancton	8
3.2. -Origine,maintien et maturation des géniteurs.....	8
3.3. -Ponte	8
3.3.1. -Stimulation des géniteurs.....	9
3.3.2. -Prélèvement des gamètes	9
3.4. -Induction de la triploïdie	9
3.4.1. -Principe	9
3.4.2. -Traitement à la cytochalasine B	12
3.4.3. -Traitement au 6-DMAP	12
3.5. -Contrôle et détermination de la ploïdie	15
3.5.1. -Par caryologie	15
3.5.2. -Par imagerie numérique	15
3.6. -Elevage larvaire	16
3.7. -Micronurserie	21
3.8. -Contrôle des performances biologiques en milieu naturel et en laboratoire.....	21
4. -DEROULEMENT DU PROGRAMME	23
4.1. -Résultats sur l'induction de la triploïdie	23
4.2. Résultats du contrôle de performance.....	23
4.2.1. Evolution des paramètres biométriques	26
4.2.2. Evolution des paramètres biochimiques.....	26
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	31

BIBLIOGRAPHIE

1. -INTRODUCTION

Sur le littoral charentais, la conchyliculture revêt une importance considérable avec deux grands bassins, le bassin ostréicole de Marennes Oléron et le bassin mytilicole de la baie d'Aiguillons.

La région produit chaque année en moyenne près de 40000t d'huîtres, 8000t de moules et 200t de palourdes. Le chiffre d'affaire à l'exportation dépasse le milliard de francs. Cette activité génère en Charente Maritime plus de 10000 emplois directs permanents. Ainsi par son chiffre d'affaire et le nombre d'emplois qu'elle crée, la conchyliculture occupe la première place du secteur primaire de la Charente Maritime.

D'autre part, si sur les zones découvrantes les possibilités d'extension sont faibles, les marais sont eux actuellement sous exploités.

C'est dans le cadre du maintien, de l'amélioration, et du développement de l'activité conchylicole que la station d'IFREMER de La Tremblade trouve toute sa place.

Cette station dispose de 4 unités de recherche:

- l'Unité de Recherche sur les Ecosystèmes Aquacoles (UREA),
- l'Unité de Recherche Régionale en Aquaculture (URRA),
- l'Unité de Recherche en Pathologie, Immunologie et Génétique Moléculaire (URPIGM),
- l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion (URGE)

Ces 4 unités de recherche sont regroupées en une structure unique, le Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Invertébrés Marins (LBEIM).

Le stage a été effectué dans l'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion.

L'équipe de cette unité est constituée de :

- - 2 cadres : André GERARD et Yamama NACIRI,
- - 3 techniciens : Jean-Marie PEIGNON, Pascal PHELIPOT et Christophe LEDU,
- - 1/3 secrétaire : Yvette SIMIAN,
- - 1/2 entretien des locaux et gestion des achats : Ginette CAILLETEAU,

- - 1/3 comptable : Martine GRASSET,
- - 1/4 documentaliste : Yvonne FAVINO.

L'écloserie comprend:

- - 1200 m² de bâtiment aquacole divisé en 6 salles, une salle d'algues dans laquelle est produit le phytoplancton, une salle de maturation, une salle d'élevage larvaire, une salle de micro-nurserie, une salle de quarantaine, un laboratoire, une pièce d'informatique et une serre,
- - 22 points de pompage,
- - 1 station de stérilisation des eaux de rejet (schéma écloserie IFREMER de La Tremblade).

Le Développement des recherches dans le domaine de la génétique quantitative et de la cytogénétique des mollusques bivalves doit surtout viser l'obtention de méthodes et de produits présentant des caractéristiques intéressantes pour la profession conchylicole. L'objectif au niveau socio-économique est de contribuer à l'émergence de nouveaux pôles productifs créateurs ou stabilisateurs d'emplois. Les principaux objectifs sont l'obtention de souches résistantes aux maladies, la création de lignées ou de souches présentant de meilleures performances de croissance et de qualité de chair, l'acclimatation de nouvelles espèces et l'hybridation pour limiter les risques liés à la monoculture. Pour essayer de répondre à ces objectifs les programmes actuels de l'unité sont:

- sélection de souches d'huître plate résistantes aux parasitoses,
- obtention de lignées pures et recherche de marqueurs génétiques,
- introduction d'espèces nouvelles et hybridation,
- polyploïdisation des principales espèces commerciales.

Le sujet de stage, étude de l'induction de la triploïdie chez les mollusques bivalves, s'inscrit dans le programme de cytogénétique de polyploïdisation.

ECLOSERIE IFREMER DE LA TREMBLADE

**BASSINS DE
STOCKAGE DE 300 m³**

**BUREAUX ET
LABORATOIRES**

**CIRCUIT
HYDRAULIQUE
23 POMPES**

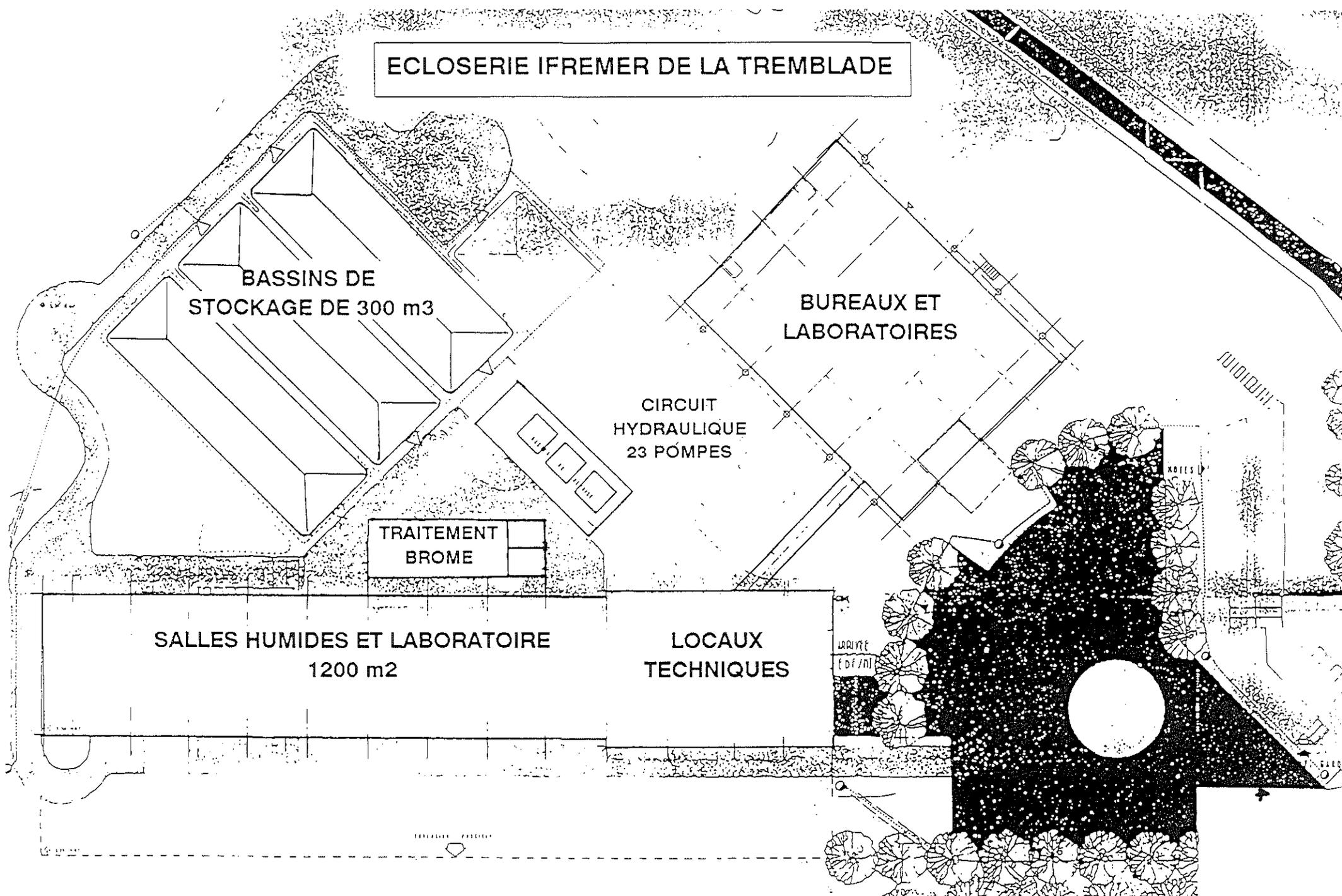
**TRAITEMENT
BROME**

**SALLES HUMIDES ET LABORATOIRE
1200 m²**

**LOCAUX
TECHNIQUES**

**LAVIÈRE
(60 l/m)**

NOTES



2. -PROGRAMME DE CYTOGENETIQUE (FIG 1)

2.1. -Objectifs

Les essais d'obtention de souches conchyoles performantes par polyploïdisation portent sur les principales espèces françaises d'intérêt commercial : (anonymes, 1992)

- *Crassostrea gigas* (l'huître creuse),
- *Ostrea edulis* (l'huître plate),
- *Ruditapes philippinarum* (la palourde du pacifique),
- *Ruditapes decussatus* (la palourde autochtone).

2.2. -Enjeux socio-économiques et scientifiques

L'application des techniques génétiques de polyploïdisation aux mollusques bivalves d'élevages est susceptible, par l'intermédiaire des écloséries, de déboucher sur la production de populations stériles qui pourraient avoir pour avantage:

- d'améliorer les rendements (croissance et qualité),
- de mieux contrôler les risques de développement d'épizootie (populations plus résistantes aux stress),
- de permettre une commercialisation des produits conchyliques tout au long de l'année,
- d'être un facteur de rentabilité pour les écloséries de bivalves.

2.3. -Bases scientifiques

L'effort de reproduction chez les mollusques bivalves est prioritaire sur la croissance somatique, il monopolise le métabolisme énergétique dès le printemps pour la gamétogénèse induisant un retard de croissance et une modification des qualités organoleptiques de la chair (chute du taux de glycogène). Il est notamment responsable d'une perte d'énergie de 63% chez l'huître *Crassostrea gigas* âgées de 2 ans (Héral et Deslous-Paoli, 1983).

La triploïdisation est une des premières techniques de cytogénétique à déboucher sur des applications aquacoles, surtout dans le domaine piscicole (Chevassus et al., 1984). Chez les

mollusques, les recherches ont surtout été menées aux Etats Unis sur plusieurs espèces : *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Argopecten irradians*, *Haliotis discus*. Ces expériences ont mis en évidence, notamment chez *Crassostrea gigas* (Allen et Downing, 1986), une stérilité partielle des individus triploïdes accompagnée d'une amélioration des performances de croissance et des taux de survie supérieurs que ces auteurs interprètent comme étant une conséquence d'une meilleure condition physiologique que leur confèrent leurs abondantes réserves glucidiques.

2.4. -Programme

Le programme se déroule en 3 étapes:

- mise au point de techniques de triploïdisation appliquées aux principales espèces d'intérêt commercial,
- production de populations diploïdes et triploïdes en vue du contrôle de leurs performances,
- contrôle des performances biologiques des différentes populations dans les eaux littorales françaises et en laboratoire.

2.5. -Partenaires et coopérations internationales

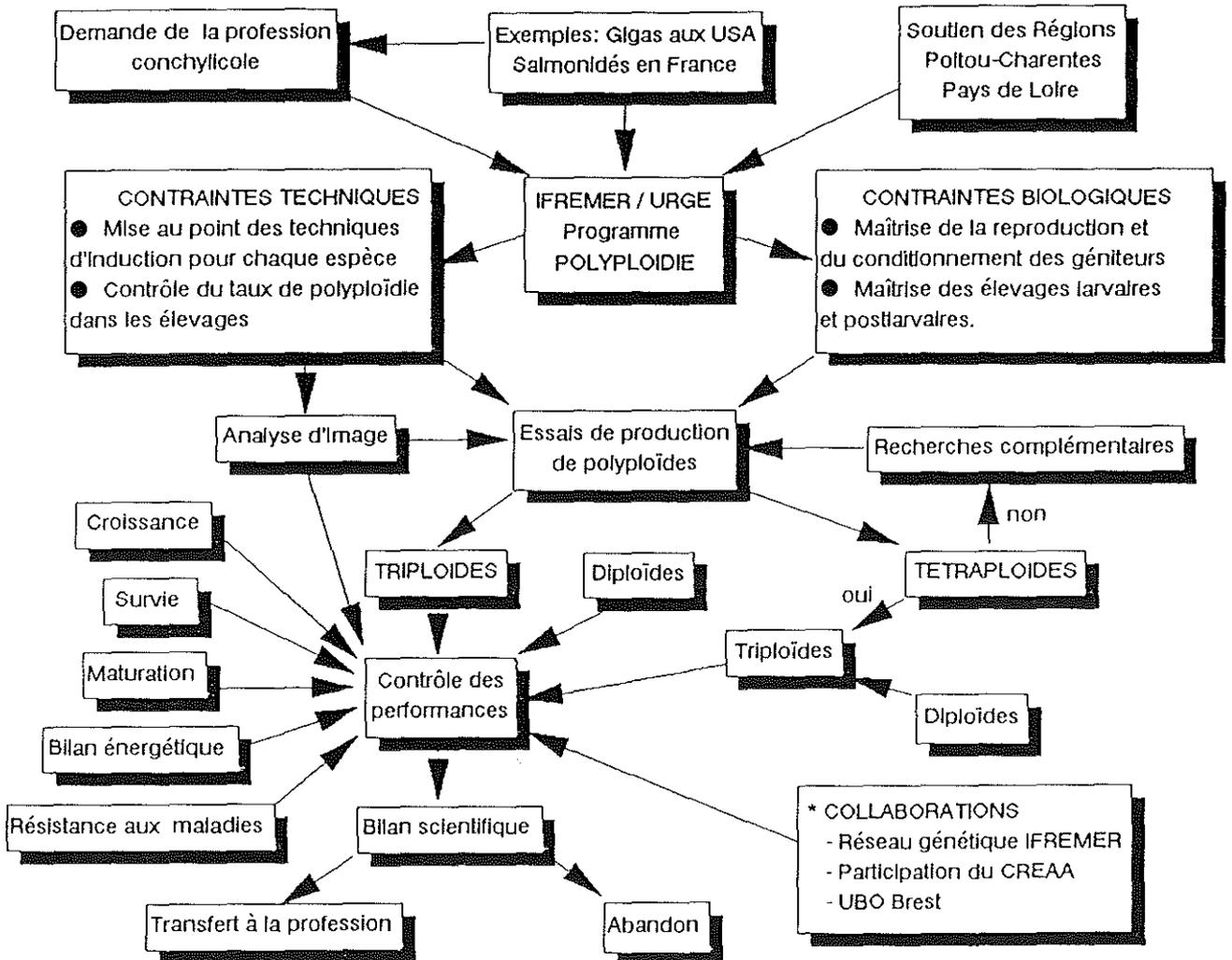
Les partenaires sont:

- le réseau génétique IFREMER,
- CNRS-ENSL,

Des coopérations internationales sont actuellement développées avec:

- Plymouth Marine Laboratory (Angleterre),
- Centre Océanographique de Rimouski (Canada),
- Institute of Marine and Coastal Science (Etats-Unis),
- Université de Grenade (Andalousie).

fig.1: PROGRAMME DE CYTOGENETIQUE



3. -MATERIELS ET METHODES

3.1. -Production de phytoplancton

Le phytoplancton, aliment des mollusques, conditionne, tant sur le plan quantitatif que qualitatif, la croissance et la survie des élevages. Il est produit sur place, à partir de cultures monospécifiques d'algues unicellulaires sur milieu de Conway (Walne, 1974), selon la méthode classique : culture aseptique des souches en erlenmeyers de 500ml; ensemencements successifs de 2, 10, 20, 300 litres, dans lesquels sont atteintes, en 5 jours environ, les concentrations souhaitées, entre 5 et 20 millions de cellules par ml selon espèce considérées. L'eau utilisée est pompée à 100m de profondeur. Elle présente les caractéristiques chimiques de l'eau de mer. De plus, elle est limpide, aseptique, et de qualité constante. Elle est, en revanche, riche en fer, on emploie donc de l'eau de mer pour la production d'algues destinée à l'élevage larvaire. Les principales souches utilisées sont:

- *Skeletonema costatum*,
- *Chaetoceros calcitrans* (clône pumilum),
- *Pavlova lutheri*,
- *Isochrysis sp.*,
- *Tetraselmis suecica*.

3.2. -Origine,maintien et maturation des géniteurs

La période naturelle de reproduction, juin-juillet-août, étant trop courte pour les travaux de recherche effectués dans l'écloserie, les géniteurs, fournis par des exploitations locales, sont prélevés dès le mois de février dans le milieu naturel. Ils subissent une maturation artificiellement dans de l'eau de mer renouvelée, à 22°C, enrichie en phytoplancton et sont nettoyés quotidiennement, pendant une durée minimale d'1 mois.

3.3. -Ponte

L'objectif est de réaliser une fécondation contrôlée (fécondation au moment voulu, concentration connue des différentes gamètes pour effectuer des rapports spermatozoïdes/ovules

précis, vérification de l'état des gamètes...). Pour obtenir des gamètes, 2 méthodes actuellement sont utilisées (planche photo I).

3.3.1. -Stimulation des géniteurs

Des stress physiques (variations thermiques, mise à sec, augmentation de turbidité...) ou chimiques (variation de pH, de salinité, injection de KCl...) réalisés sur les géniteurs peuvent induire l'émission des gamètes. La ponte intervient 1 à 4h après les premiers chocs. Les ovules et les spermatozoïdes sont récoltés séparément, et filtrés sur tamis, afin d'éviter des fécondations incontrôlées et d'éliminer des impuretés.

3.3.2. -Prélèvement des gamètes

La deuxième méthode, dite de "stripping", consiste à scarifier la gonade des animaux à l'aide d'un scalpel. Elle a pour avantage de supprimer la phase de stimulation de la ponte et celle d'attente d'expulsion des gamètes, et qui permet d'obtenir des ovules parfaitement matures à un stade d'évolution méiotique bien synchrone et avec l'assurance d'une absence totale de fécondations incontrôlées. Elle a pour inconvénient de sacrifier les géniteurs et donc d'en nécessiter un stock important. Il faut noter que, d'autre part, cette technique est impossible à réaliser chez les espèces larvipares comme *Ostrea edulis*.

3.4. -Induction de la triploïdie

3.4.1. -Principe

Un individu est triploïde lorsqu'il possède 3N chromosomes. Chez les mollusques, les ovocytes sont bloqués en prophase ou métaphase de la première division méiotique. L'achèvement de la méiose, qui se concrétise par l'expulsion de 2 globules polaires, ne peut être provoquée que par la pénétration d'un spermatozoïde (planche photo II).

PLANCHE PHOTO I

1- Spermatozoïdes.

2- Ovules non fécondés à vésicule germinative (VG) centrale visible.

3- Expulsion d'un globule polaire (GP) après fécondation.

4- Formation du lobe polaire (début du stade 2 cellules).

5- Stade 2 cellules.

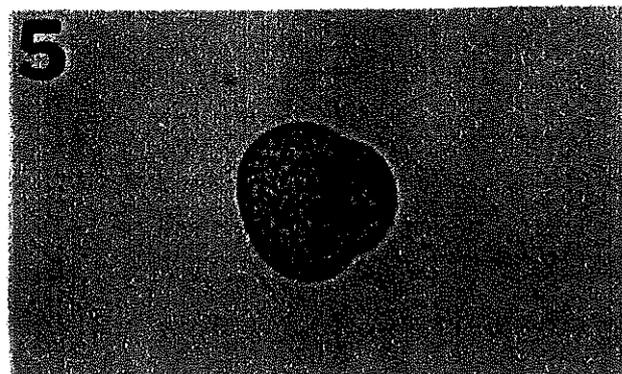
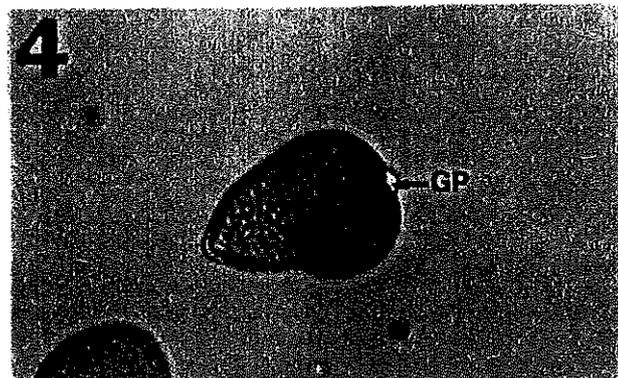
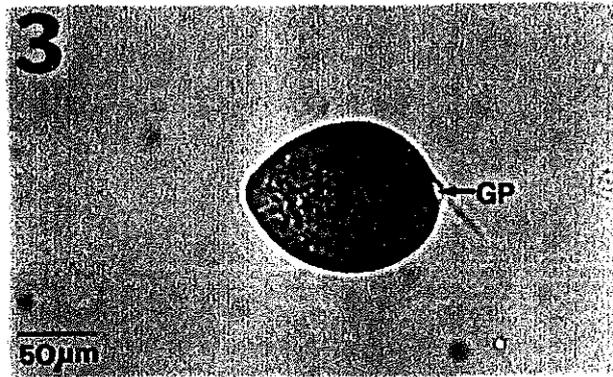
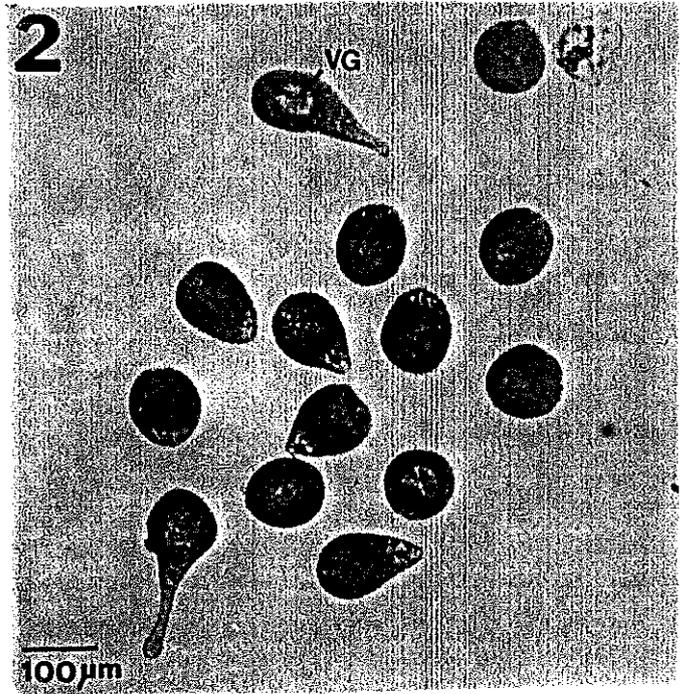
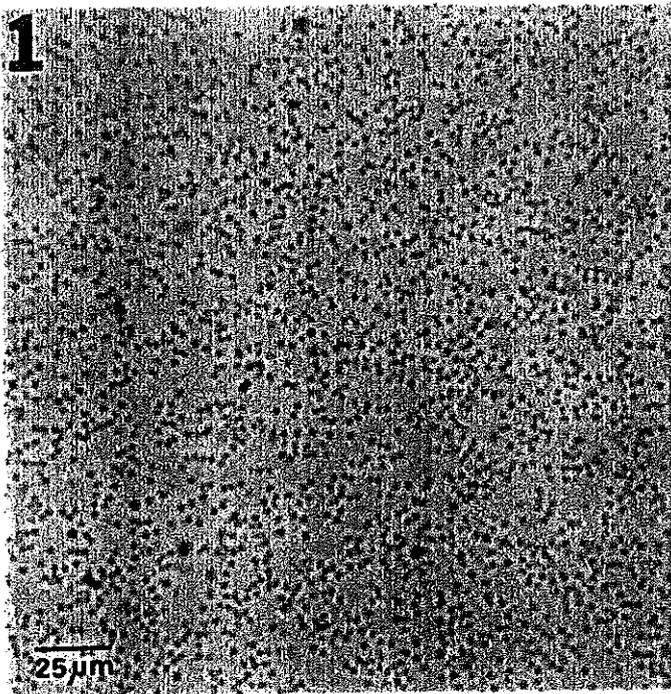


PLANCHE PHOTO II

1- Ovule non fécondé.

2- Ovule fécondé (présence d'un spermatozoïde SPZ).

3- Condensation du génome maternelle.

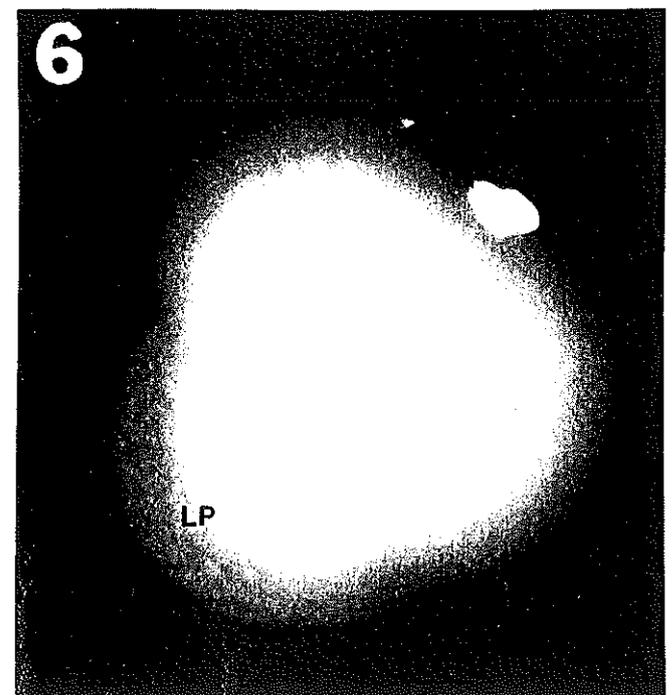
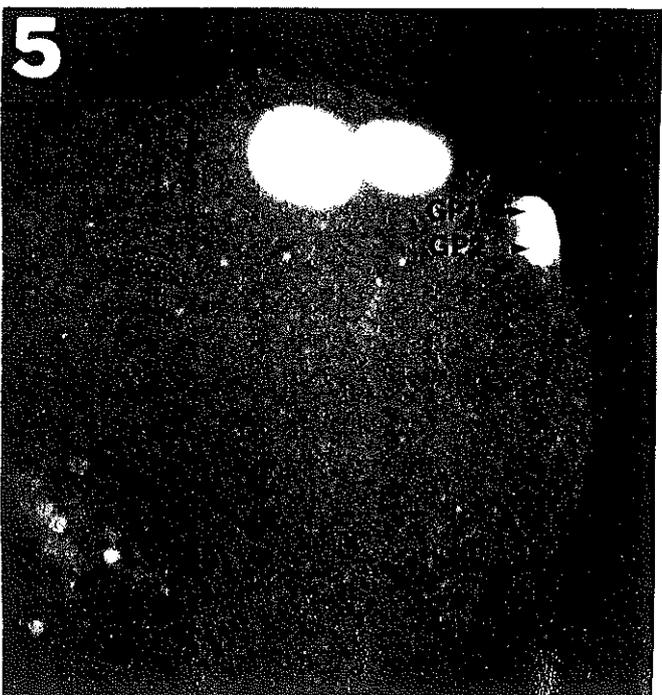
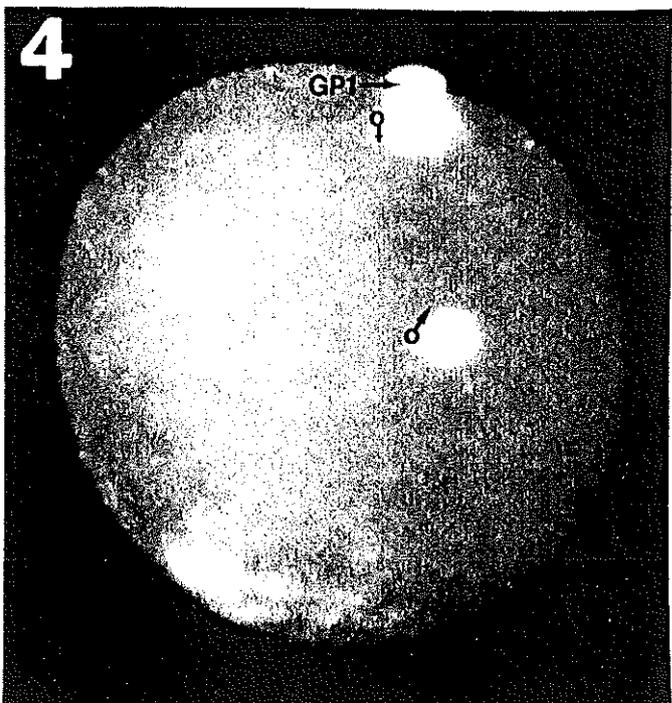
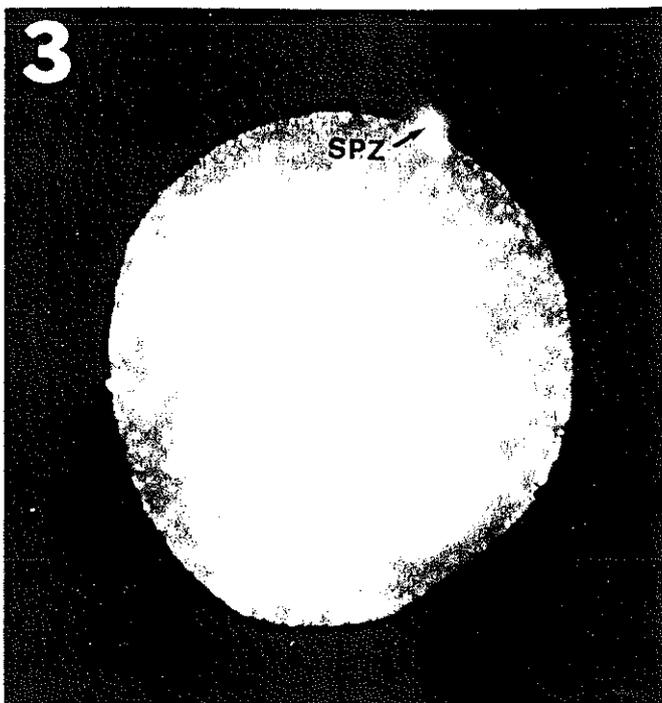
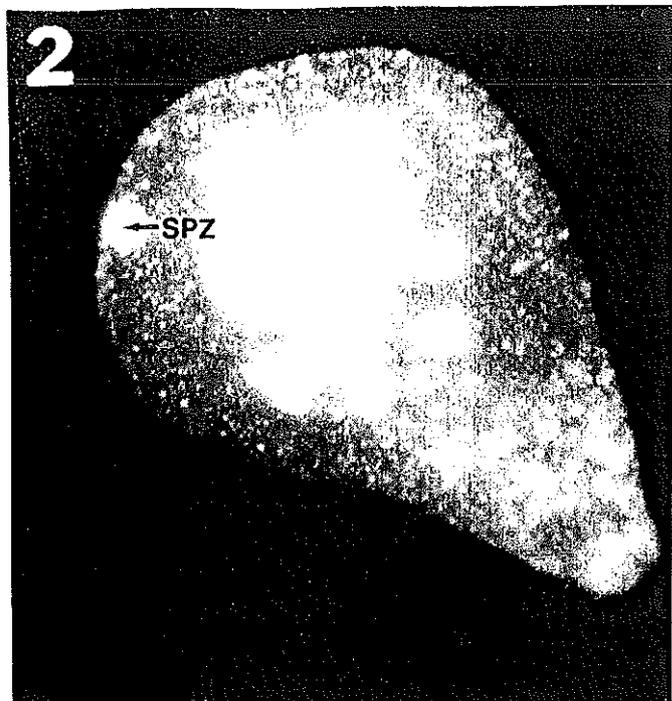
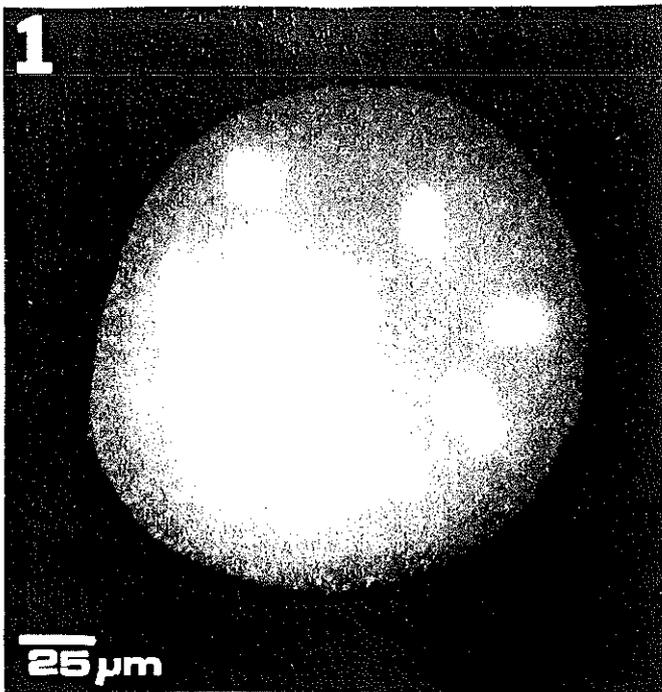
4- Expulsion du premier globule polaire (GP1)

♂ génome paternel

♀ génome maternelle

5- Expulsion du deuxième globule polaire (GP2), avant caryogamie.

6- Formation du lobe polaire (LP). Anaphase de la première division mitotique.



L'induction de la triploïdie est actuellement 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.2).

La technique d'induction chimique à la cytochalasine B, et plus récemment, au 6 DMAP a été retenue (Desrosiers *et al*, soumis). L'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 (fig.3).

3.4.2. -Traitement à la cytochalasine B

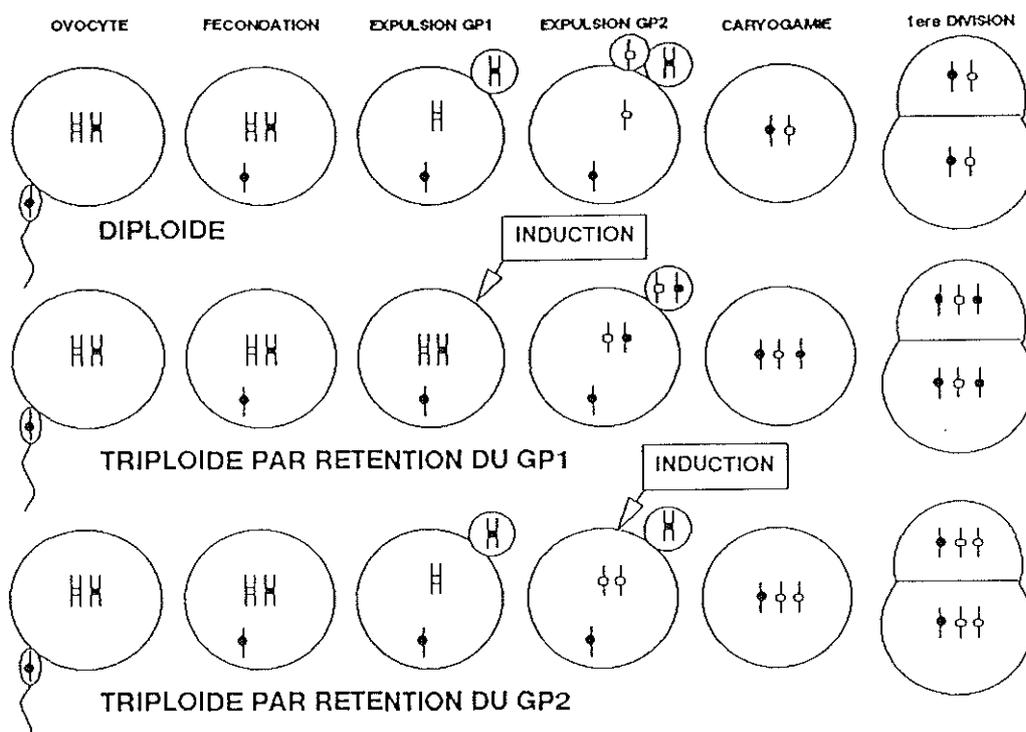
Les cytochalasines résultent du métabolisme de certains champignons. Elles modifient le degré de polymérisation des molécules d'actine en empêchant leur addition aux filaments, sans toutefois inhiber la mitose. Appliquées avant l'expulsion d'un des deux globules polaires, elles désorganisent simultanément le réseau de filaments qui permet la migration des chromosomes et l'anneau fibrillaire qui opère normalement une constriction du fragment cytoplasmique constituant le globule polaire.

Le traitement appliqué est adapté de la méthode de Downing et Allen (1987). Il utilise la cytochalasine B (CB), qui est un produit dangereux, cancérigène, tératogène et couteux (60000F/g). Il comporte 2 étapes, l'immersion des oeufs dans une solution de CB puis un rinçage dans une solution de DMSO (diméthylsulfoxyde). La CB, dissoute dans du DMSO à une concentration de 1mg/l, est mise en contact avec les oeufs pendant 15min, qui sont recueillis ensuite sur un tamis de 1µm et rincés. Les oeufs sont placés dans un bain de DMSO de 0.1% durant 20min afin de les débarrasser de la CB résiduelle, puis en incubation dans un bac de 30 litres.

3.4.3. -Traitement au 6-DMAP

Le 6-diméthylaminopurine (6-DMAP) ne perturbe pas la synthèse des protéines mais seulement l'activité phosphorylatrice (Néant et Guerrier, 1988) des protéines kinases, entraînant ainsi la décondensation de la chromatine; les chromosomes métaphasiques donnent alors des noyaux au repos et le fuseau est détruit par dépolymérisation de la tubuline.

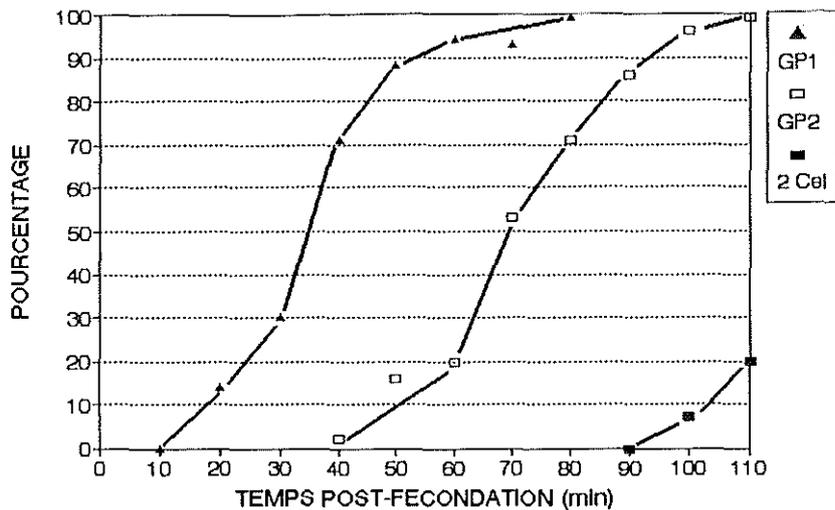
Fig. : Induction de la triploïdie
chez les mollusques bivalves



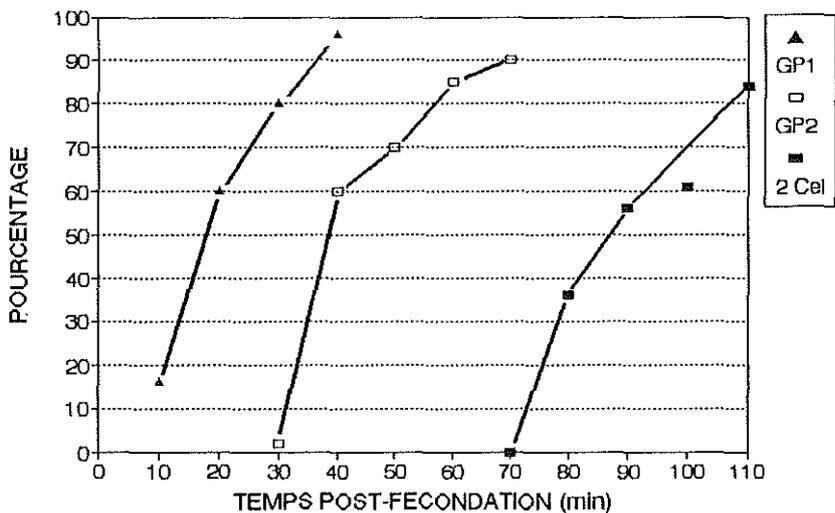
GP1 : Premier globule polaire

GP2 : Second globule polaire

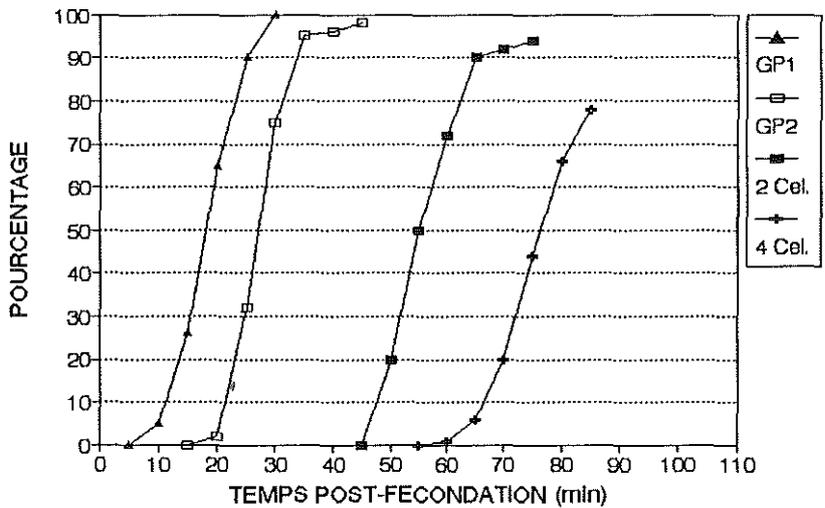
Crassostrea gigas Développement embryonnaire à 18°C



Crassostrea gigas Développement embryonnaire à 20°C



Crassostrea gigas Développement embryonnaire à 25°C



Le traitement est appliqué selon le protocole de Gérard (1991) avec une concentration de 300 $\mu\text{M/l}$ administrée 15min après la fécondation pendant 20min.

L'avantage de ce produit par rapport à la CB est qu'il pourrait être moins dangereux, qu'il coûte moins cher et que son effet est réversible : il suffit en effet de laver les oeufs avec de l'eau de mer pour que les protéines se rephosphorylent, que les chromosomes se recondensent, et que les microtubules se reforment.

3.5. -Contrôle et détermination de la ploïdie

Un des principaux problèmes de la méthode chimique d'induction de la triploïdie est le résultat partiel de la polyploïdie. Une détermination de la ploïdie des individus ou du pourcentage de triploïdes dans les lots obtenus après manipulation et élevage est donc nécessaire. Deux méthodes existent, la première longue et ne pouvant être effectuée que sur des larves, a été remplacée récemment par la deuxième plus rapide et adaptable à tous les stades de la vie de l'animal.

3.5.1. -Par caryologie

Les jeunes larves trocophores sont immergées 4h après la fécondation dans une solution de colchicine (0.2g/l d'eau de mer) pendant 2h afin de bloquer les chromosomes en métaphase. Un choc hypotonique (eau de mer/eau douce: 1/3) de 20min induit un gonflement des cellules qui permet de mieux distinguer les chromosomes. Les larves sont ensuite fixées dans 3 bains successifs de Carnoy (éthanol/acide acétique: 3) à 4°C. Les cellules embryonnaires sont dissociées par agitation pendant 10min dans de l'acide acétique dilué à 50% et déposées sur une lame préchauffée à 45°C environ. Enfin les lames sont colorées 10min par une solution de Giemsa (4%) à pH 7 (tampon phosphate). L'observation microscopique permet de compter le nombre de chromosomes sur 50 métaphases prises au hasard.

3.5.2. -Par imagerie numérique

La technique d'analyse de la ploïdie chez les Mollusques bivalves par imagerie numérique a été mise au point par Gérard *et al.* (1991). Deux protocoles existent en imagerie

numérique : l'un effectué sur des individus par l'intermédiaire d'une empreinte branchiale (fig.4) et l'autre sur des populations cellulaires (fig.5 et 6). Dans ce dernier cas, il est nécessaire d'avoir des cellules bloquées au même stade de synthèse d'ADN. Pour qu'il en soit ainsi, on utilise un antimitotique, l'aphidicoline, à une dose de 5µg/ml.

L'analyseur d'image, composé d'un microscope, d'une caméra et d'un micro-ordinateur (fig.7) est un appareil de mesure photométrique qui permet de déterminer le degré de ploïdie suivant la quantité d'ADN (Gérard *et al.* 1991/b). Les noyaux des cellules sont colorés par la réaction de Feulgen Rosaniline. L'hydrolyse acide des ponts ribose-purine de l'ADN donne des résidus aldéhydes qui, réagissant spécifiquement avec le réactif de Schiff, donnent une coloration rose. La densité optique que mesure l'analyseur sera d'autant plus importante qu'il y aura d'ADN. L'analyseur donne le rapport de la densité optique intégrée existant entre le témoin diploïde et le sujet étudié. Ce rapport est de 1 si l'animal est diploïde de 0.5 s'il est haploïde et de 1.5 s'il est triploïde.

3.6. -Elevage larvaire

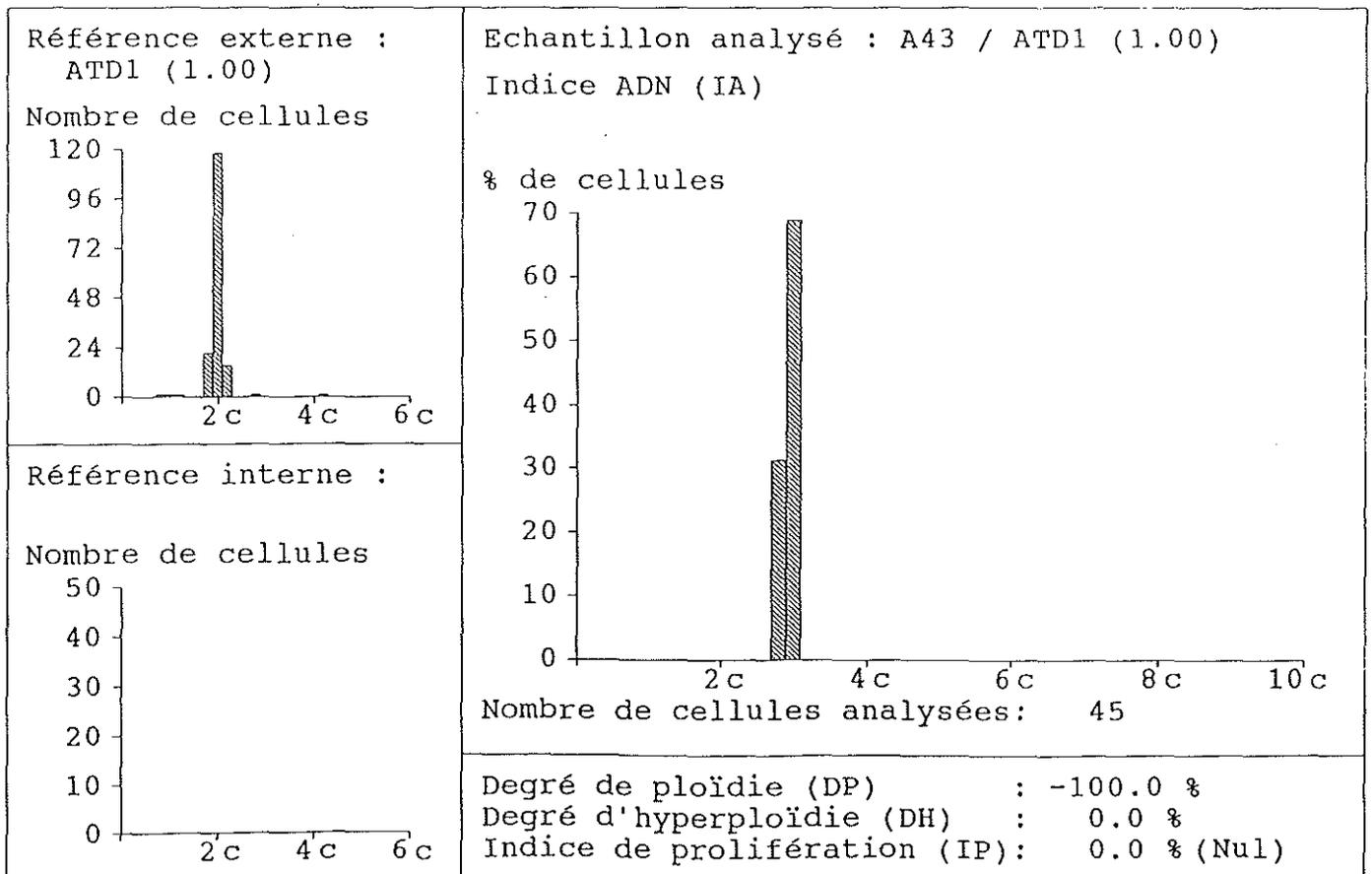
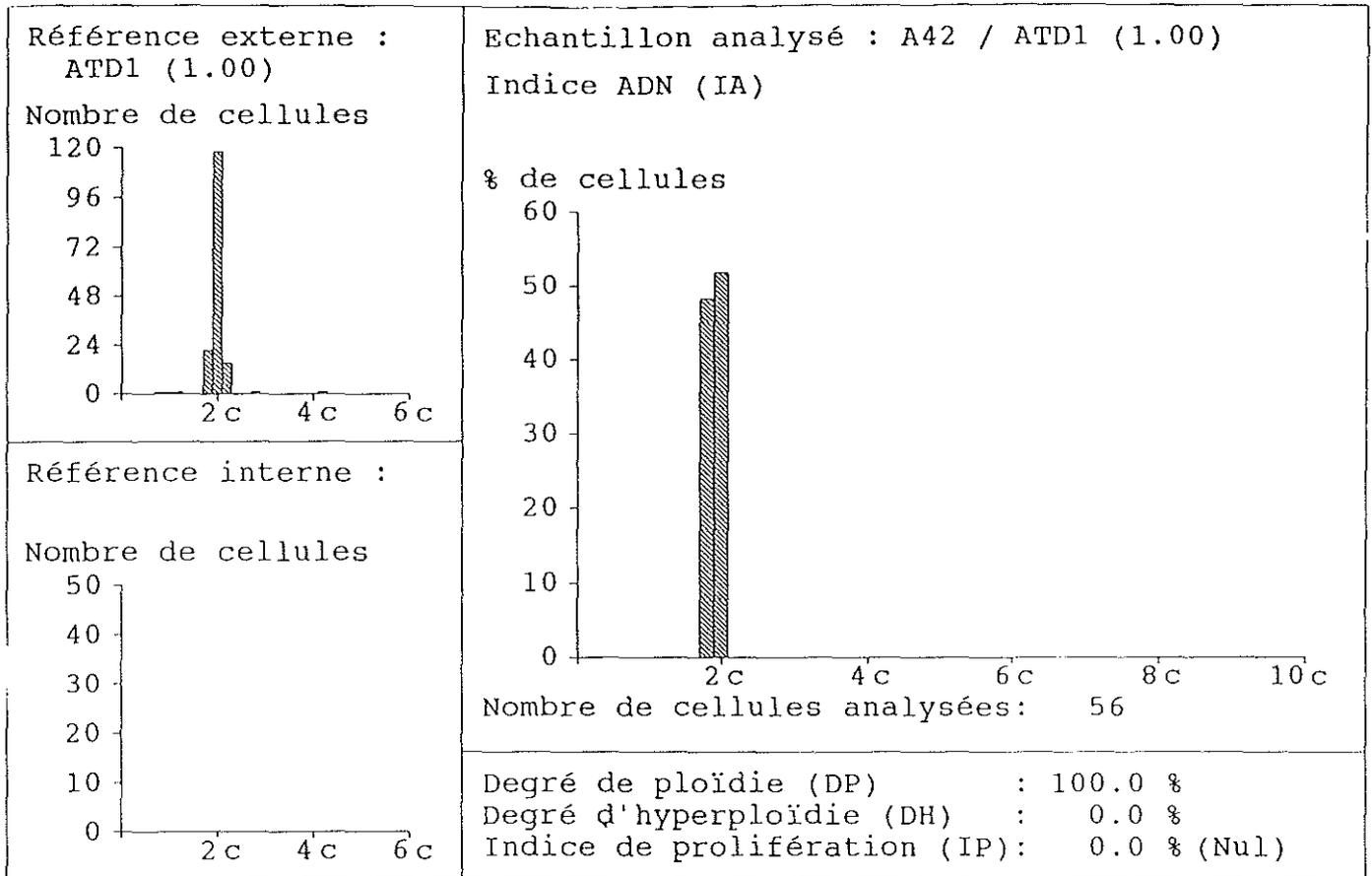
Les oeufs, environ 100 par ml, sont incubés à 25°C dans des bacs cylindro-coniques de 30 litres remplis d'eau de mer filtrée à 1µm et légèrement agitée par un bullage à la base. Au bout de 24h, les larves nageuses sont recueillies sur un tamis de 45µm et comptées afin :

- d'ajuster les lots à une concentration de 10 larves par ml,
- de chiffrer le taux d'éclosion,
- de dénombrer éventuellement le taux de larves anormales (planche photo III).

Cette opération, répétée tous les 2 jours, s'accompagne d'un contrôle de croissance, et de survie, jusqu'au transfert en nurserie. A chaque renouvellement d'eau, un antibiotique (chloramphénicol) est ajouté, pour limiter le développement bactérien.

L'alimentation phytoplanctonique, généralement obtenue par mélange de 3 espèces, est donnée quotidiennement à des concentrations de 20 cellules/µl par espèces.

Figure 4 : Contrôle de la ploïdie sur individus adultes.
Individu diploïde en haut, triploïde en bas.



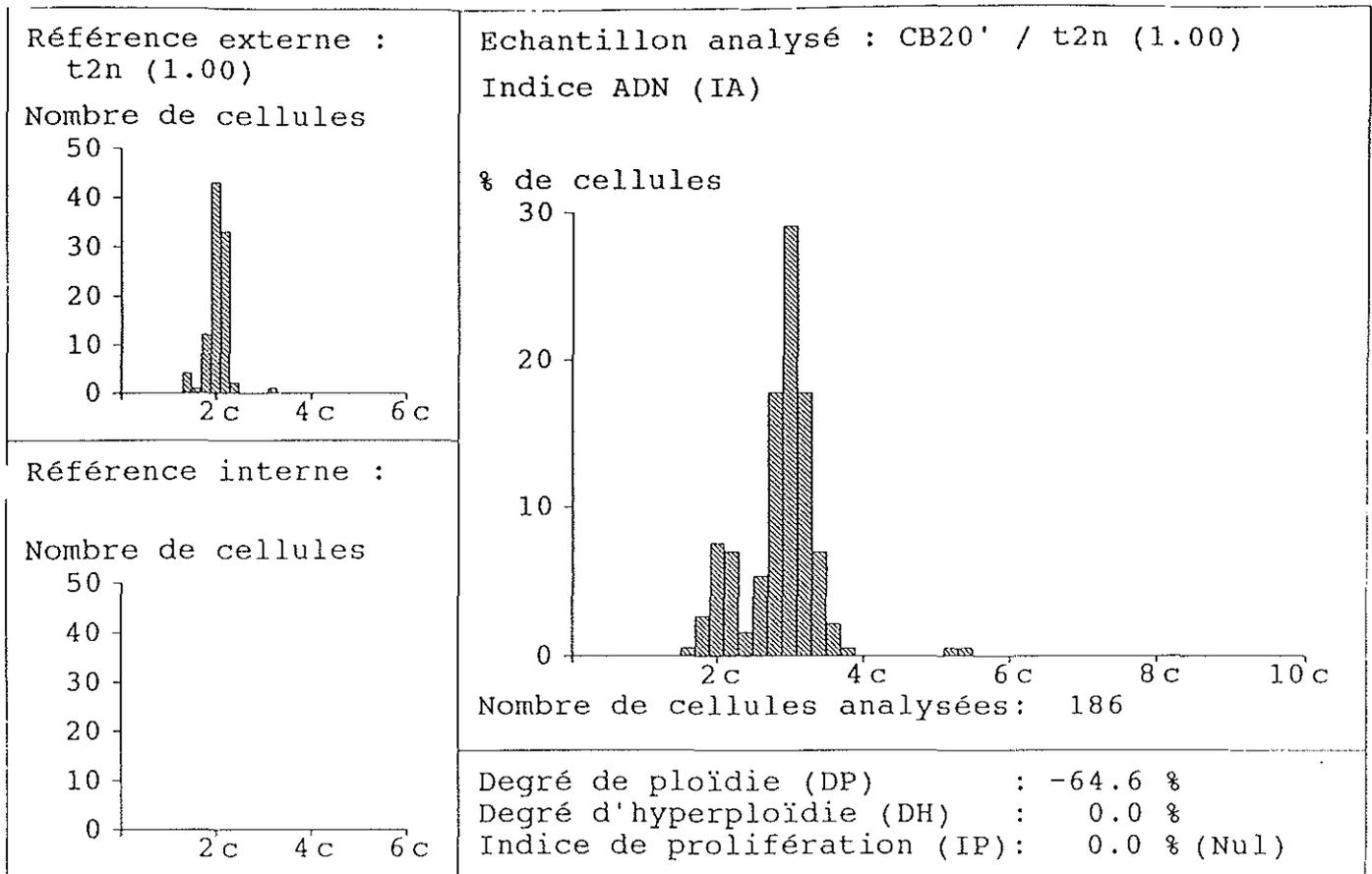


Figure 6 : Décomposition en gaussiennes de la même population cellulaire.

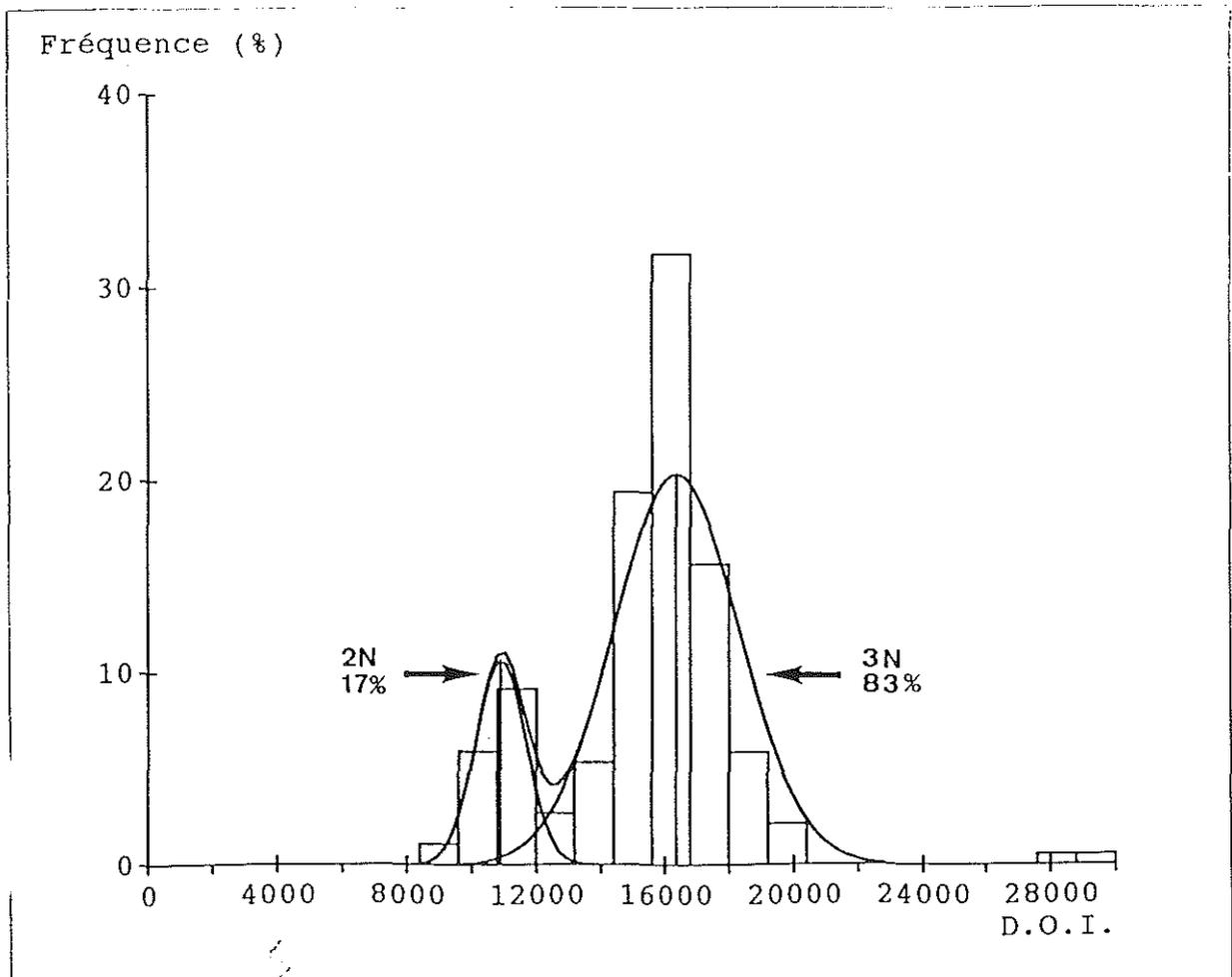


Fig. 7 : CONFIGURATION DU
SYSTEME SAMBA 2005

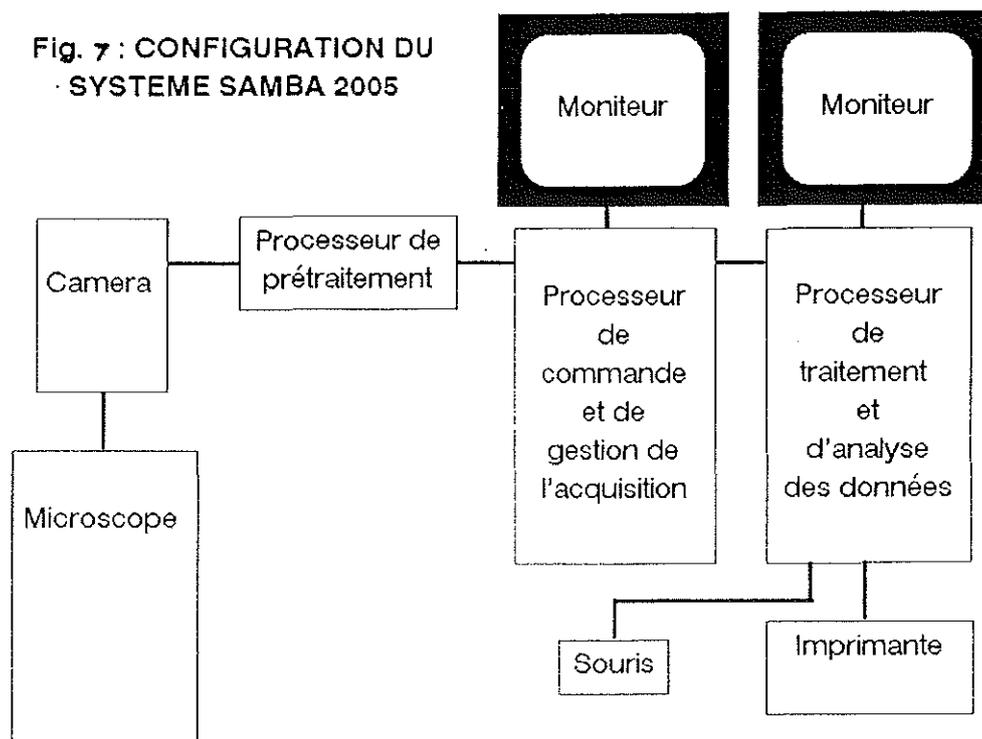
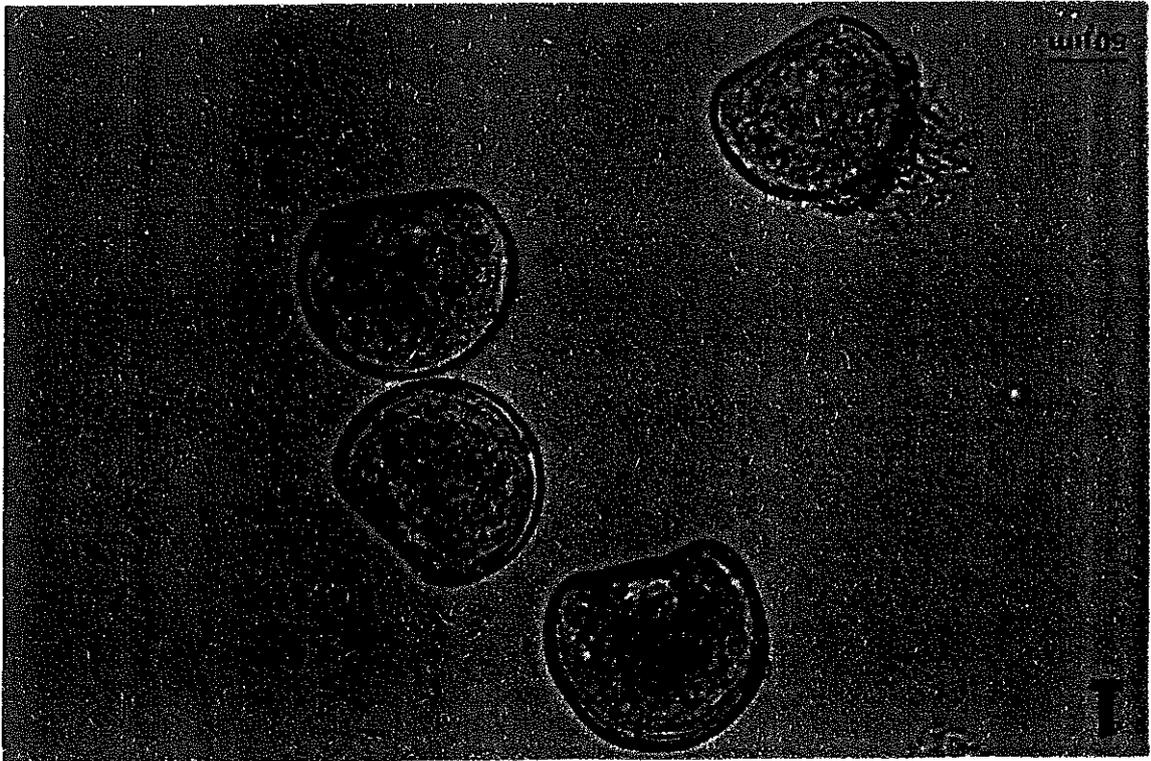
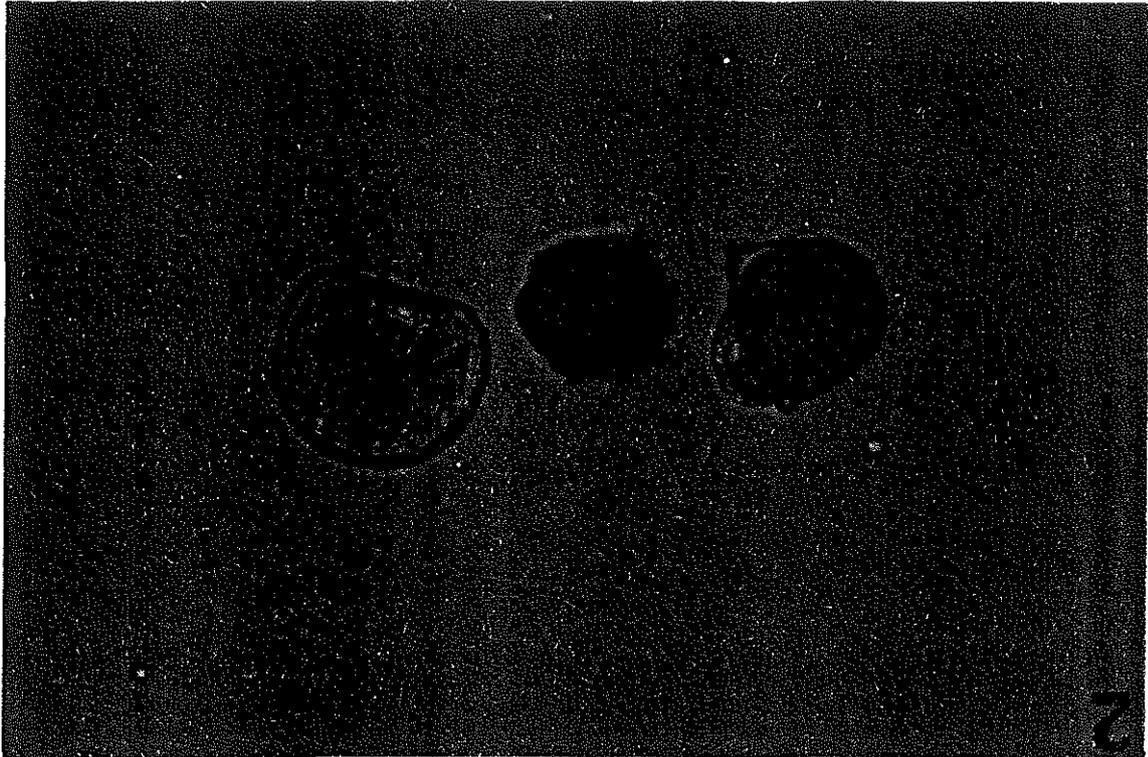


PLANCHE PHOTO III

1- Larves D normales (N).

2- Embryons anormaux (A) n'atteignant pas le stade de larve D.



3.7. -Micronurserie

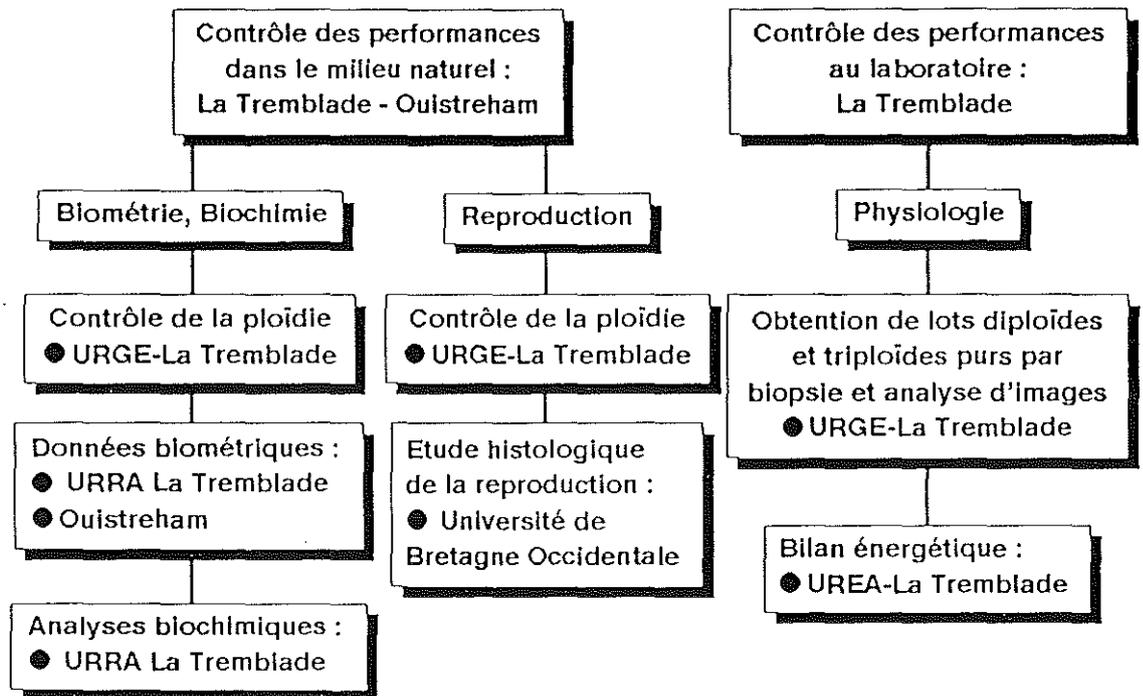
Après une période d'environ 20 jours d'élevage larvaire, la métamorphose intervient : les larves cessent de nager et cherchent un support pour s'y fixer définitivement. Après filtration sur un maillage de 250 μm , elles sont placées dans des tamis de 100 μm dont le fond est tapissé de brisure de coquilles et les bords paraffinés afin d'éviter leur fixation sur ce support. Tant qu'il n'a pas atteint une taille de quelques millimètres, le naissain doit être maintenu dans un environnement contrôlé, l'eau doit être enrichie en nourriture, chauffée à 20°C, et renouvelée à un débit d'environ 300 à 400 litres/heure.

3.8. -Contrôle des performances biologiques en milieu naturel et en laboratoire

Ce contrôle met à contribution plusieurs unités de recherche (fig.8).

Deux sites naturels ont été retenus: La Tremblade et Ouistreham. L'URRA et le Laboratoire Régional d'Ouistreham assurent le suivi de l'élevage, le contrôle des différents paramètres de croissance, la mortalité, la maturation et l'analyse des les constituants biochimiques. Le contrôle de la ploïdie est assurée par l'URGE. Une étude histologique de la reproduction est effectuée par l'Université de Bretagne Occidentale associée à l'URGE pour le contrôle de la ploïdie.

**Fig. 8 : CONTROLE DES PERFORMANCES
DES POPULATIONS DIPLOIDES ET TRIPLOIDES DE *Crassostrea gigas***



4. -DEROULEMENT DU PROGRAMME

Par simplification et du fait de l'impact économique de l'huître creuse dans le bassin de Marennes-Oléron, les résultats présentés porteront uniquement sur cette espèce.

4.1. -Résultats sur l'induction de la triploïdie

L'efficacité des techniques d'induction de la triploïdie est jugé essentiellement sur la base du pourcentage de triploïdes obtenu, de la toxicité du traitement, et de son coût. D'importantes améliorations ont été réalisées depuis 1990. La méthode à partir du 6-DMAP semble la mieux convenir. Actuellement, une bonne manipulation doit donner 80 à 90% de triploïdes (fig.9 et 10).

Théoriquement, la triploïdie, jouant sur le développement sexuel, ne devrait pas apporter des modifications dans la croissance larvaire. Les résultats obtenus expérimentalement confirment cette hypothèse (fig.11).

En revanche, le traitement d'induction, par ses effets toxiques, semble intervenir sur la viabilité des larves (fig.12)

4.2. Résultats du contrôle de performance

Ce contrôle, débuté en Mars 91, est donc loin d'être terminé.

Sur le site de la Tremblade, 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. Sur le site d'Ouistreham, l'élevage se fait sur l'estran. La croissance étant moins rapide sur l'estran qu'en claire, les résultats présentés ici concernent uniquement ceux obtenus à la Tremblade. Il faut signaler que de gros problèmes d'infrastructures ont été rencontrés; une réfection des claires a été nécessaire en cours d'expérience, 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.

Fig. 9 : Taux d'éclosion et pourcentage de triploïdes / dose de 6-DMAP

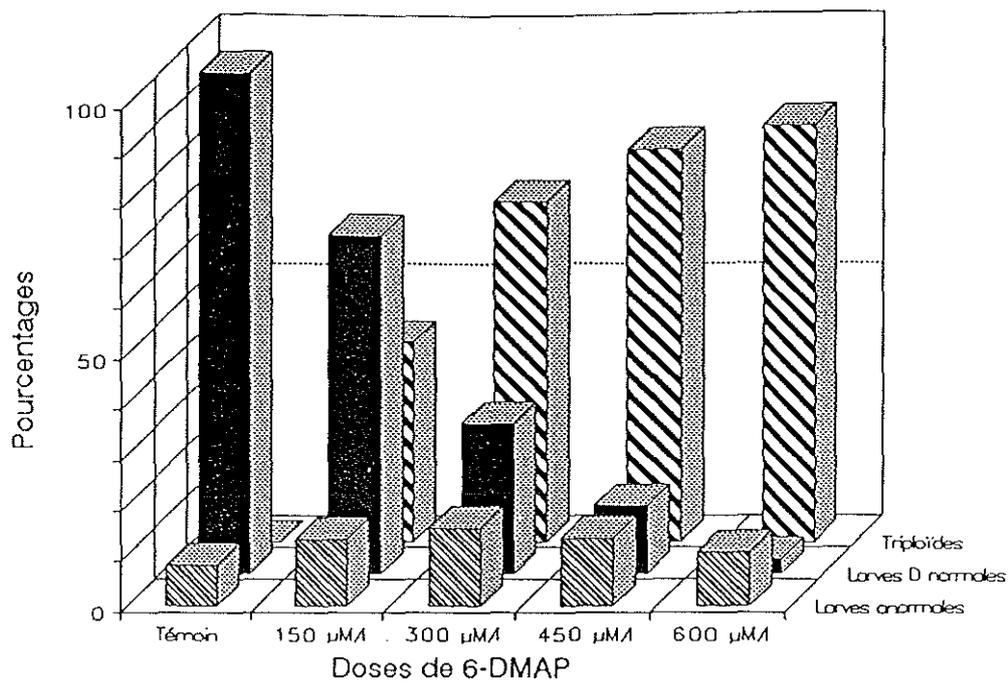


Fig. 10: Induction de la triploïdie par le 6-DMAP et la Cytochalasine B

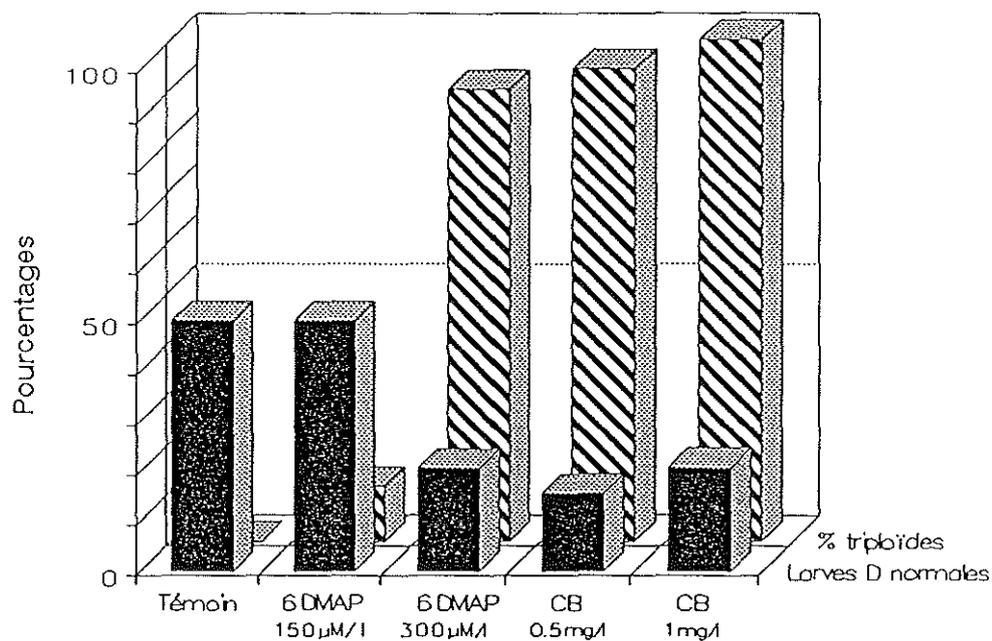


Fig. 11: Elevage larvaire CG3N9117
CROISSANCES COMPAREES

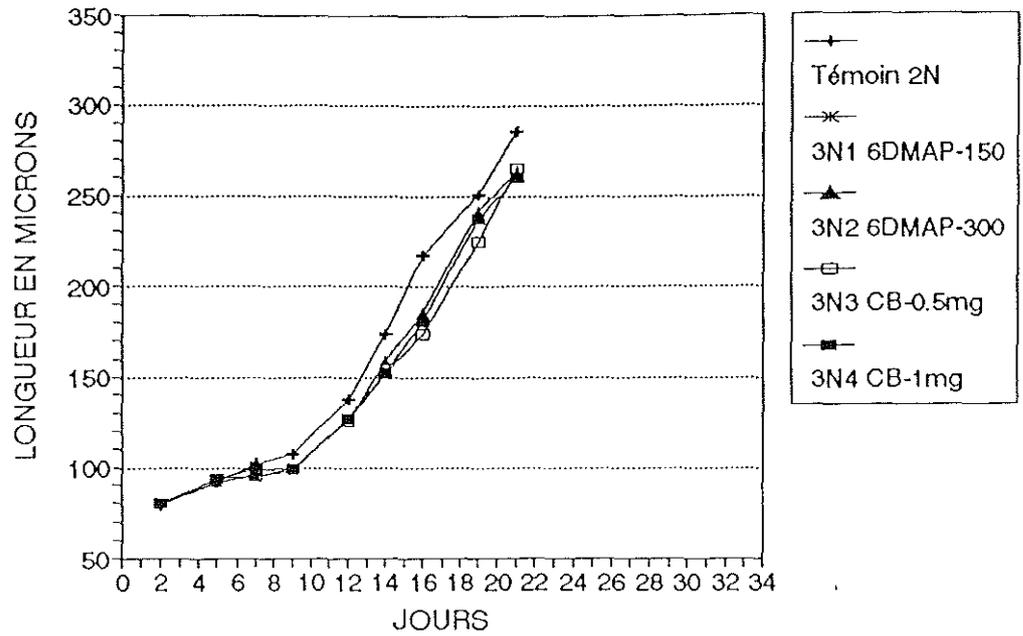
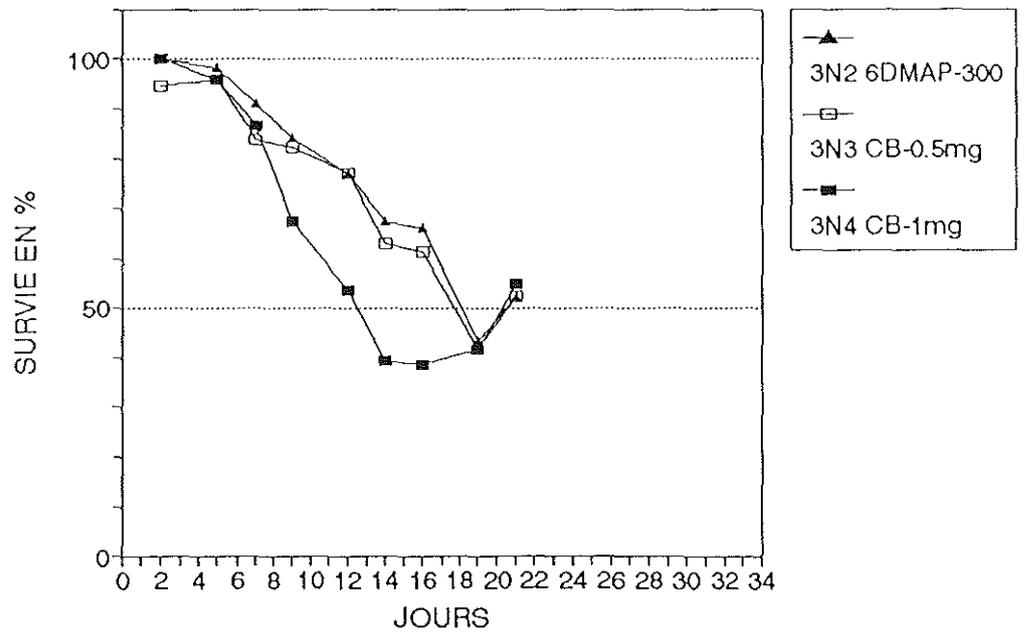


Fig. 12: Elevage larvaire CG3N9117
MORTALITES RELATIVES / TEMOIN



4.2.1. Evolution des paramètres biométriques

La croissance des huitres a été satisfaisante. D'un poids moyen d'environ 3.5g au mois de février, elles ont atteint 41g au mois de novembre pour le lot de diploïdes, et 53g pour le lot de triploïdes. La différence entre les 2 lots n'est sensible qu'après la période estivale (fig.13).

L'évolution du poids sec de chair et de l'indice de condition (fig.14 et 15) renseigne un peu mieux sur les différentes phases d'élevage. Les 2 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. Le poids sec de chair, qui n'évolue plus, et l'indice de condition, qui chute, sont de bons indicateurs d'un stress nutritif. Une amorce de reprise de croissance est toutefois enregistrée à partir de la mi-juin.

C'est à partir de juillet que sont enregistrées les premières différences entre les lots triploïdes et diploïdes. 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, 2 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.

Les résultats histologiques 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 de condition 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).

4.2.2. Evolution des paramètres biochimiques

Les résultats obtenus, si l'on excepte la période de stress trophique, sont dans l'ensemble conformes à ceux déjà connus.

Fig.13: POIDS TOTAL MOYEN

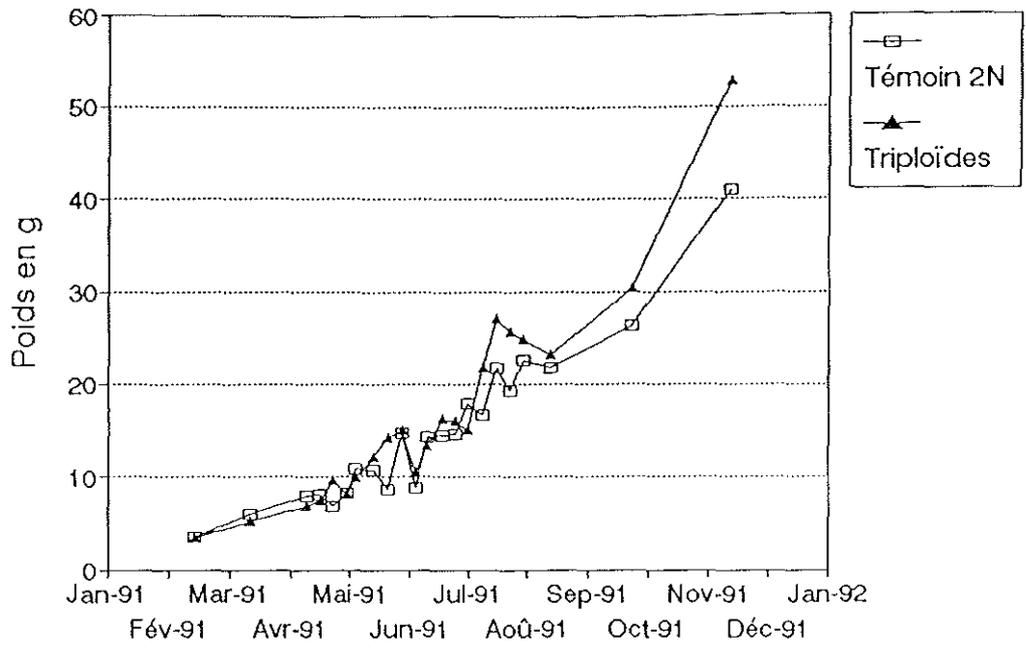


Fig.14: POIDS SEC DE CHAIR

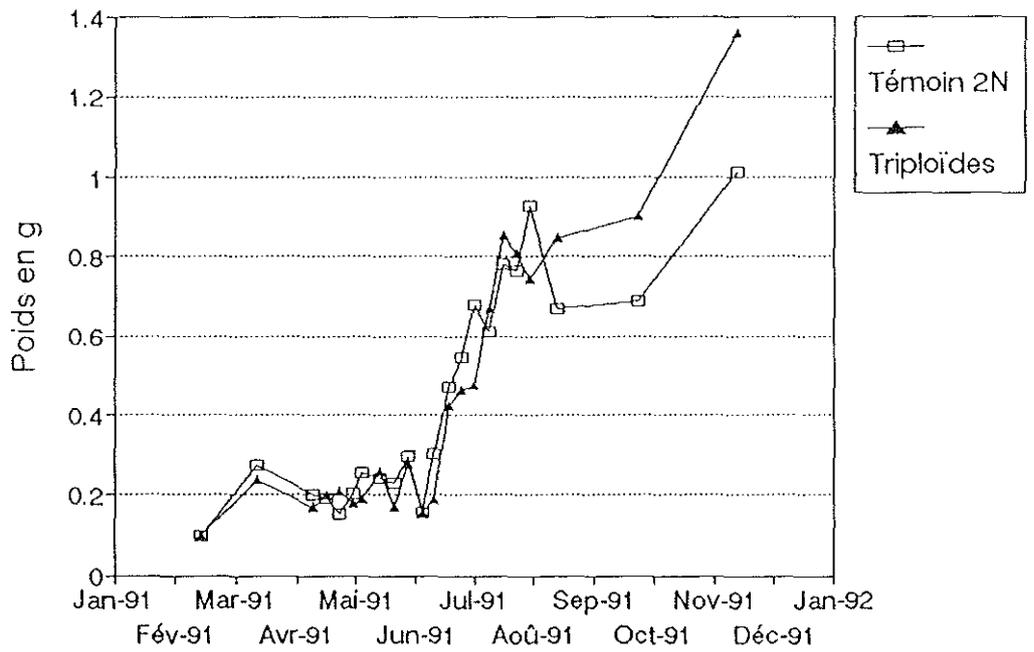


Fig. 15: INDICE DE CONDITION Ps/(Pt-Pc)

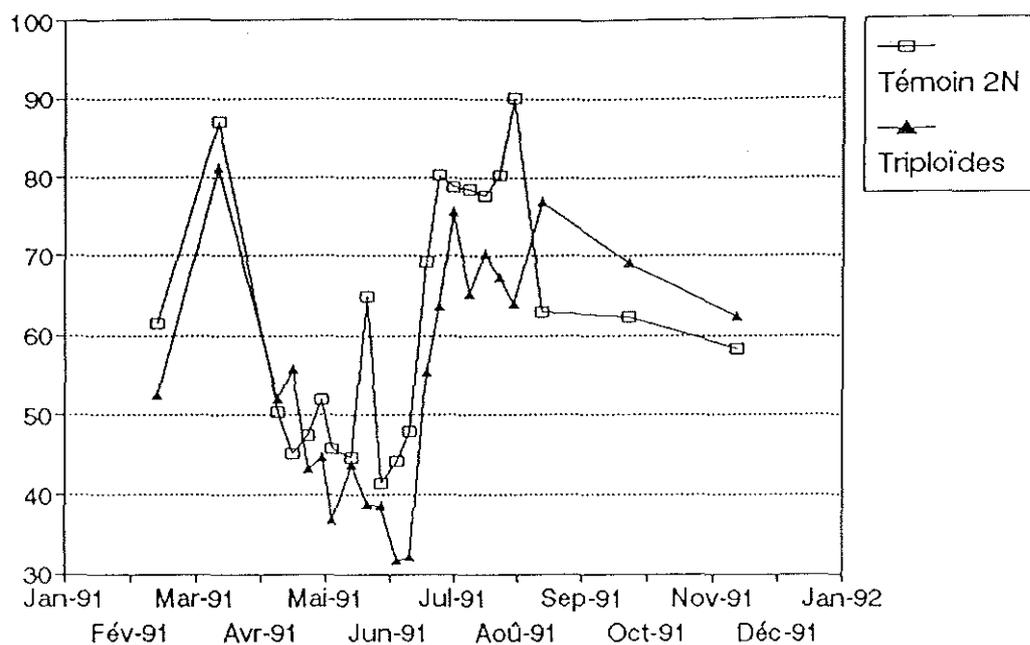
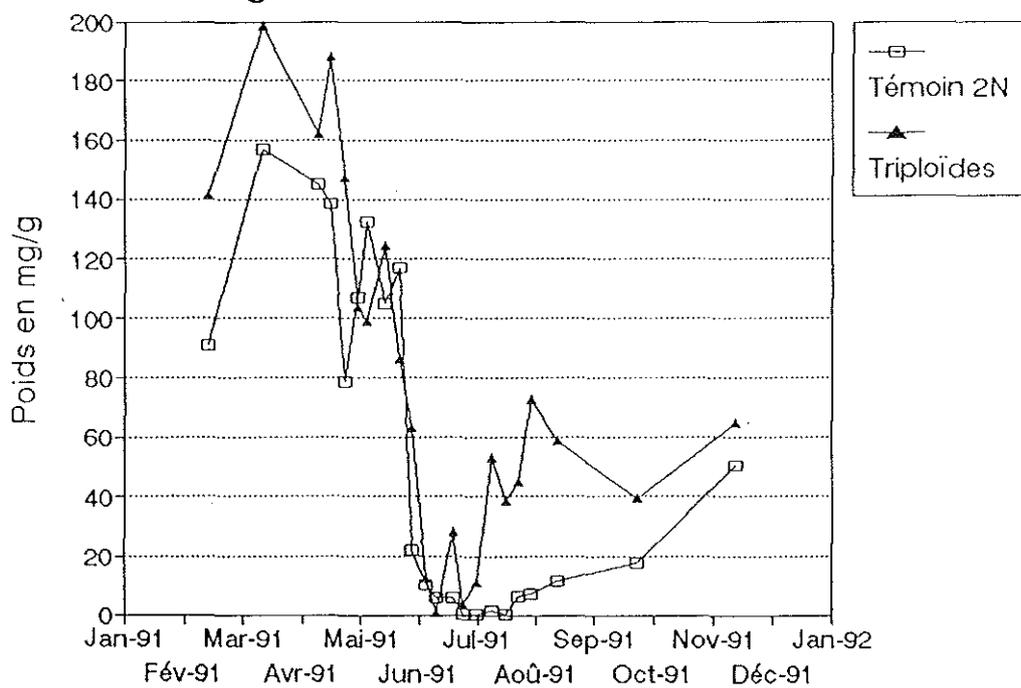


Fig. 10: TENEUR EN GLYCOGENE



On obtient un pic des teneurs en protéines pendant la gamétogénèse, aux mois de juin et juillet. Le phénomène inverse est enregistré pendant le stress à la fin du printemps (fig.17).

Les teneurs en lipides (fig.18) ont un cycle plus normal. Les teneurs maximales, atteintes en juillet pour les diploïdes, correspondent à la fin de la gamétogénèse, 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 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 triploïdes, ont épuisé leurs réserves glucidiques (fig.16 et 19). 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 du zéro pour les diploïdes pendant la phase de gamétogénèse. Ce résultat très important confirme, qu'en absence de stress trophique, la réduction de la gonadogénèse chez l'huître triploïde entraîne une 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 pour rejoindre au mois de novembre celles des triploïdes.

Fig.17: TENEUR EN PROTEINES

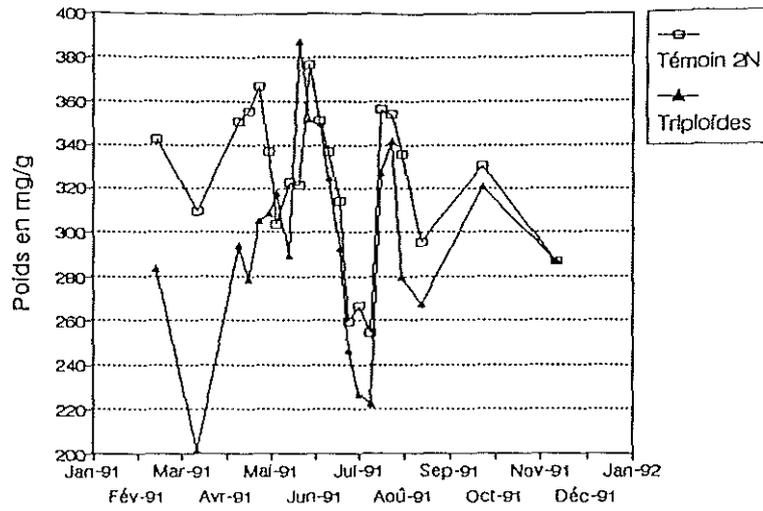


Fig.18 : TENEUR EN LIPIDES

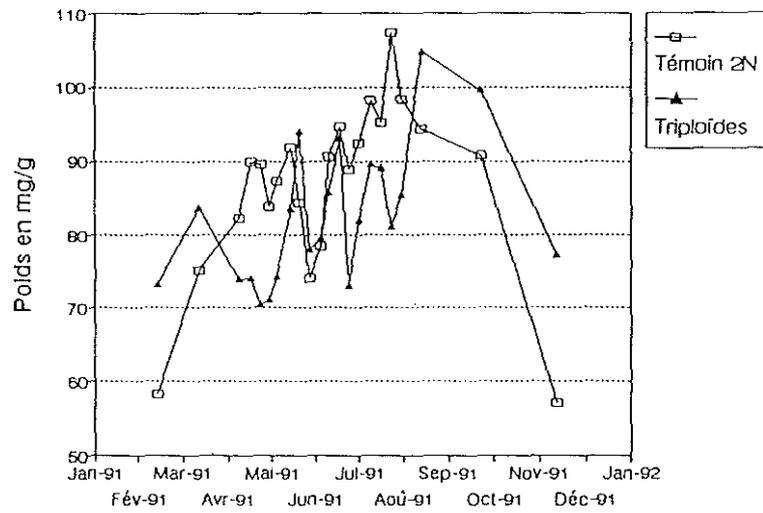
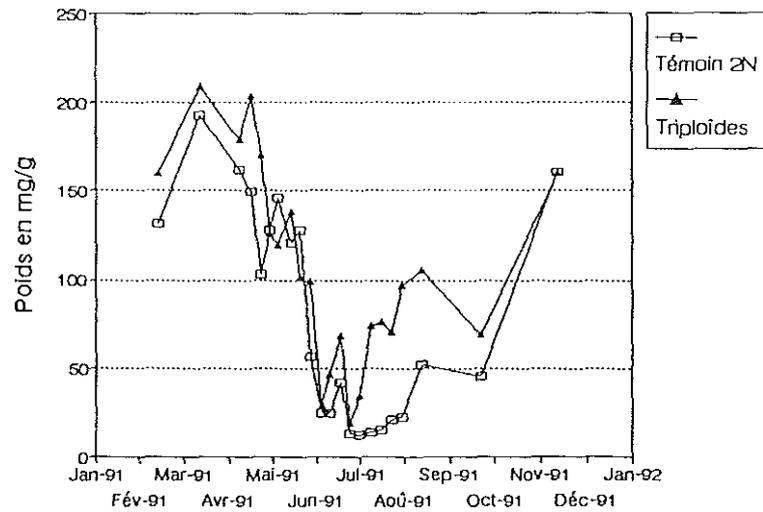


Fig.19: TENEUR EN GLUCIDES



5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats, présentés jusqu'à présent, sont l'aboutissement des recherches menées en 1989, 1990, et 1991. Les systèmes expérimentaux ont été mis en place. Des techniques de triploïdisation ont été acquises, et des populations de triploïdes viables produites. Un contrôle de la ploïdie a été mis au point. Le contrôle des performances biologiques a maintenant débuté.

Désormais, les recherches sont portées, essentiellement, sur l'amélioration des techniques de triploïdisation. L'utilisation de nouveaux produits d'induction moins toxiques et plus économiques, comme le 6-DMAP, donne déjà des résultats. Mais la mise au point de techniques de tétraploïdisation semble la voie la plus prometteuse. En effet, l'obtention de géniteurs tétraploïdes viables, croisés avec des géniteurs diploïdes, serait susceptible de fournir des populations à 100% triploïde. Le contrôle de ploïdie, jusqu'à présent obligatoire, ne serait plus systématiquement nécessaire.

L'induction de la tétraploïdie pourrait être obtenue par:

- la rétention des 2 globules polaires précédée d'une inactivation du stock chromosomique du spermatozoïde (tétraploïdie gynogénétique),
- la suppression de la première division mitotique (tétraploïdie endomitotique).

Diverses techniques sont essayées, traitements chimiques, chocs de pression, chocs thermiques, électrofusion...

Aucun individu tétraploïde viable chez les mollusques bivalves n'a encore pu être obtenu. Mais les réussites obtenues dans le domaine piscicole, laissent espérer et croire à de belles perspectives pour l'application de cette nouvelle méthode à des souches conchylicoles.

BIBLIOGRAPHIE

ANONYMES, 1992. Cahiers d'objectifs et de programmes 1992-1995, LABEIM.

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., JR., and DOWNING, S.L., 1987. Triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, 61: 1-15.

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.

CHEVASSUS, B., QUILLET, E. et CHOURROUT, D., 1984. La production de truites stériles par voie génétique. *La pisciculture française* n°78.

DESROSIERS, R.R., GERARD, A., PEIGNON, J.M., NACIRI, Y., DUFRESNE, L., MORASSE, J., LEDU, C., PHELIPOT, P., GUERRIER, P., and DUBE, F.. A novel method to produce triploid embryos in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. Soumis à *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*

GERARD, A., PEIGNON, J.M., et CHAGOT, D., 1991. Contrôle de la ploïdie par imagerie numérique dans les expériences d'induction de la triploïdie chez les mollusques bivalves. Congrès CIEM La Rochelle. PAPAË C. M. 1991/F : 12 Réf. K., Mariculture Committee, 6p.

GERARD, A., 1991. Obtention de souches conchylocoles performantes par polyploïdisation (2ème partie). Rapport interne de la Direction des Ressources Vivantes de L'IFREMER, station de La Tremblade, URGE, 37p.

GERARD, A., PEIGNON, J.M., PHELIPOT, P., NOIRET, C., BODOY, A., HEURTEBISE, S., GARNIER, J. 1992. Obtention de souches conchylocoles performantes par polyploïdisation (3ème

partie). Rapport interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER, station de La Tremblade, URGE, URRRA, 36p.

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.

NEANT, I. and GUERRIER, P., 1988. 6-dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res* 176/ 68-79.

WALNE, P.R., 1974. Culture of bivalves molluscs, 50 years experience at Conway. *Fishing News (books)*. West byfleet, 173p.