

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

**OBTENTION DE SOUCHES
CONCHYLICOLES PERFORMANTES
PAR POLYPLOIDISATION
(4ème partie)**

GERARD A., NACIRI Y., PEIGNON J.M., LEDU C., PHELIPOT P.,

Unité de Recherche en Génétique et Ecloserie, La Tremblade

BODOY A., HEURTEBISE S., GARNIER J.

Unité de Recherche Régionale en Aquaculture, La Tremblade

BAUD J.P., NOURRY M., HAURE J.,

Unité de Recherche Régionale en Aquaculture, Bouin

MARTIN A.G., CLAUDE S.,

Station IFREMER de La Trinité-sur-Mer

BARRET J., DEVAUCHELLE N.,

Station IFREMER de Brest

JOLY J.P., GOULLETQUER P.,

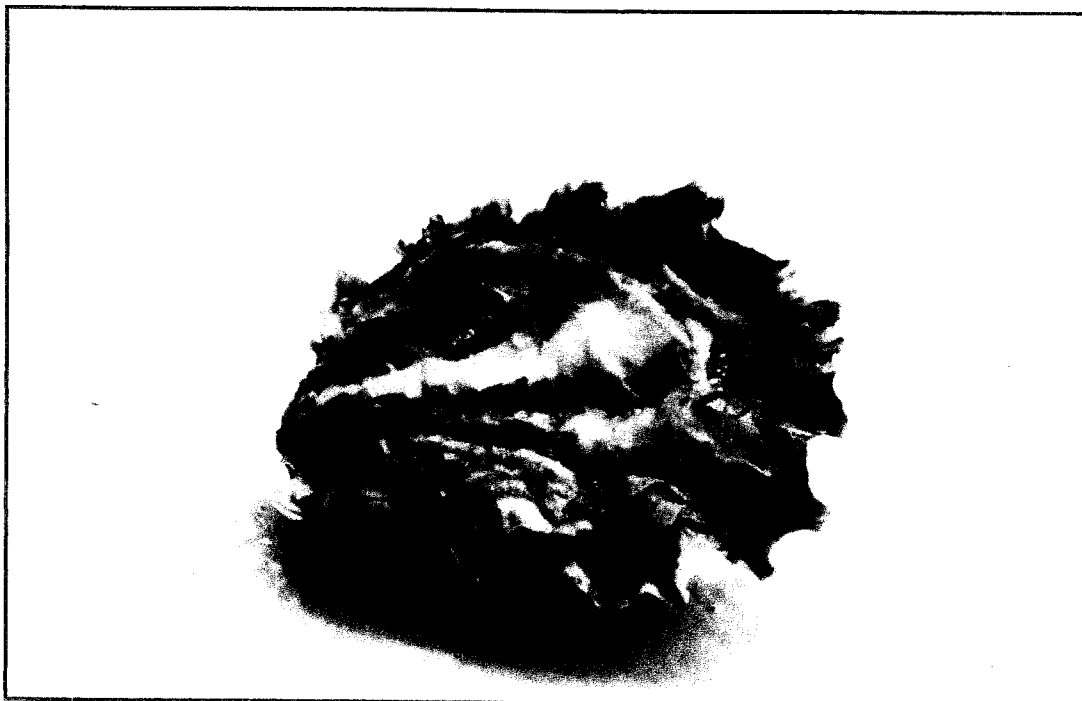
Station IFREMER de Port-en-Bessin

COATANEA D., OHEIX J.,

Station IFREMER de Palavas

ZANETTE Y., BLACHIER P.,

CREAA de l'île d'Oléron



PREAMBULE

Ce document présente le quatrième 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, 1990 et 1991 :

"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

"Obtention de souches conchylicoles performantes par polyloïdisation (3ème partie)". Rapport interne IFREMER - RIDRV - 92-11 - 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, pour le contrôle des performances biologiques et toutes les analyses biochimiques (La Tremblade) et pour les suivis en nurserie (Bouin),

Les laboratoires RA de Port-en-Bessin, de Brest, de La Trinité-sur-mer et de Palavas pour le contrôle des performances biologiques dans le milieu naturel,

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

et la participation de structures externes :

Le Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA) 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	3
SOMMAIRE.....	5
1. INTRODUCTION	6
2. RAPPEL DES PROPOSITIONS DE TRAVAIL	7
3. RAPPEL DU PRINCIPE ET DES TECHNIQUES DE POLYPLOÏDISATION	8
3.1. Induction de la triploïdie	8
3.2. Induction de la tétraploïdie.....	8
4. RESULTATS OBTENUS	10
4.1. Acquisition d'une technique de microscopie à épifluorescence.....	10
4.2. Mise au point d'une nouvelle méthode d'induction de la polyplôïdie.....	14
4.2.1. Principe et avantages de la méthode	14
4.2.2. Résultats des premiers essais	14
4.2.2.1 Influence de la dose de 6-DMAP.....	14
4.2.2.2 Effet du moment d'application.	16
4.2.2.3 Effet de la durée d'application.	16
4.2.2.4 Comparaison des traitements CB et 6-DMAP	18
4.2.3. Résultat des élevages en nurserie à Bouin.....	21
4.2.4. Conclusions et perspectives.....	24
4.3. Induction de la triploïdie chez la palourde indigène <i>Ruditapes decussatus</i>	25
4.3.1. Cinétique du développement embryonnaire.....	25
4.3.2. Essai de triploïdisation.....	25
4.3.3. Elevages larvaires et post-larvaires.....	29
4.3.4. Bilan provisoire et perspectives.....	29
4.4. Mise en place du contrôle de performances biologiques pour les populations diploïdes et triploïdes d' <i>Ostrea edulis</i>	30
4.5. Résultats du contrôle des performances biologiques pour les populations diploïdes et triploïdes de <i>Ruditapes philippinarum</i>	31
4.5.1. Rappel des protocoles.....	31
4.5.2. Suivi des performances biologiques à Marennes-Oléron.....	31

Conditions d'élevage	31
Evolution des paramètres hydrologiques.....	31
Evolution du taux de triploïdes.....	33
Evolution des paramètres biométriques	33
Indices de condition et paramètres biochimiques	33
Suivi pathologique	40
Survie.....	40
4.5.3. Suivi des performances de croissance à La Trinité	40
4.5.4. Comparaison de la gamétogenèse femelle.....	40
Objectif.	40
Résultats.....	41
4.5.5. Bilan provisoire	41
4.6. Contrôle des performances biologiques des populations diploïdes et triploïdes de <i>Crassostrea gigas</i> à Ouistreham.	43
4.6.1. Survie	43
4.6.2. Evolution des paramètres biométriques.....	43
4.6.3. Evolution des paramètres biochimiques.....	47
4.6.4. Bilan provisoire	47
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	48
BIBLIOGRAPHIE	49

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 & Deslous-Paoli, 1983).

La réduction de la gonadogenèse par induction de la triploïdie devrait permettre 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 (Allen, 1987) sur plusieurs espèces : *Crassostrea virginica* (Stanley *et al.*, 1981), *C. gigas* (Downing & Allen, 1987 ; Allen & Downing, 1986 ; 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 (Allen & Downing, 1986 ; 1990).

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 prévoyait d'appliquer des 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, 1988 ; Gendreau & Grizel, 1990), la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Dufy, 1988 ; Dufy & Diter, 1990 ; Diter & Dufy, 1990) et la palourde européenne *Ruditapes decussatus* (Noiret, 1991 ; Gérard *et al.*, 1992).

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 triploïdes et tétraploïdes, le programme proposé s'articule en trois grandes parties :

- acquisition des techniques de triploïdisation et 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 diploïdes 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.

L'année 1991 (Gérard *et al.*, 1992) a été consacrée :

- à la poursuite des essais de mise au point de la technique d'induction de la triploïdie chez *Ruditapes decussatus*, la palourde indigène,
- à la production de populations diploïdes et triploïdes d'*Ostrea edulis*, l'huître plate,
- au contrôle des performances des populations diploïdes et triploïdes d'huîtres creuse et de palourde du Pacifique dans le milieu naturel,
- à la poursuite de la mise au point de la technique de contrôle de la ploïdie par analyse d'image,
- au début de la mise au point d'une nouvelle technique d'induction de la polyploïdie chez les mollusques bivalves.

3. RAPPEL DU PRINCIPE ET DES TECHNIQUES DE POLYPLOÏDISATION

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 moment de leur émission, au stade prophase ou au début de la métaphase de la 1^{ère} 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 (Figure 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 (Figure 1),
- le croisement d'un individu diploïde (2N) avec un individu tétraploïde (4N) qui engendre des individus triploïdes (3N). 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.

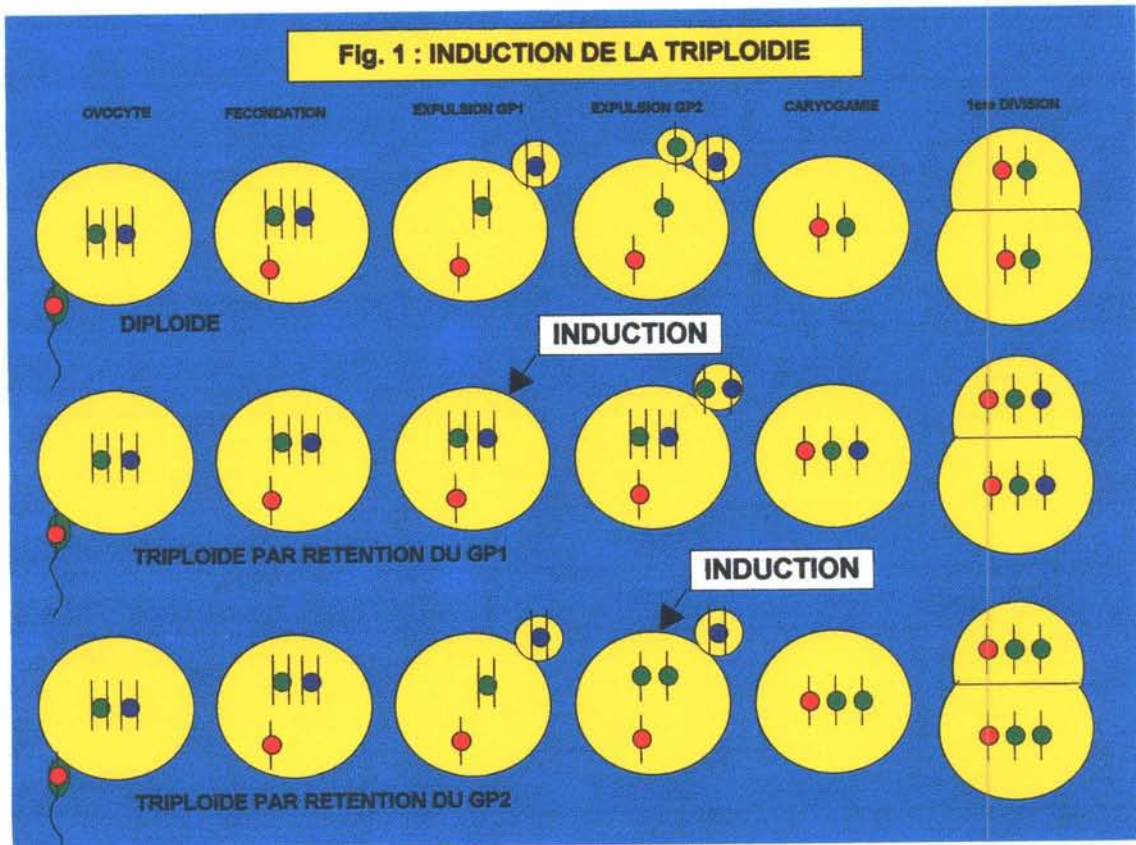
A l'issue des premiers essais, la technique d'induction chimique à la cytochalasine B a été retenue. Son efficacité dépend de la concentration, de la température, de la durée et du moment d'application du traitement. Ces paramètres qui sont fonction de la biologie et du développement embryonnaire doivent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

Fig. 1 : INDUCTION DE LA TRIPLOIDIE



4. RESULTATS OBTENUS

4.1. Acquisition d'une technique de microscopie à épifluorescence.

Une nouvelle technique de microscopie à épifluorescence (Guerrier, com. pers.) a été appliquée pour la première fois au laboratoire en 1992. Cette technique permet d'observer les premiers stades du développement embryonnaire, juste après la fécondation, et d'en connaître la chronologie. Cette connaissance facilite le choix du moment optimum d'application du traitement chimique inducteur de la triploïdie.

Afin d'établir cette chronologie, les embryons sont prélevés toutes les 5 minutes après la fécondation et fixés dans du formaldéhyde (6% dans un tampon GA, voir Annexe I). L'observation au microscope de chaque échantillon permet de déterminer, en comptant 100 embryons, le pourcentage relatif des cellules à chacun des stades suivants (Planche photo I) :

- fécondation de l'ovule,
- expulsion du premier globule polaire (GP1),
- expulsion du second globule polaire (GP2),
- formation du lobe polaire,
- stade 2 cellules,
- stade 4 cellules.

La petite taille du GP2 par rapport à celle du GP1 ainsi que sa faible réfringence rendent son observation parfois difficile (Planche photo I). Pour améliorer la lecture, les échantillon sont colorés à l'aide d'un fluorochrome (Hoescht 33258, Annexe I) et observés au microscope à épifluorescence. Dans ces conditions, l'ADN des cellules émet une fluorescence blanche sur fond bleu, et les globules polaires apparaissent distinctement sous la forme de taches très lumineuses (Planche photo II). D'après Arai *et al.* (1986), un stade est considéré comme représentatif de la population lorsqu'il atteint 40% des cellules de celle-ci.

La Figure 2 représente une chronologie embryonnaire obtenue à 25°C et déterminée par épifluorescence chez *Crassostrea gigas*.

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.

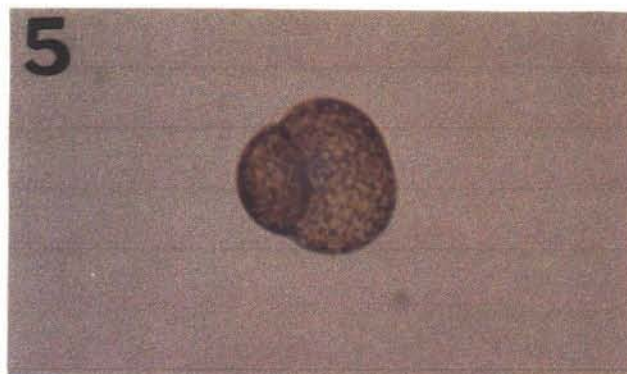
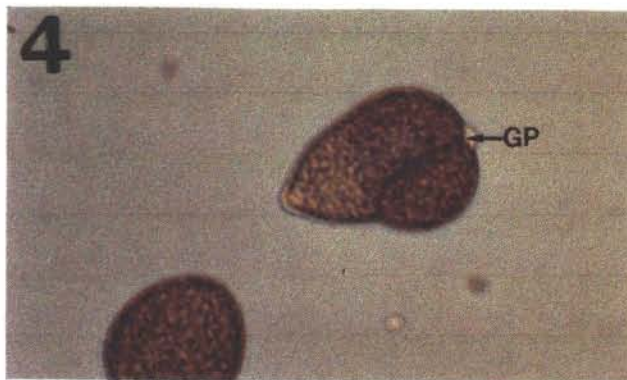
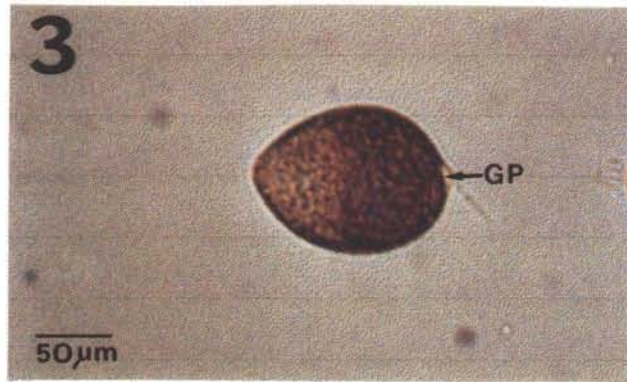
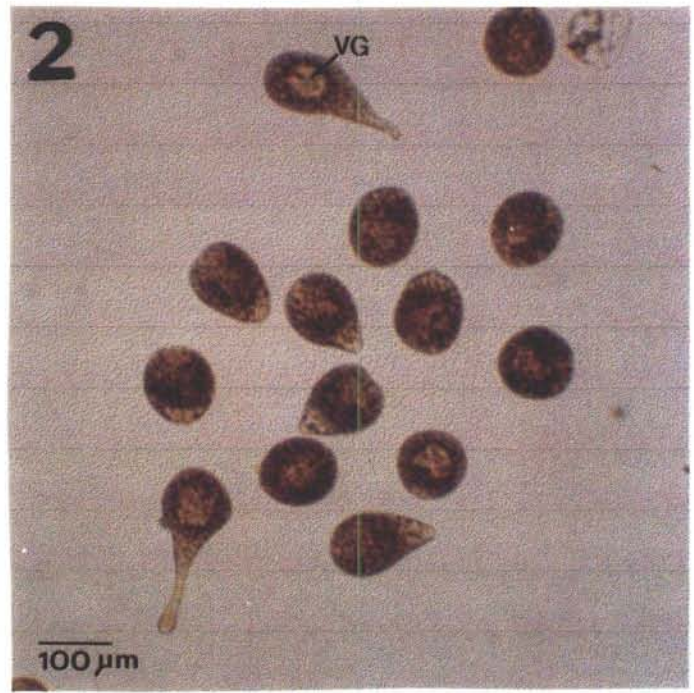
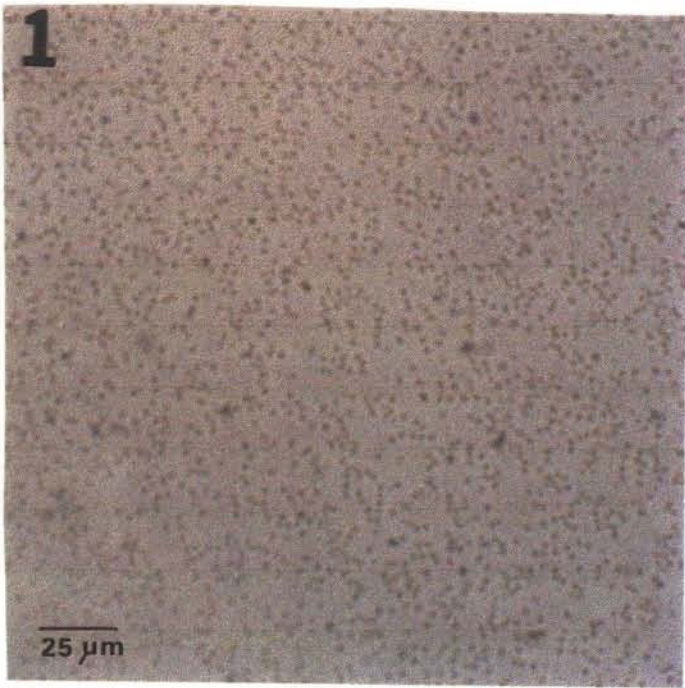


PLANCHE PHOTO II

1- Ovule non fécondé.

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

3- Condensation du génome maternel.

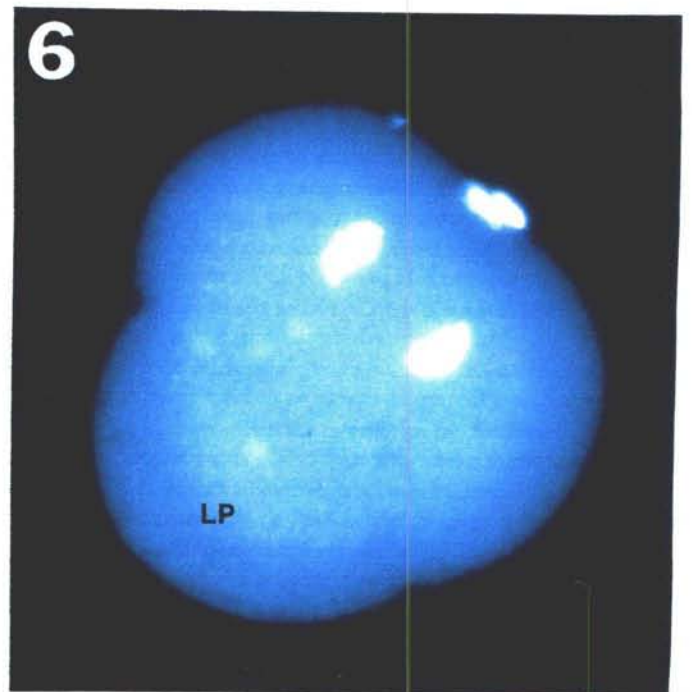
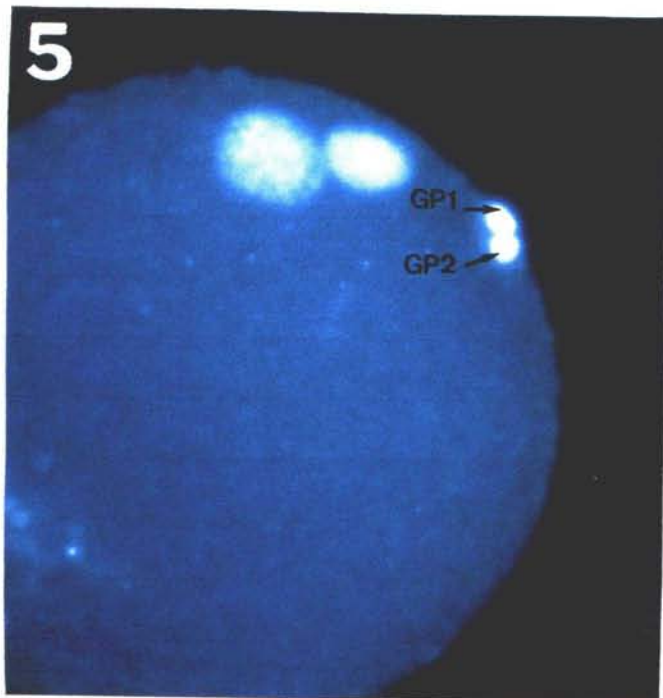
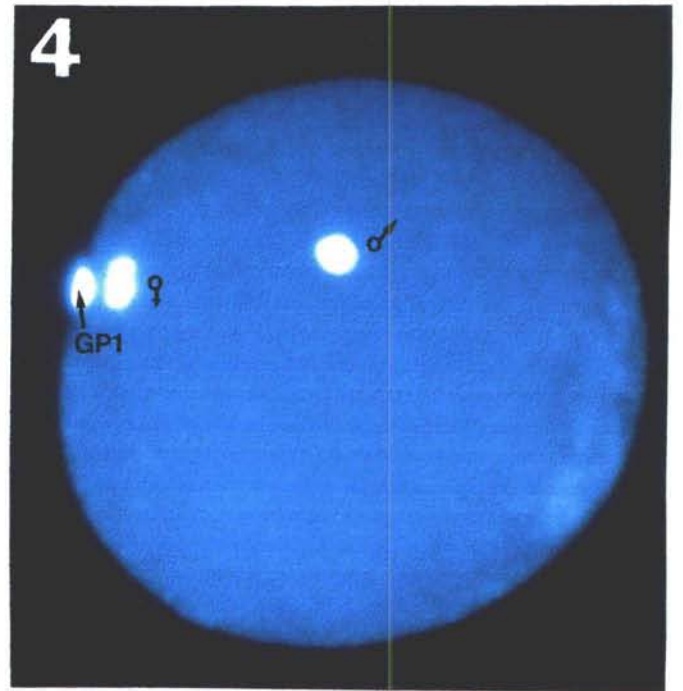
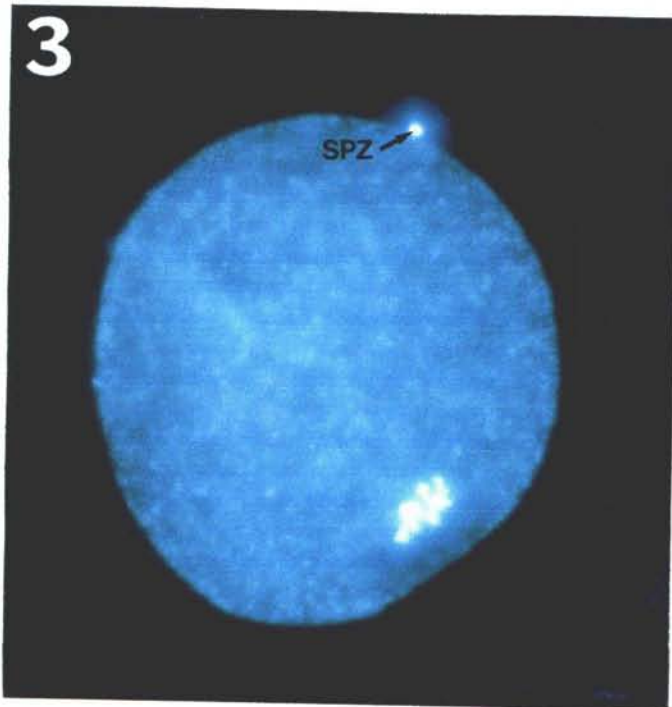
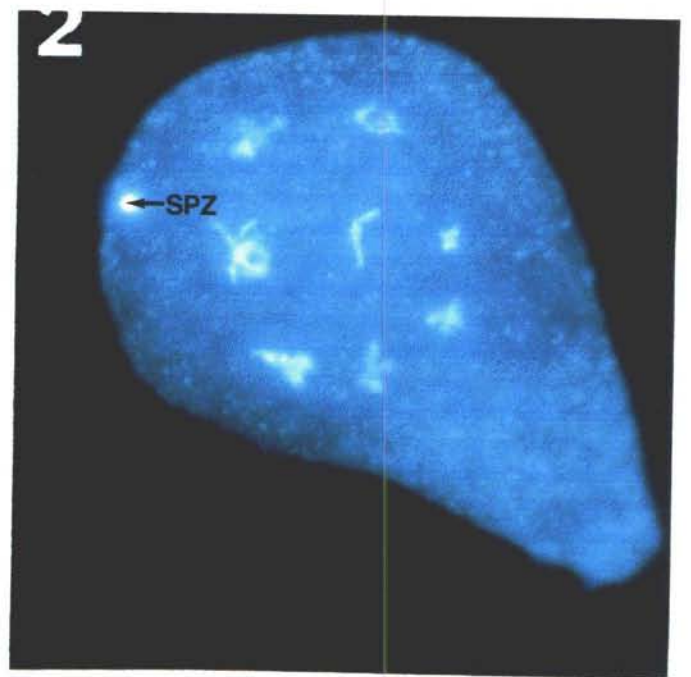
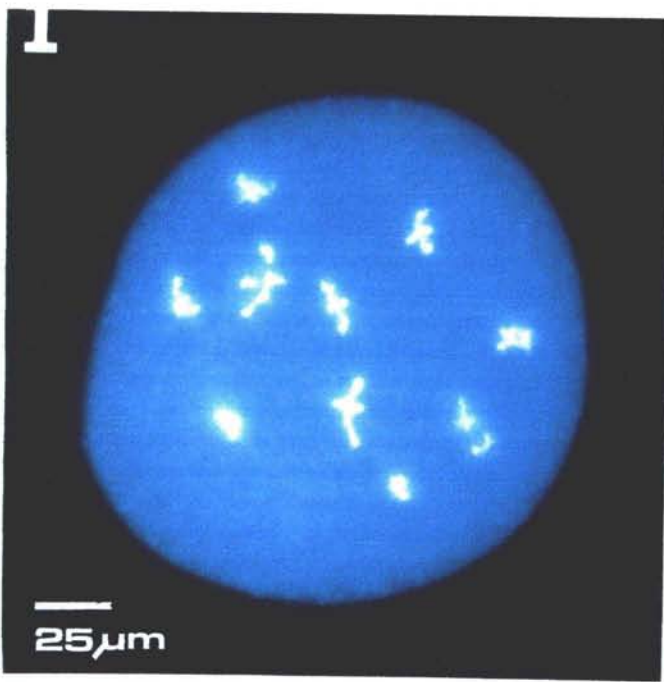
4- Expulsion du premier globule polaire (GP1) :

♂ génome paternel

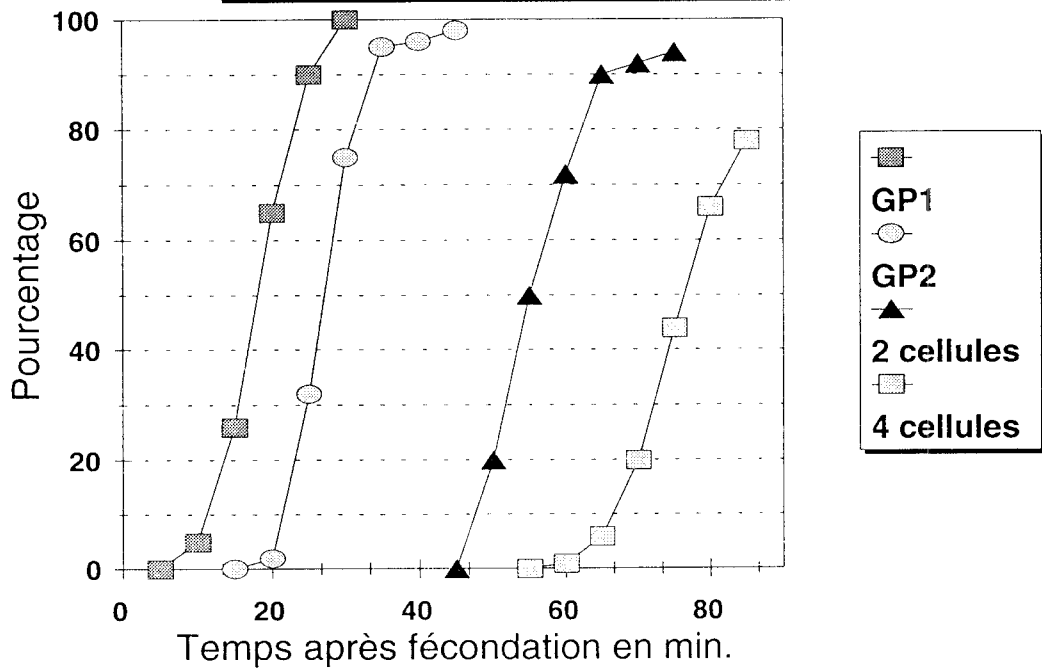
♀ génome maternel

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

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



**Fig.2 : *Crassostrea gigas*
Développement embryonnaire**



4.2. Mise au point d'une nouvelle méthode d'induction de la polypléidie.

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 polypléidie chez les mollusques bivalves.

4.2.1. Principe et avantages de la méthode

La substance utilisée, le 6-diméthylaminopurine (6-DMAP), ne touche pas la synthèse protéique mais seulement les phosphorylations (Néant & 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 à l'eau de mer pour que les protéines se rephosphorylent, les chromosomes se recondensent, et les microtubules se reforment.

Rappelons que les expériences menées en 1991 avaient permis de mettre en évidence les avantages de cette nouvelle méthode d'induction de la triploïdie par rapport à celle classiquement utilisée :

- le 6-DMAP se dissout directement dans l'eau de mer contrairement à la cytochalasine B (CB) qui nécessite un solvant, le DMSO, pour pouvoir être utilisée,
- il ne nécessite pas de phase de rinçage dans un produit particulier pour stopper son action, il suffit de laver les oeufs à l'eau de mer. Par contre, l'effet de la cytochalasine B 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.

4.2.2. Résultats des premiers essais

En 1992, de nouveaux essais ont été menés pour d'une part, mieux cerner les conditions d'application de ce nouveau produit (dose, moment et durée d'application) et d'autre part, comparer les effets respectifs de la CB et du 6-DMAP. Par référence aux travaux portant sur l'influence de la température sur les résultats d'induction à la CB (Downing et Allen, 1987), toutes les expériences ont été effectuées à 25°C.

4.2.2.1 Influence de la dose de 6-DMAP.

Pour cette première expérience, un temps d'application de 15 minutes et une durée de traitement relativement longue (20 minutes) ont été choisis par référence aux essais de l'année 1991 (Gérard *et al.*, 1992) et aux travaux précédents sur la CB. Le Tableau 1 résume les conditions d'application et les résultats obtenus en terme de taux d'éclosion, de pourcentage de triploïdes et de pourcentage de larves normales.

Fig.3 : Crassostrea gigas
Taux d'éclosion / dose de 6-DMAP

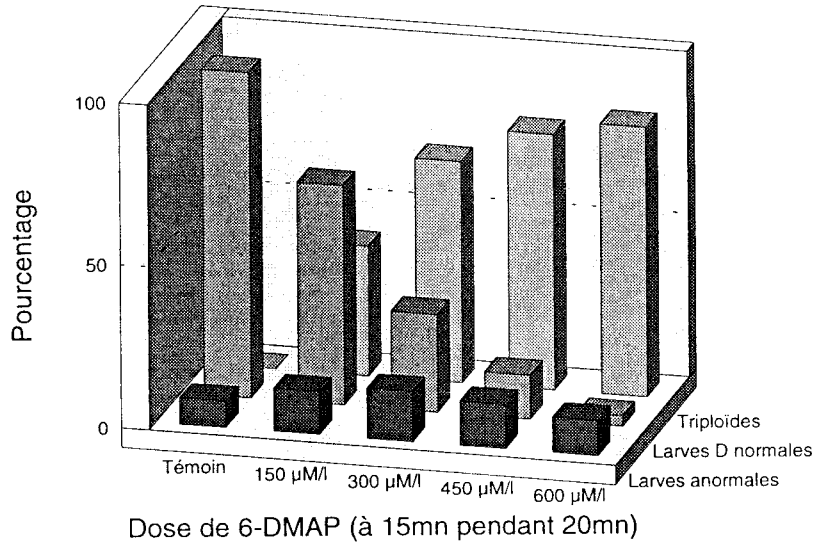
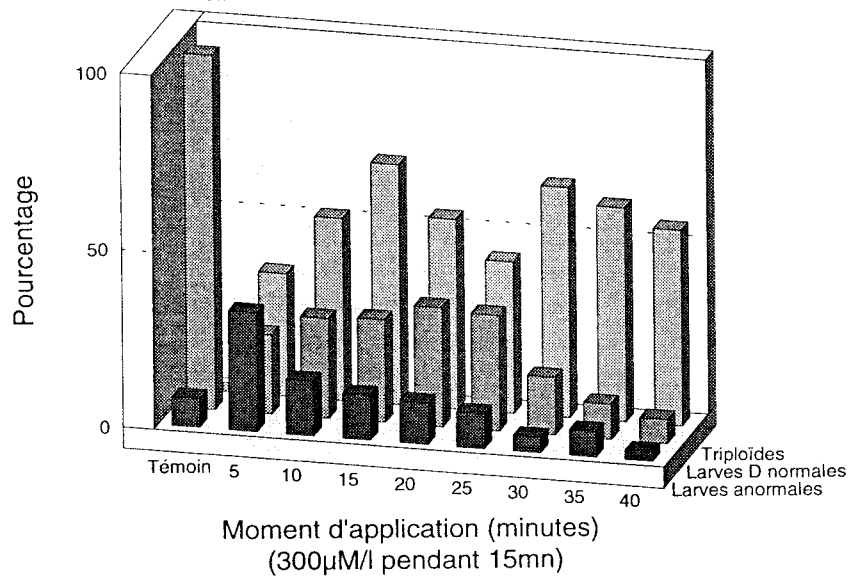


Fig.4 : Crassostrea gigas
Impact du traitement / moment



Elevage CG3N9204	Témoin	3N1	3N2	3N3	3N4
Dose	-	150µM/l	300µM/l	450µM/l	600µM/l
Triploïdes à 24h	-	40%	68%	78%	83%
Taux d'éclosion	73%	49%	22%	10%	2%
Larves normales	100%	67%	30%	14%	3%

Tableau 1 : Induction de la triploïdie par le 6-DMAP chez *Crassostrea gigas* : effet de la dose.

L'analyse du tableau montre clairement que le pourcentage de triploïdes croît avec la dose utilisée, alors que le taux d'éclosion et le nombre de larves normales (% rapporté au témoin, Figure 3) décroît. Le choix d'une dose optimale devra donc découler d'un compromis dont le but sera de maximiser le taux de triploïdes tout en ne réduisant pas excessivement les taux d'éclosion et de larves normales.

4.2.2.2 Effet du moment d'application.

Dans une seconde expérience, l'effet du moment d'application du traitement a été étudié. La même durée d'application a été retenue (20 minutes) et les résultats de l'expérience précédente ont guidé le choix de la dose : 300µM/l.

Elevage CG3N9205	Témoin	3N1	3N2	3N3	3N4	3N5	3N6	3N7	3N8
Moment d'application	-	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min	35 min	40 min
Triploïdes à 24h	-	35%	51%	68%	54%	43%	65%	60%	55%
Taux d'éclosion	73%	16%	21%	21%	25%	24%	12%	7%	5%
Larves normales	100%	22%	28%	29%	34%	33%	16%	10%	7%

Tableau 2 : Induction de la triploïdie par le 6-DMAP chez *Crassostrea gigas* : effet du moment d'application.

Les meilleurs taux de triploïdes ont été obtenus pour des moments d'application de 15 et 30 minutes (Figure 4). De ces deux traitements, celui appliqué 15 minutes après fécondation est le plus performant pour le taux d'éclosion et le taux de larves normales.

4.2.2.3 Effet de la durée d'application.

Dans une troisième expérience, l'effet de la durée d'application du traitement a été étudié. Le moment d'application (15 minutes après fécondation) a été choisie d'après les résultats de l'expérience précédente et la dose est restée la même : 300µM/l. Dans une quatrième expérience, une dose de 450µM/l a été appliquée également 15 minutes après fécondation.

Fig.5 : *Crassostrea gigas*
Impact de la durée du traitement

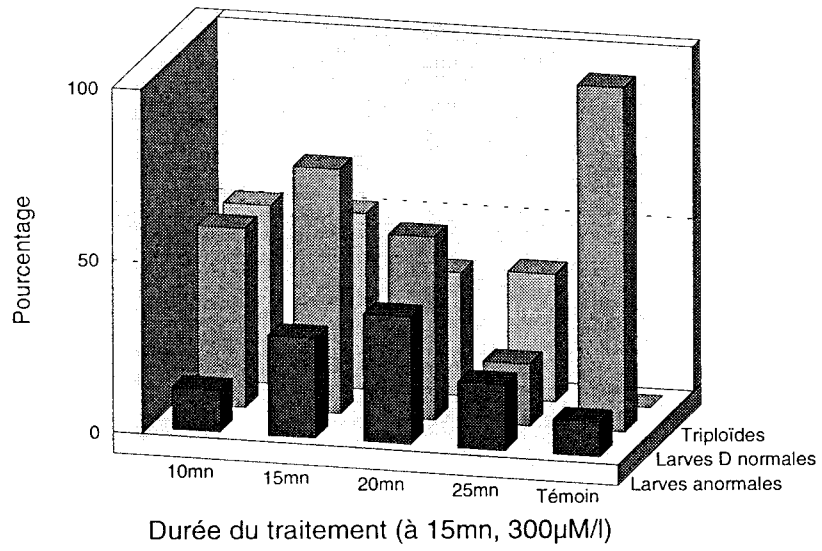
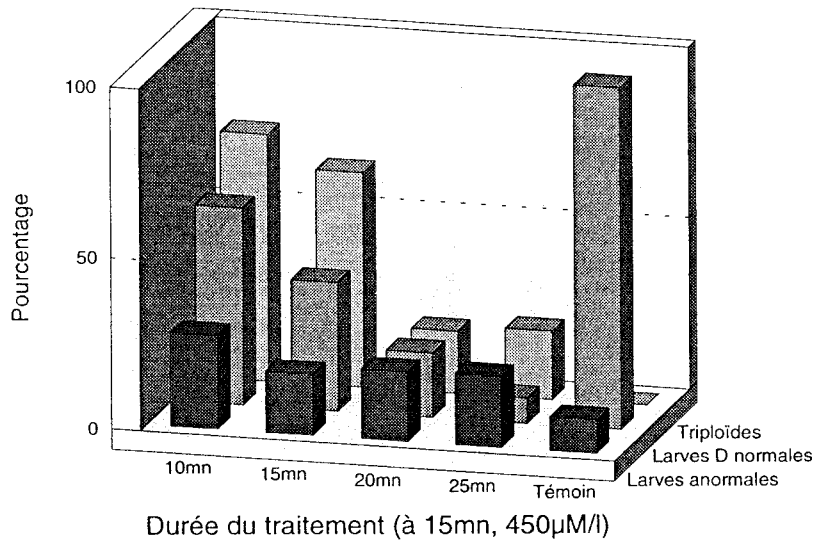


Fig.6 : *Crassostrea gigas*
Impact de la durée du traitement



Elevage CG3N9210	Témoin	3N1	3N2	3N3	3N4
Durée	-	10 min	15 min	20 min	25 min
Triploïdes à 24h	-	52%	51%	36%	37%
Taux d'éclosion	67%	35%	47%	35%	12%
Larves normales	100%	52%	71%	53%	18%

Tableau 3 : Induction de la triploïdie par le 6-DMAP chez *Crassostrea gigas* : effet de la durée d'application pour une dose de 300µM/l.

En terme de pourcentage de triploïdes, les deux premières durées d'application donnent des résultats similaires ainsi que les deux dernières (Figure 5). Les durées courtes (10-15 minutes) donnent les meilleures inductions. Le traitement de 15 minutes donne également le meilleur taux d'éclosion et le meilleur taux de larves normales.

Elevage CG3N9211	Témoin	3N1	3N2	3N3	3N4
Durée	-	10 min	15 min	20 min	25 min
Triploïdes à 24h	-	72%	63%	18%	20%
Taux d'éclosion	67%	38%	25%	13%	5%
Larves normales	100%	58%	38%	19%	8%

Tableau 4 : Induction de la triploïdie par le 6-DMAP chez *Crassostrea gigas* : effet de la durée d'application pour une dose de 450µM/l.

Avec une dose plus forte de 6-DMAP, des relations très nettes apparaissent entre durée faible d'application (10 minutes) et rendement en triploïdes, taux d'éclosion et taux de larves normales (Figure 6). L'association entre dose forte et durée importante de traitement se traduit dès le second traitement par une chute de tous les indicateurs. Cette relation, bien que présente, était moins accentuée avec une dose de 300µM/l.

La première et la quatrième expérience montrent que la dose de 450µM/l donne des résultats intéressants tant en pourcentage de triploïdes qu'en taux d'éclosion et de larves normales. A cette dose les paramètres optimum semblent être une durée d'application de 10 minutes pour un traitement ayant lieu 15 minutes après fécondation. Ces paramètres ont été retenus pour les expérimentations ultérieures.

4.2.2.4 Comparaison des traitements à la CB et au 6-DMAP.

Les paramètres précédents ont été retenus pour l'induction au 6-DMAP (450µM/l, durée de 10 minutes, application à 15 minutes). Pour le traitement à la CB, les paramètres donnant les meilleurs résultats au laboratoire ont été réutilisés : 1mg/l, durée de 15 minutes et application à 20 minutes après fécondation. Par référence aux travaux d'Allen qui suit la chronologie du développement embryonnaire *in vivo* au microscope, et n'applique le produit que lorsque 50% des cellules ont expulsé leur premier globule polaire, le même protocole a été appliqué sur un troisième lot.

Fig.7 : Crassostrea gigas
Timing embryonnaire CG3N9218

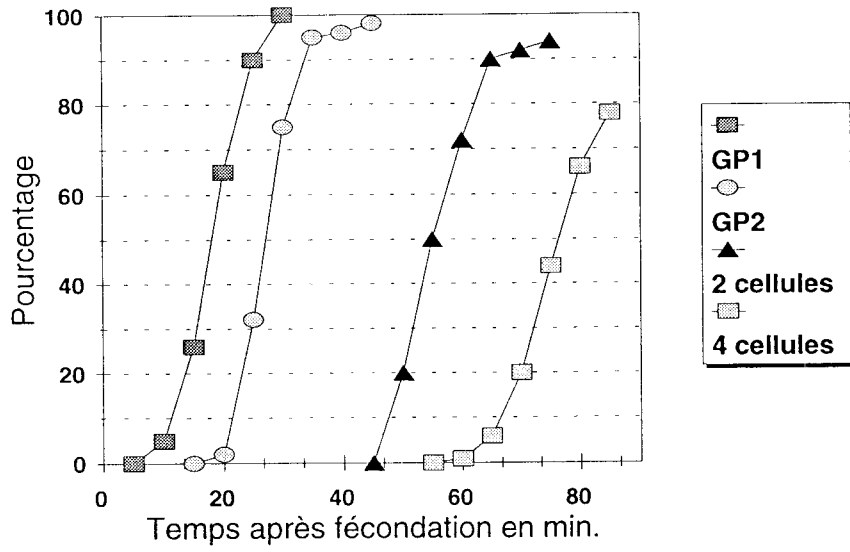


Fig. 8 : Crassostrea gigas
Bilan de l'induction de la triploïdie

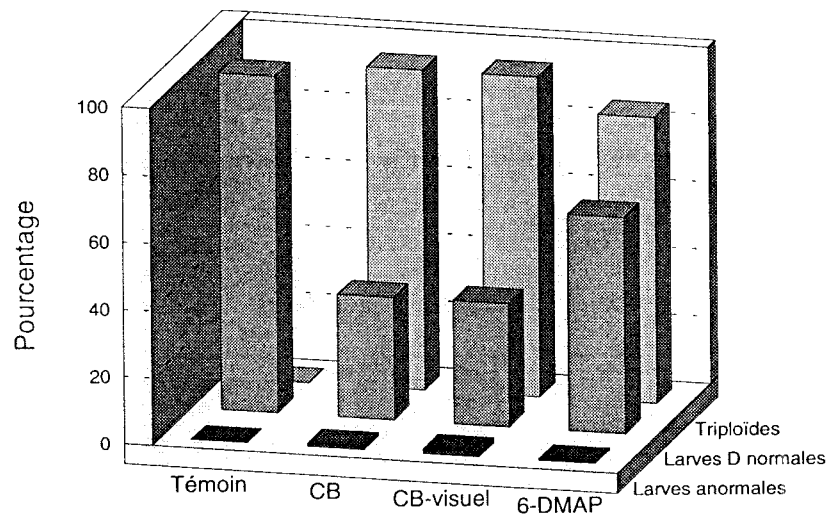


Fig.9 : *Crassostrea gigas*
Survie larvaire de CG3N9218

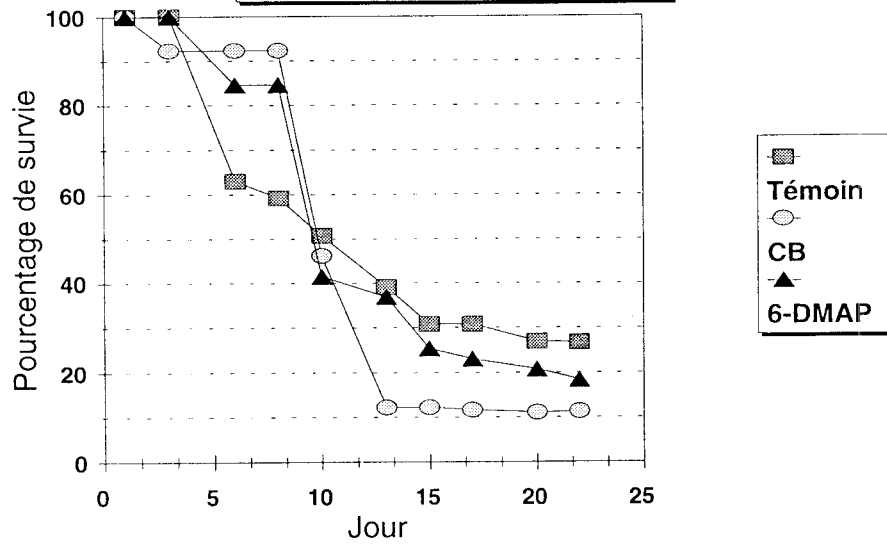
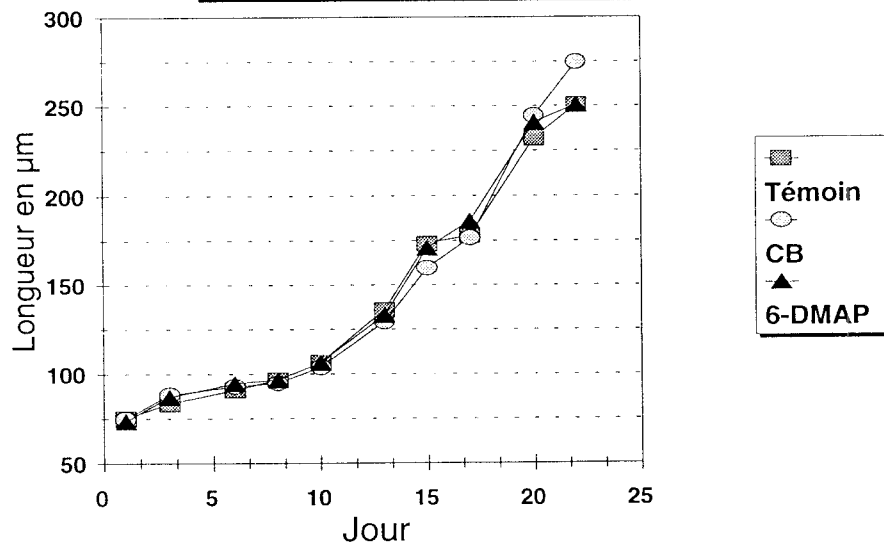


Fig.10 : *Crassostrea gigas*
Croissance larvaire de CG3N9218



Elevage CG3N9218	Témoin	3N1	3N2	3N3
Produit	-	CB	CB	6-DMAP
Dose	-	1mg/l	1mg/l	450µM/l
Moment d'application	-	20 min	17.5 min en visuel	15 min
Durée	-	15 min	15 min	10 min
Triploïdes à 24h	-	95%	95%	85%
Taux d'éclosion	52%	19%	19%	33%
Larves normales	100%	36%	37%	64%

Tableau 5 : Induction de la triploïdie par le 6-DMAP et la CB chez *Crassostrea gigas*.

A 17.5 minutes, 50% des cellules avaient expulsé leur premier globule polaire. La Figure 7 montre qu'entre 15 et 20 minutes après fécondation, seul un très faible pourcentage de cellules avaient déjà expulsé leur second globule polaire (environ 3%). Le décalage de 2,5 minutes pour le moment d'application du traitement à la CB n'a induit aucune différence entre les deux lots pour les trois taux étudiés (Figure 8). Ce résultat est satisfaisant dans la mesure où il permet un allègement de travail par application systématique des traitements à 20 minutes, sans avoir à recourir à un suivi au microscope.

La CB est plus efficace que le 6-DMAP pour ce qui est du taux de triploïdes. Par contre le traitement au 6-DMAP donne un taux d'éclosion supérieur à celui des deux premiers lots et un taux de larves normales presque double. La Figure 9 montre que cette différence persiste durant l'élevage larvaire, la survie des lots traités à la CB étant presque deux fois plus faible que celle du lot traité au 6-DMAP. La croissance n'est par contre pas significativement différente entre les 4 lots (Figure 10).

4.2.3. Résultat des élevages en nurserie à Bouin.

Les lots triploïdes ont été mélangés sans tenir compte de la nature du produit d'induction (CB ou 6-DMAP). Deux lots ont donc été transmis à Bouin le 26 Juin 1992 (à J 59), l'un diploïde, l'autre triploïde. Le prégrossissement s'est étalé sur une période totale de 114 jours. Les conditions d'élevage étaient rigoureusement identiques entre lots diploïde et triploïde quant à la densité par tube tamis et à la ration alimentaire d'eau de mer enrichie en diatomée *Skeletonema costatum*. Le suivi biométrique a été réalisé à partir du 7 Août sur une durée de 73 jours.

La répartition des classes de taille, comprise entre T6 et T18 au début du suivi pour les deux lots (Figure 11), s'est déplacée en classes homogènes de T14 à T25 pour les diploïdes et triploïdes, avec un très fort pourcentage pour la plus forte classe de taille (95,5%). Il faut noter cependant que le poids moyen de classe T25 pour les triploïdes était largement supérieur à celui des diploïdes.

Ainsi, malgré une apparente similarité de distribution des classes pour les deux populations, les courbes d'évolution du poids (Figure 12) et de la taille (Figure 13) mettent clairement en évidence, et de façon significative, la plus forte croissance moyenne des triploïdes dont le poids final atteint 17,59g contre un poids final pour les diploïdes de 12,98g. Cette tendance est respectée pour le poids de chair et le pourcentage de matières organiques (Tableau 6), mais demeure beaucoup plus faible et non-significative. Ceci tendrait à montrer que la différence de poids se ferait, à ce stade de croissance, surtout au profit du poids de coquille pour les triploïdes par rapport aux diploïdes.

Fig. 11 : *Crassostrea gigas*
Répartition des classes de taille

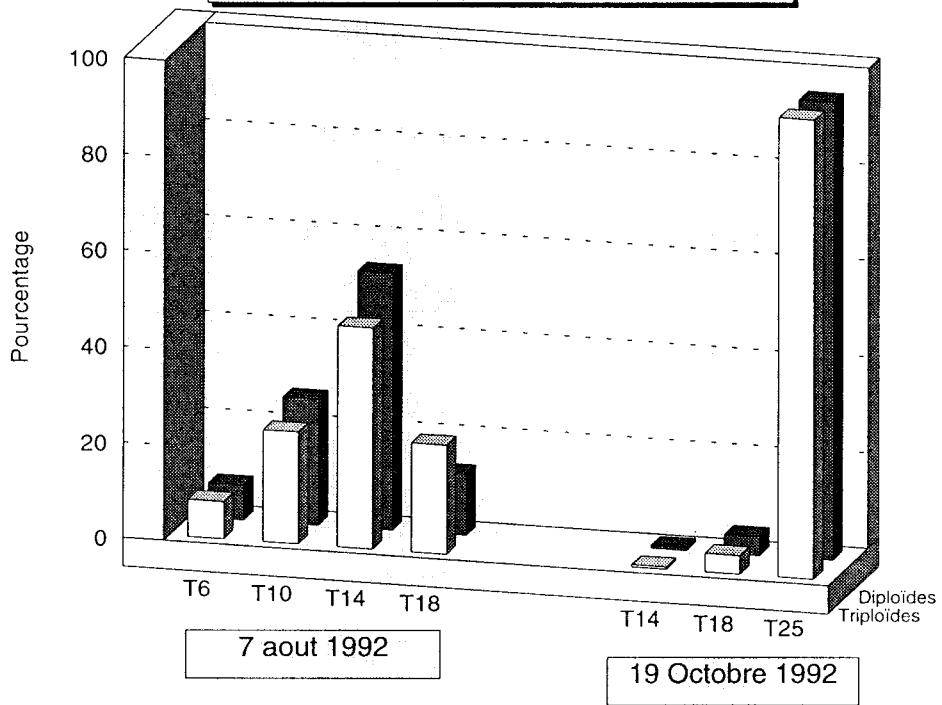


Fig.12 : *Crassostrea gigas*
Evolution du poids moyen

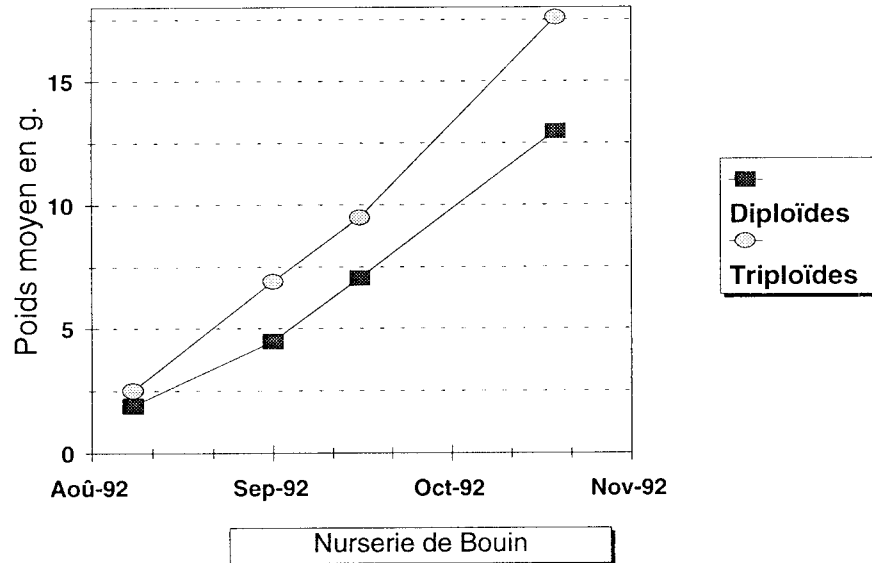
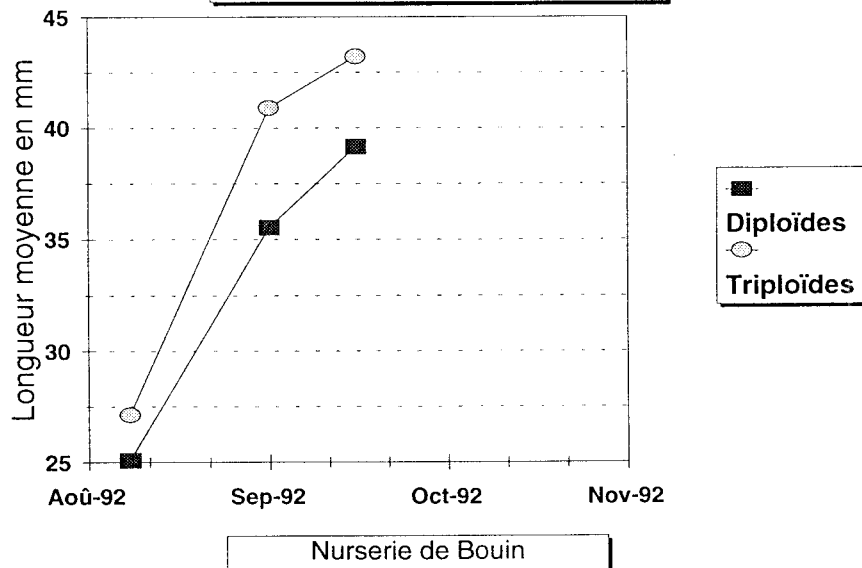


Fig.13 : *Crassostrea gigas*
Evolution de la taille moyenne



Diploïdes		Triploïdes	
Poids de chair sèche (en mg)	% Organique	Poids de chair sèche (en mg)	% Organique
116.55 (7.59)	87.34 (1.34)	122.00 (9.21)	88.99 (0.39)

Tableau 6 : Pourcentage organique de la matière sèche des huîtres creuses *Crassostrea gigas* diploïdes (poids moyen de 16,7g) et triploïdes (poids moyen de 21,8g) au 6 Novembre 1992.

Enfin, les taux cumulés de mortalité (20,68% et 14,38% pour les triploïdes et les diploïdes respectivement) se situent à un niveau habituel pour cette phase d'élevage et ne permettent pas de tirer de conclusions, même si les triploïdes semblent subir une mortalité légèrement plus forte au cours de cette phase de prégrossissement.

4.2.4. Conclusions et perspectives.

Entre les premières et les dernières expériences, une amélioration du taux de triploïdes obtenus par induction au 6-DMAP a été observée. Cette amélioration est due à une meilleure connaissance des paramètres d'induction mais également à un meilleur contrôle de la maturation des géniteurs et de la fécondation. Une optimisation reste néanmoins nécessaire, le but étant de s'approcher le plus possible des 100% de triploïdes. Cette optimisation fera, en 1993, l'objet d'une expérience d'optimisation de traitements, en utilisant les outils statistiques des plans d'expériences.

4.3. 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), et poursuivis en 1992 dans le cadre de la mise au point des protocoles d'induction de la triploïdie par le 6-DMAP.

4.3.1. Cinétique du développement embryonnaire

Le moment optimal d'application de la cytochalasine B (CB) ou du 6-DMAP pour une température donnée, est en partie déterminé par l'étude de la cinétique du développement embryonnaire précoce jusqu'au stade 2 cellules.

Les courbes de cinétique embryonnaire pour les deux élevages sont présentées dans les Figures 14 et 15.

4.3.2. Essai de triploïdisation

Les données des deux expériences de triploïdisation menées pendant l'année 1992 sont consignées dans le Tableau 7 et illustrées dans la Figure 16a et 16b.

Référence élevage	Date	Température	Produit	Dose	Moment d'application en minutes	Durée d'application en minutes	% de triploïdes analyse d'image
RD3N9228	23/06/92	25°C	6-DMAP	450µM/l	10 min	10 min	12
						15 min	39
			CB	1mg/l	15 min	15 min	95
					20 min	94	
RD3N9231	21/07/92	25°C	6-DMAP	450µM/l	10 min	10 min	10
						15 min	43
			CB	1mg/l	15 min	15 min	86
					20 min	95	

Tableau 7 : Bilan des inductions de la triploïdie chez *Ruditapes decussatus*

Les expériences menées en 1991 ont montré qu'une dose d'1mg/l de cytochalasine B (CB) n'est pas forcément plus efficace sur le taux de triploïdes qu'une dose de 0.5mg/l (Gérard *et al.*, 1992), confirmant en cela d'autres résultats obtenus par Beaumont et Contaris (1988). En 1992, les expériences ont néanmoins été menées en utilisant la première dose, par soucis de comparaison avec d'autres travaux effectués sur la palourde japonaise par Dufy et Diter (1990). Entre 1991 et 1992 et pour des doses équivalentes, une nette amélioration du taux de triploïdes a été obtenue : alors que ce taux ne dépassait pas les 70% en 1991 (Gérard *et al.*, 1992), il atteint dans les deux expériences le chiffre de 95%. L'influence de la durée du traitement ne semble pas déterminante (dans la fourchette réduite de la durée explorée) dans la mesure où il n'y a pas de différence significative entre les deux lots pour la première expérience et où il y a inversion des résultats entre la première et la seconde expérience : le meilleur pourcentage est obtenu pour une durée d'application de 15 minutes dans l'expérience 1 et pour une durée de 20 minutes dans l'expérience 2. Dans ces deux cas, les performances enregistrées sont associées aux meilleurs taux de larves normales (76 et 87%).

Fig. 14 : *Ruditapes decussatus*
Timing embryonnaire RD3N9228

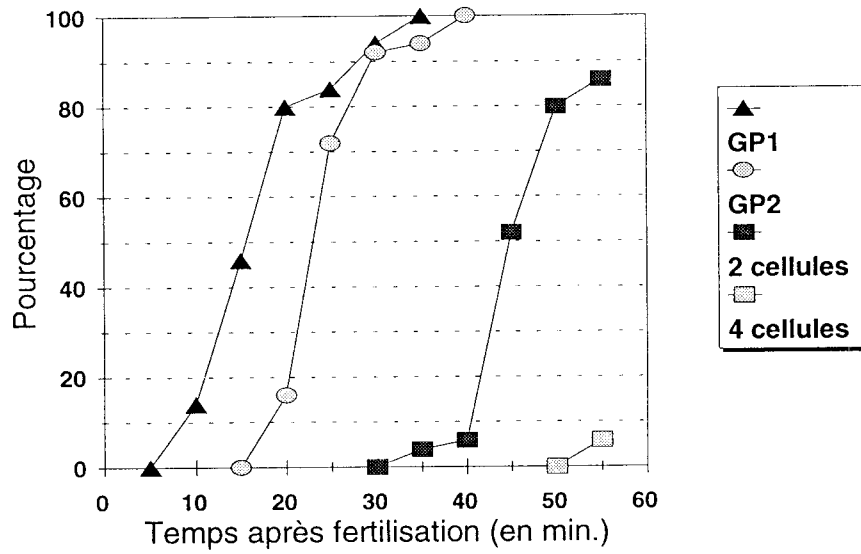
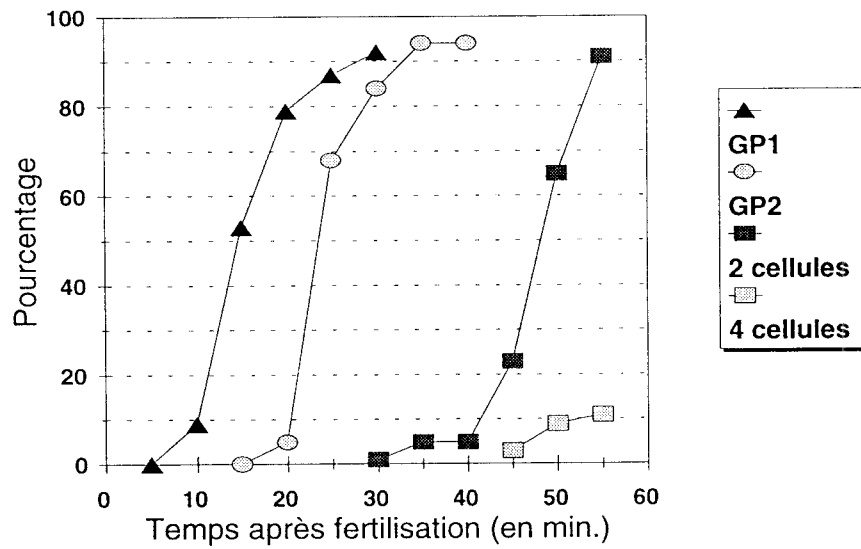


Fig. 15 : *Ruditapes decussatus*
Timing embryonnaire RD3N9231



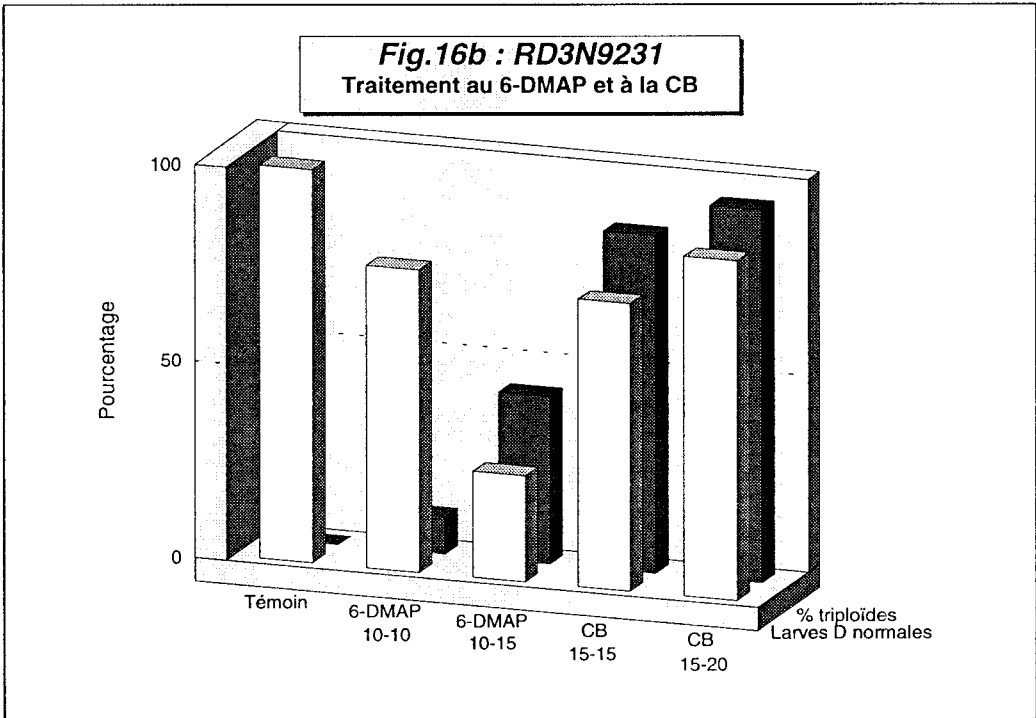
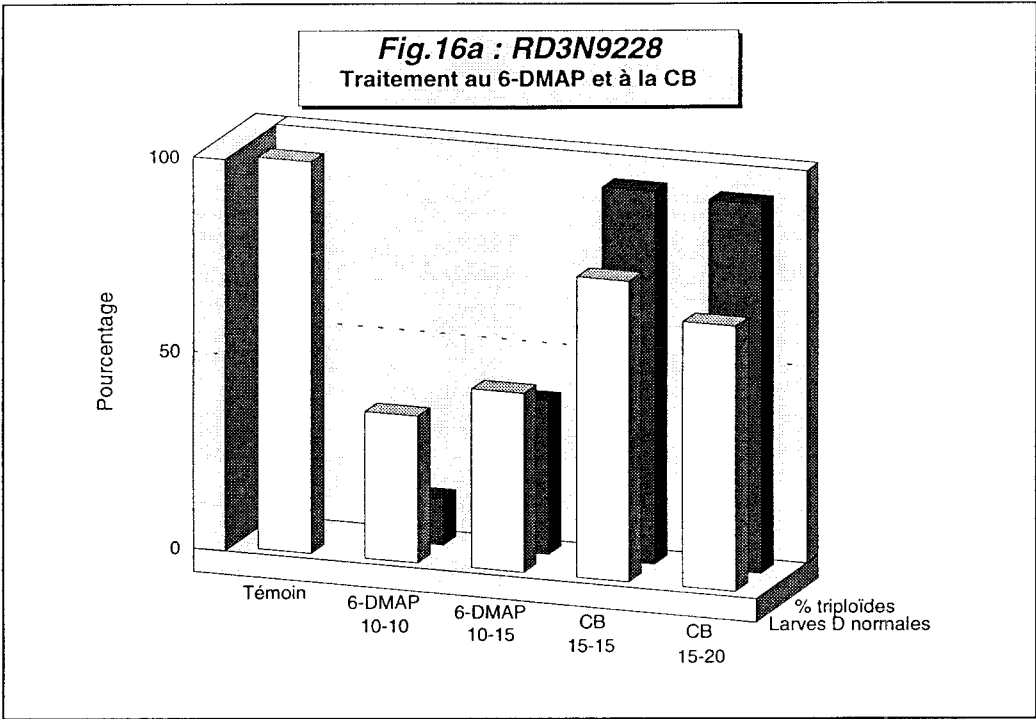


Fig. 17 : *Ruditapes decussatus*
Croissance larvaire RD3N9228

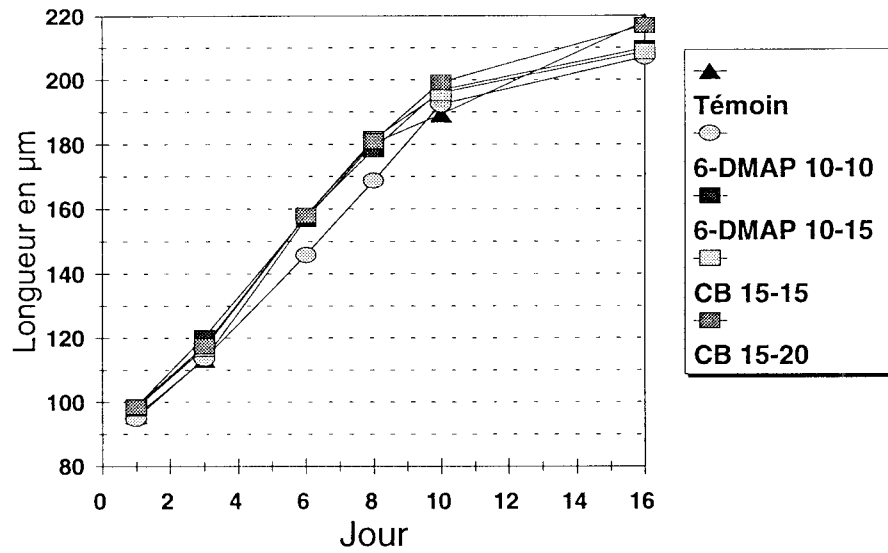
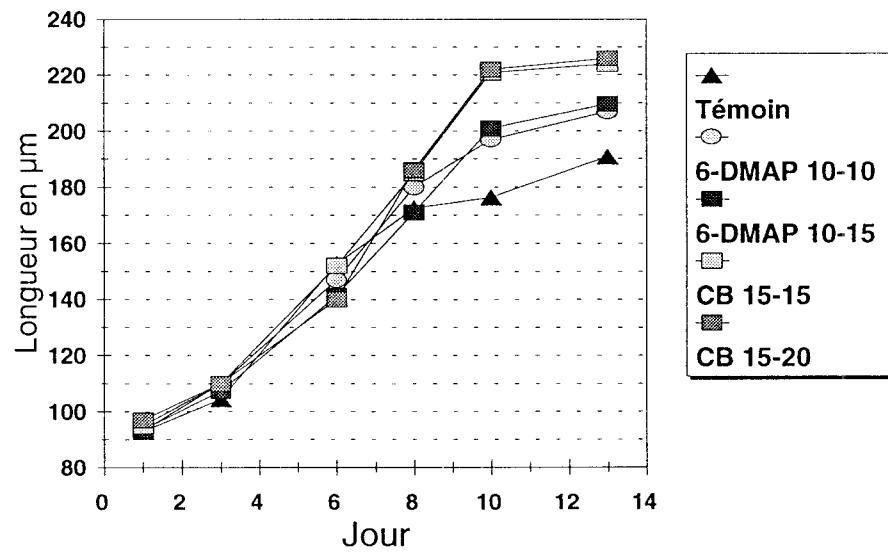


Fig. 18 : *Ruditapes decussatus*
Croissance larvaire RD3N9231



Contrairement aux expériences menées sur *C. gigas*, la comparaison des résultats obtenus par induction à la CB et induction au 6-DMAP est en faveur du premier produit. L'induction au 6-DMAP donne à la fois les taux de triploïdes les plus faibles (entre 10 et 43%) et les taux de survie également parmi les plus faibles (entre 27 et 45% pour 3 des 4 lots étudiés). Par contre, le pourcentage de triploïdes semble être fonction de la durée d'application du traitement, ce qui n'était pas le cas pour la CB dans les mêmes expériences : dans le cas du 6-DMAP, les meilleurs pourcentages ont été obtenus pour des durées d'application de 15 minutes. Quant au taux de larves normales, il ne semble suivre aucune tendance particulière sur le domaine exploré.

4.3.3. Elevages larvaires et post-larvaires

Pour la première expérience, tous les lots présentaient des croissances larvaires comparables. Par contre, les lots traités à la CB se sont caractérisés par des taux de métamorphose très faibles. Pour la seconde expérience, la croissance larvaire des lots traités à la CB était supérieure à celle des lots traités au 6-DMAP et à celle du témoin qui s'est révélée être la plus lente (Figures 17 et 18).

Pour les deux expériences, des mortalités très importantes ont été enregistrées en micronurserie entre 500 et 800µm, tant sur les lots témoins que sur les lots traités, et les élevages n'ont donc pas pu être poursuivis. Il semblerait que ces problèmes, rencontrés par d'autres écoseurs, soient en partie dus à la période tardive d'élevage.

4.3.4. Bilan provisoire et perspectives.

Des résultats satisfaisants ont été obtenus par induction à la CB mais une optimisation du traitement par le 6-DMAP reste nécessaire : en 1993 les études devront porter sur les effets, pour ce nouveau produit, de la dose, du moment d'application et de la durée du traitement. Il s'agira en particulier de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus en 1992 quant à la comparaison des deux produits d'induction, et à la réaction très spécifique, par rapport à *C. gigas*, de *R. decussatus* à ces deux produits. Des améliorations au niveau zootechniques sont également nécessaires : une première réponse pourra être apportée en programmant les prochaines expériences pour le printemps et non pour le début de l'été.

4.4. Mise en place du contrôle de performances biologiques pour les populations diploïdes et triploïdes d'*Ostrea edulis*.

Au mois de mai 1992, après une période de prégrossissement de quelques mois et une vérification des taux de ploïdie par imagerie numérique, les huîtres plates diploïdes et triploïdes produites en juillet 1991 (Gérard *et al.*, 1992) ont été transférées dans les stations IFREMER de Palavas et de La Trinité-sur-mer, pour tester leur performances biologiques.

En raison de mortalités enregistrées pendant l'hiver, causées par un dégagement toxique des nouvelles bâches des bassins de réserve d'eau de mer à La Tremblade, seul un lot comprenant un mélange de diploïdes, de diploïdes réfractaires au traitement et de triploïdes, a pu être constitué pour réaliser ce suivi biologique. Ce lot a été divisé en deux sous-lots de 2000 individus qui ont été implantés courant mai 1992 à La Trinité-sur-mer (4 poches de 500 à 5 mètres de profondeur) et à Palavas (4 poches de 500 à 20 mètres de profondeur).

Si des différences doivent être observées entre les diploïdes et les triploïdes, elles le seront surtout après une période de maturation. En conséquence, le protocole de suivi (Annexe II) prévoit un rythme très lâche d'échantillonnage pendant la première année et un contrôle soutenu la deuxième année.

Différents paramètres sont étudiés :

Paramètres biométriques :

- poids total
- poids frais de la chair
- poids sec de la chair après lyophilisation
- poids coquille sèche (24h à l'étuve à 60°C)
- indice de condition de Lawrence et Scott

Paramètres biochimiques :

- protides
- lipides
- glucides totaux
- glycogène

Ploïdie : elle est déterminée par analyse d'image sur des empreintes branchiales effectuées à partir de chaque animal prélevé. Elle permet *a posteriori* de reclasser les huîtres en populations diploïde et triploïde.

Pathologie : la recherche de parasites (*Bonamia* et *Marteilia*) est réalisée par La Trinité pour leurs propres prélèvements, et par l'URPIG de La Tremblade pour les huîtres de Palavas. Ces analyses sont effectuées à partir de frottis cardiaques.

Mortalité : elle est estimée trimestriellement.

4.5. Résultats du contrôle des performances biologiques pour les populations diploïdes et triploïdes de *Ruditapes philippinarum*.

4.5.1. Rappel des protocoles

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 ont été expédiées dans trois sites du littoral français en vue de réaliser un contrôle de leurs performances biologiques (Gérard, 1991 ; Gérard *et al*, 1992).

Les trois sites qui ont été 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 Brouenou (Finistère).

Les deux premiers ont fait l'objet d'une étude expérimentale selon un même protocole de suivi biologique (Annexe III). Le troisième site avait 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 expériences réalisées à Oléron et dans le Morbihan, différents paramètres ont été étudiés : la croissance et la mortalité, les indices de condition et les rapports allométriques, les constituants biochimiques (protides, lipides, glucides et glycogène). Des prélèvements particuliers ont été réalisés pour l'étude histologique de la reproduction, chaque analyse étant bien entendu rapportée à la ploïdie de l'animal, déterminée par imagerie numérique. L'apparition de l'anneau brun a également été recherchée sur les palourdes ouvertes lors des différents prélèvements.

Dans ce document seront surtout détaillés les résultats du suivi au niveau de Marennes-Oléron. Un résumé des principales conclusions du suivi de La Trinité-sur-Mer sera également fourni, l'élevage au niveau de Brouenou n'étant pas encore achevé.

4.5.2. Suivi des performances biologiques à Marennes-Oléron

Conditions d'élevage

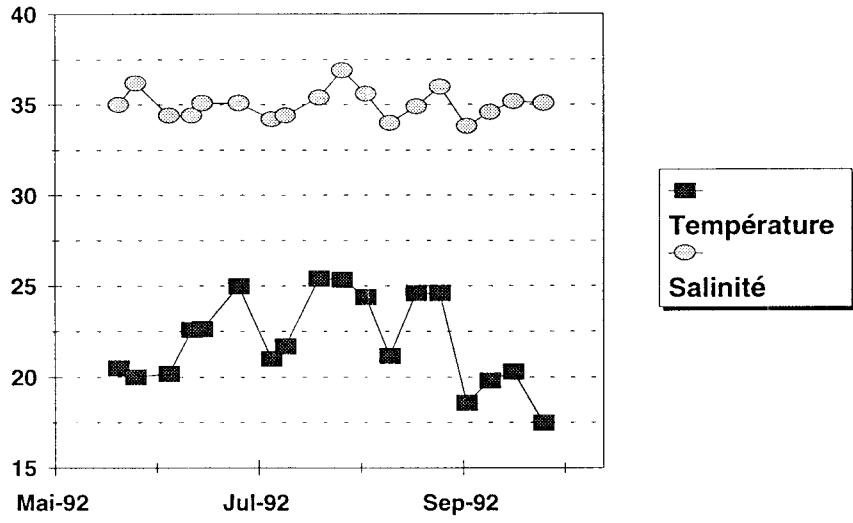
Le Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREEA), situés dans l'île d'Oléron, a réalisé l'élevage en claire sous filet à raison de 120 individus par m² pendant la première année. Après une pêche totale du naissain le 15/04/92, les palourdes ont été ressemées à une densité de 78 au m² sous filet.

Le CREEA a également assuré le suivi hydrologique, l'estimation de la croissance et des taux de survie.

Evolution des paramètres hydrologiques

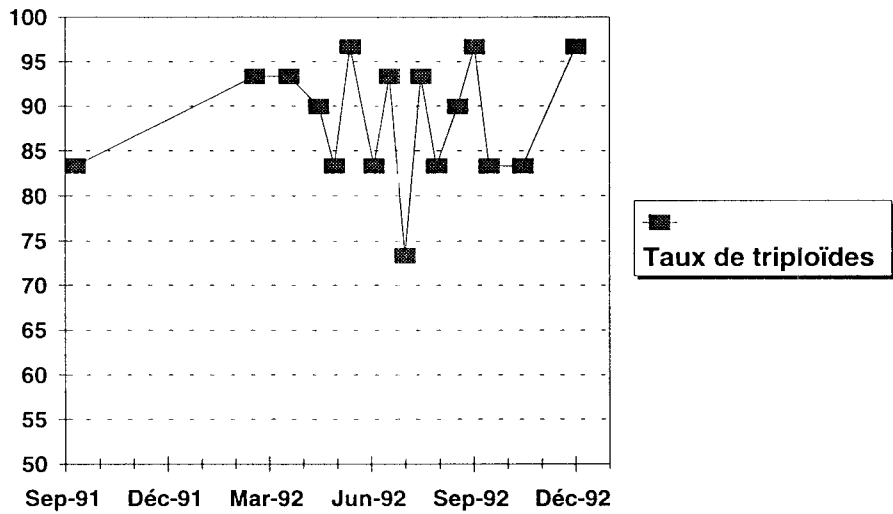
Les paramètres hydrologiques, recueillis pendant les périodes printanière et estivale de 1992 (Figure 19), montrent une relative constance des salinités et une évolution normale des températures.

Fig.19 : *Ruditapes philippinarum*
Données hydrologiques



Marennes-Oléron : CREAA

Fig.20: *Ruditapes philippinarum*
Evolution du taux de triploïdes



Marennes-Oléron : CREAA

Evolution du taux de triploïdes

Le taux de triploïdes dans les échantillons de 30 palourdes du lot "triploïde" a peu fluctué au cours des prélèvements (Figure 20) et les valeurs extrêmes, 73.3% et 96.7%, encadrent bien la valeur de 86% trouvée sur un échantillon de 100 palourdes au moment du semis sous filet. On notera toutefois que le taux de triploïdie moyen de 88.5% sur la période d'élevage est à la fois légèrement supérieur à la valeur déterminée au moment du semis (86%), et nettement supérieur au contrôle effectué au début de l'élevage larvaire (76.4%).

Evolution des paramètres biométriques

Les principaux résultats biométriques, illustrés dans les Figures 21 à 26, font apparaître une croissance en taille sensiblement équivalente pour les palourdes diploïdes et triploïdes, les diploïdes étant en général légèrement plus épaisses que les triploïdes. Si la croissance a été très satisfaisante la première année sur ce site (10 à 11g pendant l'hiver 1991-92), elle a été particulièrement décevante la deuxième année (seulement 16 à 18g en fin d'élevage).

Au niveau des poids frais et sec de chair (Figures 25 et 26), un avantage très net est enregistré en faveur des diploïdes pendant tout l'élevage. La maturation, se traduit chez les diploïdes, par une forte augmentation de poids entre juin et août, et l'effort de ponte par une baisse significative de ce même paramètre en juin et à la fin août. L'impact de la triploïdie sur la gamétogenèse est ici parfaitement visible, aucune variation brutale dans l'augmentation du poids de chair n'étant observée dans le lot triploïde.

Indices de condition et paramètres biochimiques

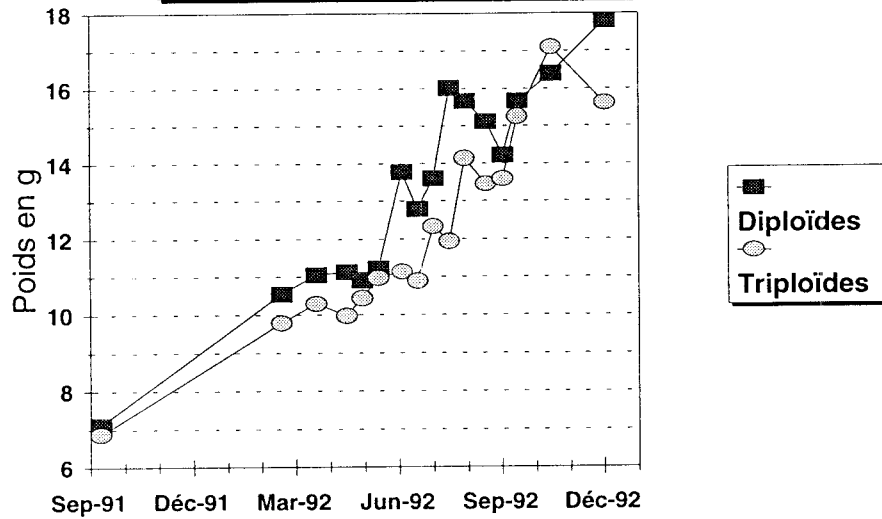
Une importante diminution des deux indices de condition (Figures 27 et 28) est enregistrée pendant l'hiver 1991-1992, preuve d'un affaiblissement très net des palourdes, qu'elles soient diploïdes ou triploïdes. Les indices du lot diploïde demeurent toujours supérieurs à ceux du lot triploïde, et illustrent parfaitement l'effet de la gamétogenèse et de la ponte.

L'évolution des paramètres biochimiques est présentée dans les figures 29 à 32 en pourcentage de chair sèche. Entre septembre 1991 et juin 1992, une diminution progressive des teneurs en protéines est observée (Figure 29), elles passent de 45% à 38% chez les diploïdes, et de 44% à 37% chez les triploïdes. A partir du mois de juin, ces teneurs augmentent rapidement chez les triploïdes pour atteindre 45% de la matière sèche en novembre, alors qu'elles restent à peu près stables chez les diploïdes.

L'évolution des lipides présente d'importantes fluctuations. Celles-ci sont facilement interprétables dans le cas des diploïdes, puisque la teneur en lipides est représentative de la gamétogenèse (Gouletquer, 1989), les deux chutes brutales de la fin juin et de la fin août correspondent certainement à des émissions de gamètes. Chez les triploïdes, la teneur en lipides est très faible à la sortie de l'hiver (4,2% en mars 91), signe d'une utilisation active des réserves lipidiques. Une remontée brusque de la teneur en lipides est enregistrée pendant la période printanière et des fluctuations sont constatées pendant la période estivale, qui peuvent difficilement être reliées à des émissions gamétiques.

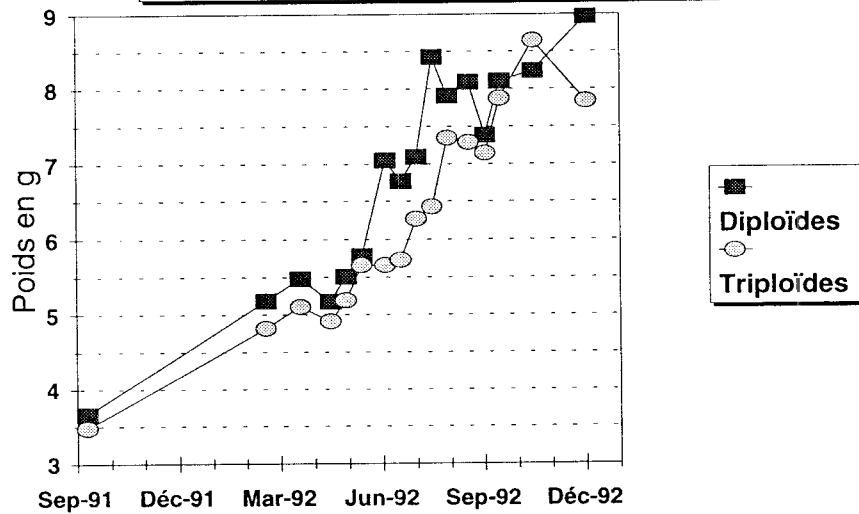
Une phase d'accumulation de sucres est observée simultanément chez les diploïdes et les triploïdes pendant le printemps, ces sucres sont principalement constitués par du glycogène. Cette évolution de la teneur en sucre concordent avec les résultats obtenus par Gouletquer (1989) à Marennes-Oléron, mais elles sont ici nettement plus faibles : 4.5% au maximum pour 12% dans le meilleur site étudié par Gouletquer. Les palourdes n'ont pratiquement pas de réserves glucidiques pendant l'automne et l'hiver, ce qui les différencie totalement de *Crassostrea gigas*. Aucun effet de la triploïdie n'est enregistré au niveau des réserves en glycogène.

**Fig.21 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution du Poids total**



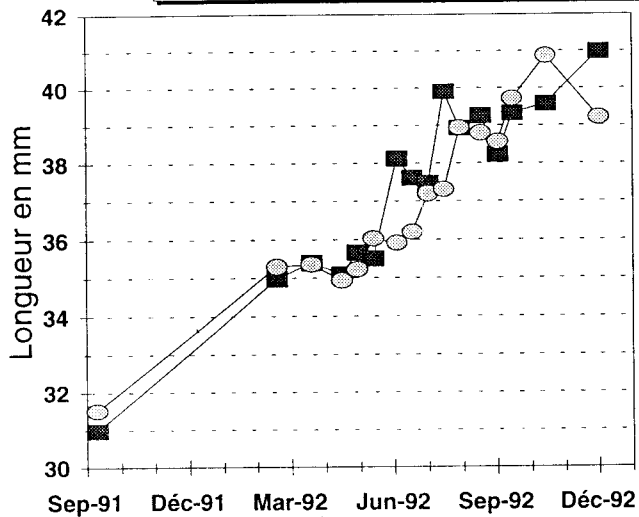
Marennes-Oléron : CREAA

**Fig.22 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution du Poids de coquille sèche**



Marennes-Oléron : CREAA

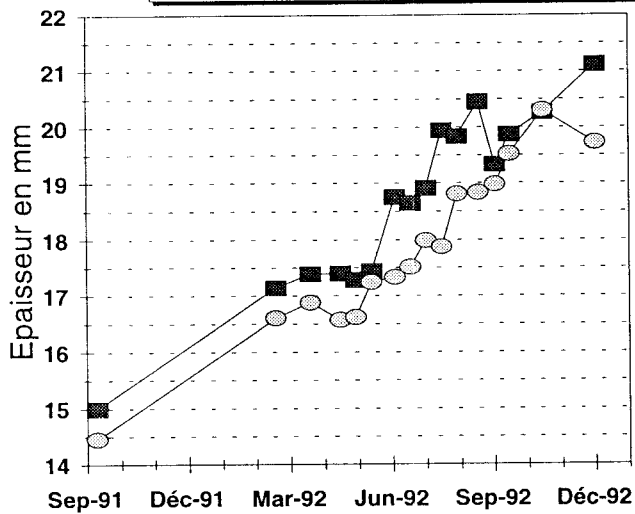
Fig.23 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution de la longueur



■ Diploïdes
○ Triploïdes

Marenes-Oléron : CREA

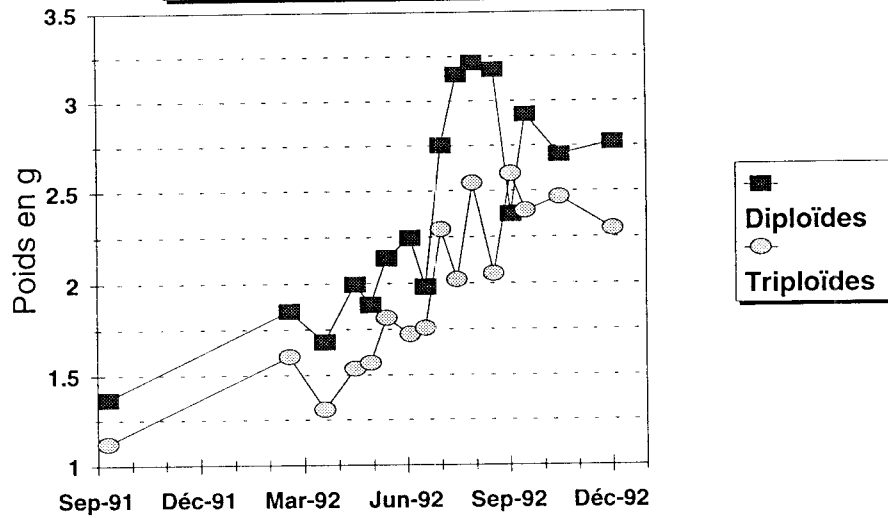
Fig.24 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution de l'épaisseur



■ Diploïdes
○ Triploïdes

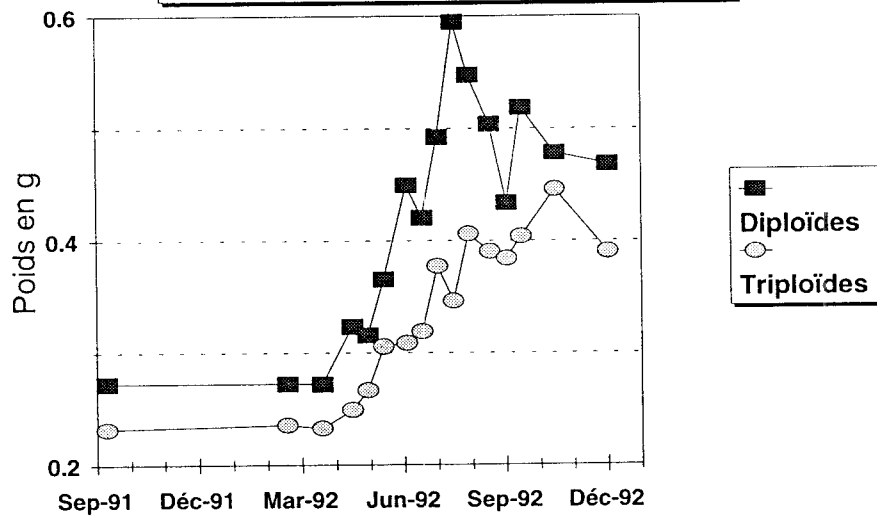
Marenes-Oléron : CREA

**Fig.25 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution du poids frais de chair**



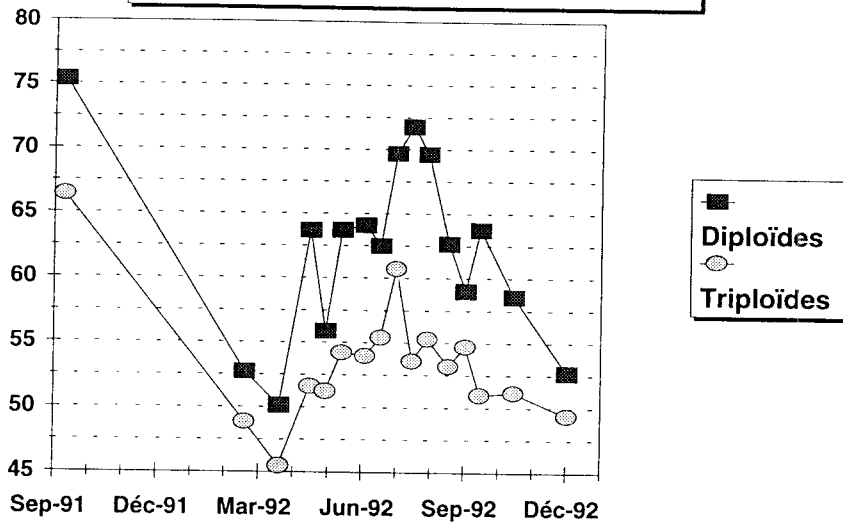
Marenes-Oléron : CREA

**Fig.26 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution du poids sec de chair**



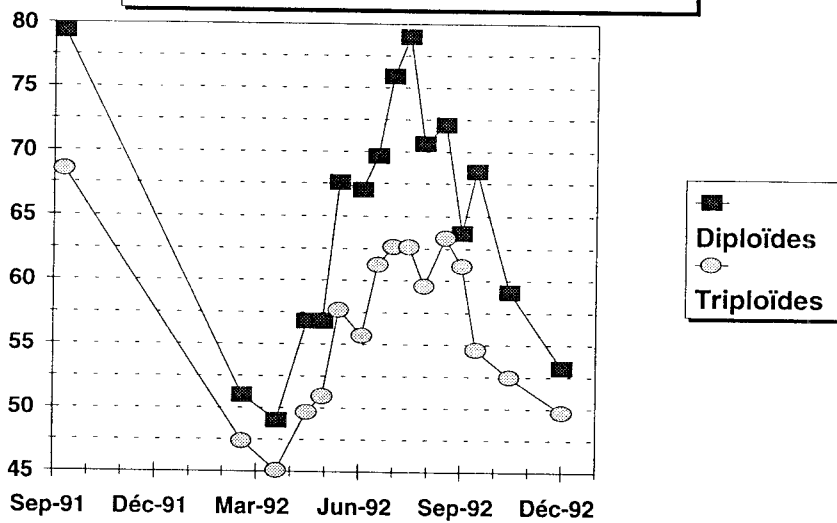
Marenes-Oléron : CREA

**Fig.27 : *Ruditapes philippinarum*
Indice poids sec / coquille sèche**



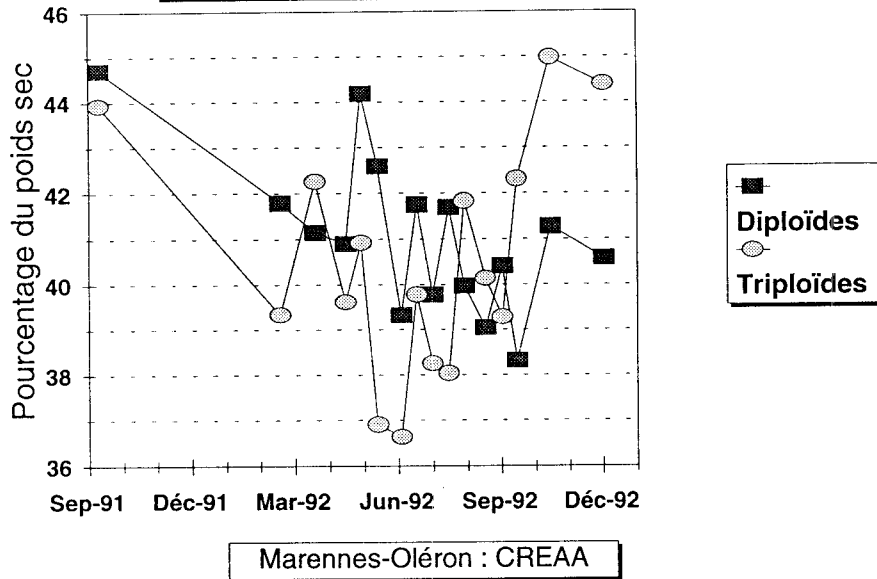
Marennes-Oléron : CREA

**Fig.28 : *Ruditapes philippinarum*
Indice de Lawrence et Scott**



Marennes-Oléron : CREA

**Fig.29 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution du taux de protéines**



**Fig.30 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution du taux de lipides**

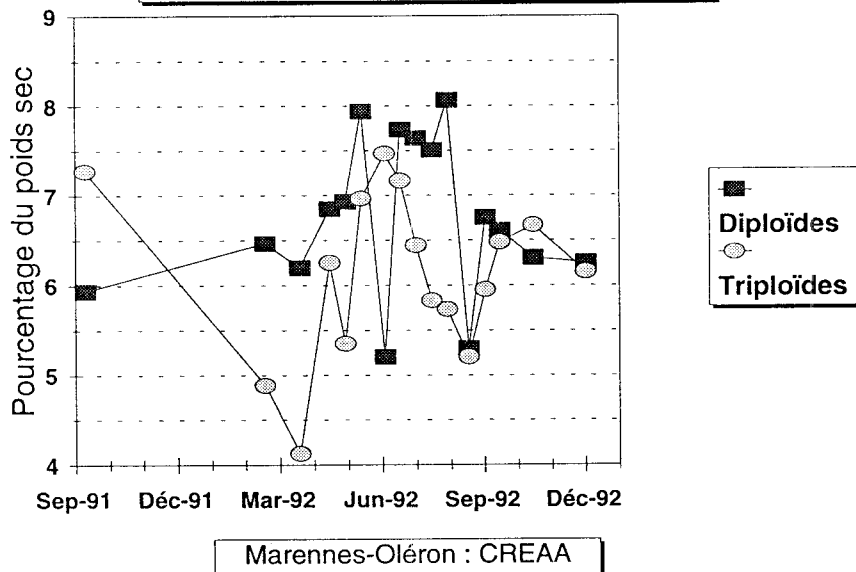
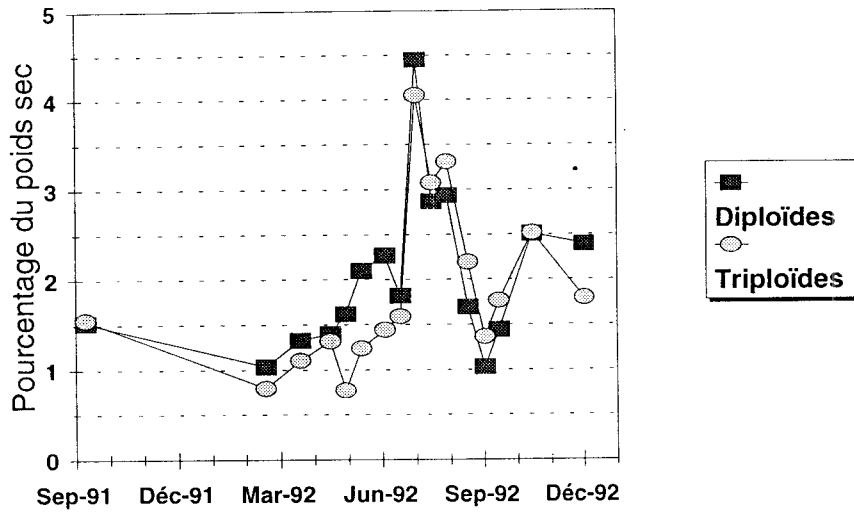
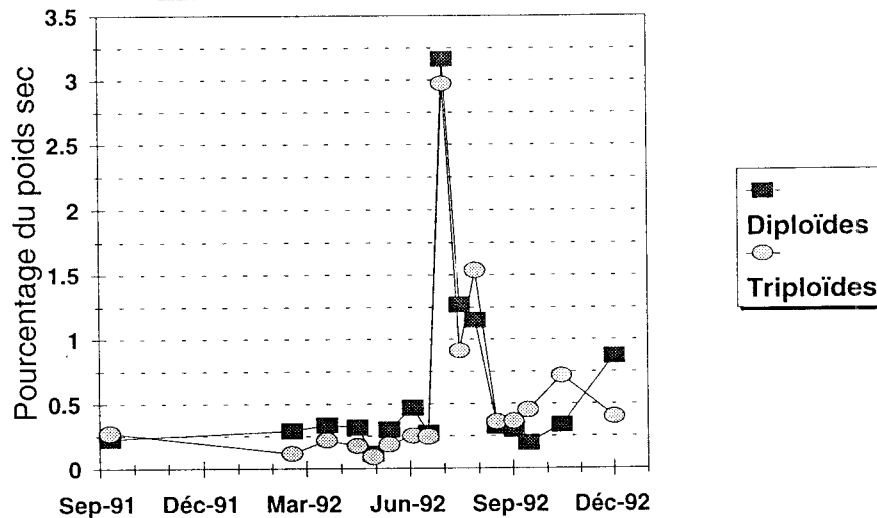


Fig.31 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution du taux de glucides



Marennes-Oléron : CREA

Fig.32 : *Ruditapes philippinarum*
Evolution du taux de glycogène



Marennes-Oléron : CREA

Suivi pathologique

La présence de la maladie des anneaux bruns a été décelée dans le premier et le dernier prélèvement de l'année, ce qui est exceptionnel dans un site de marais. Après le mois de mars, parallèlement à l'augmentation de la température dans les marais, la présence d'anneaux a totalement disparu, et certaines palourdes touchées présentaient des recalcifications totales ou partielles de la coquille.

Survie

Les taux de survie pour l'ensemble du suivi ont été très satisfaisants, puisque 81% des palourdes diploïdes et 75.1% des palourdes triploïdes ont été récupérées en fin d'élevage. La différence enregistrée entre les diploïdes et les triploïdes doit être imputée à la plus forte sensibilité des triploïdes au développement de la maladie des anneaux bruns.

4.5.3. Suivi des performances de croissance à La Trinité sur Mer

Deux lots de palourdes (diploïdes et triploïdes) ont été mis en élevage sur le site des Presses à La Trinité sur Mer en avril 1991 à une densité de 200 palourdes par m².

Les prélèvements (biométrie, biochimie et gamétogenèse) ont montré, une différence de croissance entre le lot témoin diploïde et les triploïdes vrais (après tri par imagerie numérique). Cette différence a été dans un premier temps en faveur des diploïdes, et en final en faveur des triploïdes (poids final moyen de 22.5g pour les triploïdes et de 19.5g pour les diploïdes). Une plus grande homogénéité du lot témoin a été également constatée en fin d'élevage.

Parallèlement, l'évolution des indices de condition montre une avance du lot témoin jusqu'à la ponte (juin-juillet 92), suivi d'une inversion en faveur des triploïdes jusqu'à la pêche finale. Ces valeurs d'indice sont très nettement supérieures à celles enregistrées dans les marais du CREEA à l'île d'Oléron (en moyenne deux fois plus grands).

La survie globale au niveau des parcelles ne montre pas de différence significative entre les lots, seule une parcelle du lot triploïde a présenté dès le début, une mortalité plus élevée non expliquée (survie dans les parcelles diploïdes : 52.7%, 61.5%, 52.7% - survie dans les parcelles triploïdes : 50.7%, 52.5%, 24.7%).

Au niveau pathologique, l'apparition d'anneaux bruns est simultanée dans les deux lots, cependant le lot triploïde est rapidement plus atteint. En final, le lot témoin comporte 12.5% de palourdes présentant de l'anneau brun, alors que dans le même temps le lot triploïde est touché à 25%.

Une étude des poids montre une distribution unimodale pour le lot témoin, alors que le lot triploïde (après élimination des réfractaires par la méthode des maximums successifs) présente deux modes et une variabilité de poids tout aussi grande que celle obtenue à Marennes-Oléron.

4.5.4. Comparaison de la gamétogenèse femelle chez les palourdes diploïdes et triploïdes cultivées à La Trinité et à Marennes-Oléron.

Objectif.

Ce travail, réalisé par l'Université de Bretagne Occidentale, avait pour but d'effectuer le suivi histologique comparatif de la gamétogenèse femelle au cours de l'année 1992, dans les populations diploïdes et triploïdes de La Trinité sur Mer et de Marennes-Oléron.

Résultats.

Palourdes diploïdes.

La comparaison du cycle de maturation des palourdes diploïdes femelles provenant de La Trinité et de Marennes permet de tirer un certain nombre de conclusions quant à la dynamique de la gamétogenèse chez ces deux populations :

- les palourdes originaires de La Trinité commencent à maturer plus tôt qu'à Marennes,
- la maturation est par contre beaucoup moins rapide à La Trinité qu'à Marennes,
- à Marennes, les acini restent pleins près de deux mois et demi. Ce n'est pas le cas à La Trinité,
- les valeurs maximales du taux d'occupation moyen des acini par des ovocytes sont moins élevés à La Trinité qu'à Marennes,
- en période de maturation maximale, les acini des palourdes prélevées à La Trinité sont jointifs. L'espace intercellulaire reste toujours plus important à Marennes,
- des anneaux bruns ont été observés à La Trinité mais pas à Marennes. Ils sont plus fréquents chez les triploïdes que chez les diploïdes

Les remarques concernant la dynamique de la gamétogenèse devront être corrélées avec des données antérieures, si elles existent, et tenir compte des facteurs de l'environnement, de l'état de santé des animaux (anneaux bruns) et des indices de croissance (taille, poids). En outre, le fait que les palourdes prélevées à La Trinité se soient en partie vidées de leurs produits sexuels lors de l'ouverture des coquilles avant fixation doit aussi être pris en compte.

Palourdes triploïdes.

L'analyse de la gamétogenèse sur coupes en paraffine montre que la triploïdisation des palourdes femelles exerce un effet inhibiteur sur la maturation sexuelle : les ovocytes d'aspect mature sont rares chez les triploïdes prélevées à La Trinité comme à La Tremblade. En outre, ils apparaissent plus tardivement que chez les diploïdes.

L'inhibition de la maturation ovocytaire n'est cependant pas de 100% :

- chez certains individus, quelques ovocytes parviennent apparemment à maturité. Il serait intéressant, pour pouvoir préciser s'il sont réellement matures ou seulement d'apparence mature, de les étudier plus finement au point de vue taille et aux plans structural et biochimique ainsi qu'au plan de la maturité caryologique (de telles femelles peuvent-elles être fécondées, peut-on ensuite obtenir des embryons ?).
- quelques individus triploïdes montrent, quelque soit leur origine géographique, une gamétogenèse similaire à celle des diploïdes.

On remarque régulièrement que chez les triploïdes, les cellules qui tapissent la paroi interne des acini sont nombreuses. Une étude cytologique plus fine (microscopie électronique) permettrait donc peut-être de préciser à quel stade se produit le blocage de la gamétogenèse chez les triploïdes.

4.5.5. Bilan provisoire

Tant que toutes les données de ces expériences n'auront pas été traitées, il sera difficile de conclure sur les avantages et les inconvénients de la triploïdisation chez *Ruditapes philippinarum*. Néanmoins, les premiers résultats montrent que la triploïdisation exerce bien un effet inhibiteur sur la maturation ovocytaire, et que cette inhibition se traduit différemment selon les sites. Si l'on se réfère aux résultats de La Trinité, la diminution de la gamétogenèse entraîne un léger gain de croissance après la période estivale en faveur des triploïdes; ce phénomène ne se produit pas à Marennes où la croissance des triploïdes reste similaire à celles des diploïdes. Ce comportement différent est probablement liés aux écarts constatés entre les deux sites au niveau des indices de condition. Dans un site moins riche, comme celui de Marennes (indices de condition deux fois plus faibles qu'à La

Trinité), la triploïdisation se révèle être sans effet sur la croissance et sur la constitution biochimique. Parallèlement, et dans les deux sites, les palourdes triploïdes se sont toujours montrées plus sensibles à la maladie des anneaux bruns. A ce stade de l'étude, il ne semble pas qu'il y ait un avantage à produire des palourdes japonaises triploïdes. Des conclusions définitives seront apportées quand le traitement de toutes les données sera achevé.

4.6. Contrôle des performances biologiques des populations diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas* à Ouistreham.

Une première production de populations d'huîtres diploïdes et triploïdes a été réalisée en 1990 (Gérard *et al.*, 1991). Ces lots d'huîtres ont fait l'objet d'un contrôle de leurs performances biologiques dans le milieu naturel, à La Tremblade et à Ouistreham. Les résultats du suivi de La Tremblade ont été fournis dans le rapport précédent (Gérard *et al.*, 1992), l'expérience ayant été écourtée suite à de fortes mortalités, enregistrées en juin 1991, dans les claires de la Section Régionale à Avallon.

Les populations d'huîtres diploïdes et triploïdes expédiées au laboratoire IFREMER d'Ouistreham en mars 1991, ont été placées en élevage sur estran dans les sites de la Baie des Veys et de Ste Marie du Mont (côte Est-Cotentin).

4.6.1. Survie

En août 1991, une mortalité de l'ordre de 30% a été observée sur l'élevage de la côte Est-Cotentin (34% sur la population "triploïde" et 30% sur les diploïdes). Cette mortalité a par ailleurs été constatée par les professionnels sur l'ensemble du site. Pendant la même période, les mortalités en Baie des Veys ont atteint 10% de la population "triploïde" et 3% de la population diploïdes.

	Lot	Nombre hors prélèvement début 1992	Nombre hors prélèvement Sept 1992	Survie	Différence Triploïdes Diploïdes (92)
Est-Cotentin	Diploïdes	388	268	69.1%	-20.7%
	Triploïdes	357	168	48.4%	
Baie des Veys	Diploïdes	170	148	87.1%	-14.3%
	Triploïdes	151	110	72.8%	

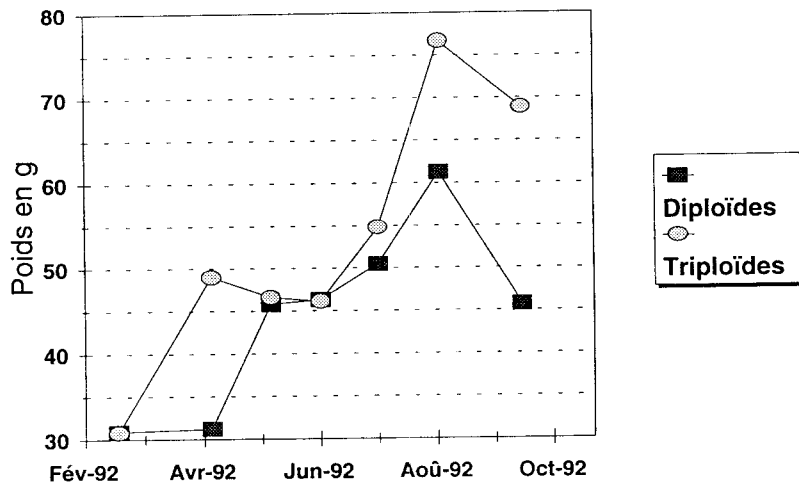
Tableau 10 : survie des lots diploïdes et triploïdes en 1992.

En 1992, on observe des mortalités toujours plus importantes sur les lots "triploïdes" que sur les lots diploïdes et cette tendance est plus accentuée sur le site Est-Cotentin qu'en Baie des Veys.

4.6.2. Evolution des paramètres biométriques

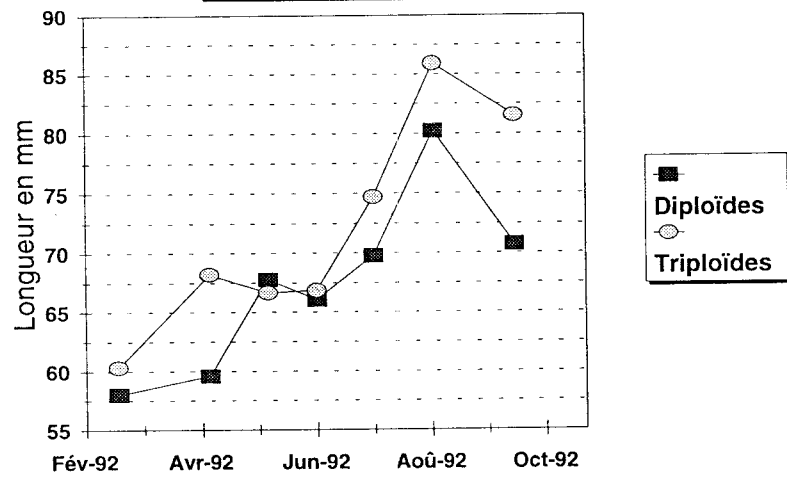
Pendant la première année, hormis un effet site, les différences entre les triploïdes et les diploïdes ne sont pas significatives, probablement en raison du faible effort de reproduction au cours de la première année d'élevage (Tableau 11). En fin d'expérimentation, en septembre 1992, les huîtres triploïdes montrent des caractéristiques biométriques significativement supérieures aux diploïdes (figures 33 à 35). Si l'expérience avait pu être conduite jusqu'en fin d'année, cette différence aurait certainement été accentuée.

Fig.33 : *Crassostrea gigas*
Evolution du Poids total



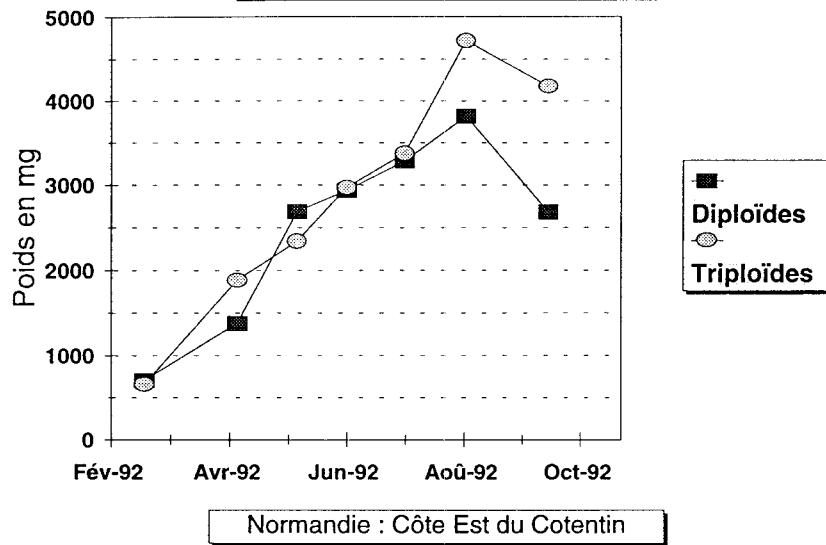
Normandie : Côte Est du Cotentin

Fig. 34 : *Crassostrea gigas*
Evolution de la longueur

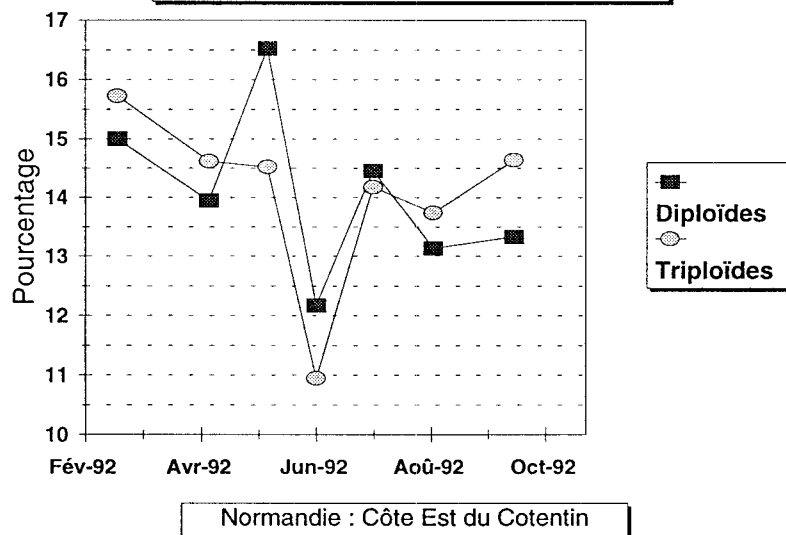


Normandie : Côte Est du Cotentin

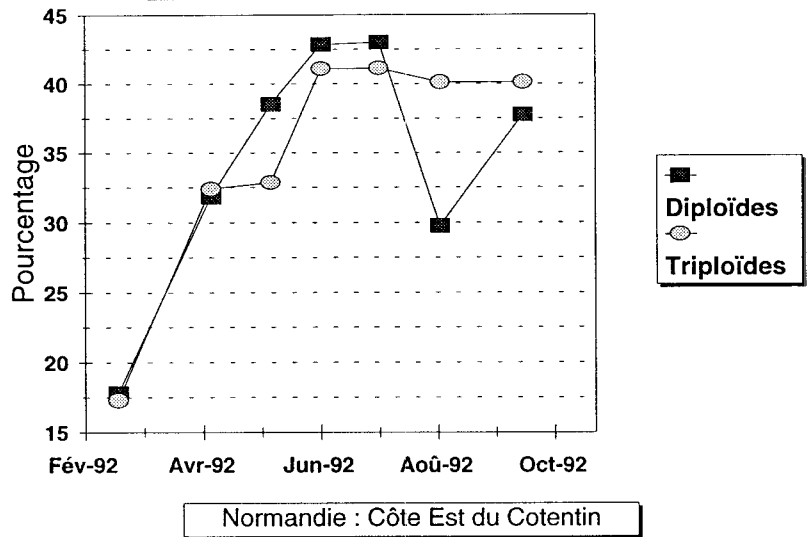
**Fig. 35 : *Crassostrea gigas*
Evolution du Poids Sec**



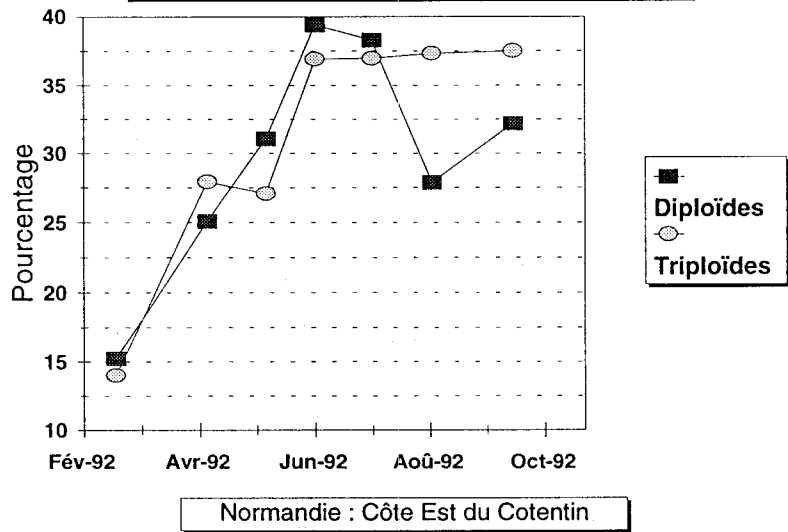
**Fig. 36 : *Crassostrea gigas*
Evolution du pourcentage de lipides**



**Fig. 37 : *Crassostrea gigas*
Evolution du pourcentage de glucides**



**Fig. 38 : *Crassostrea gigas*
Evolution du pourcentage de glycogène**



	Lot	Poids total moyen mars 1991	Poids total moyen avril 1992	Poids total moyen sept. 1992	Différence Triploïdes Diploïdes
Est-Cotentin	Diploïdes	2.6g	36g	45.7g	+50.7%
	Triploïdes	2.3g	37g	68.9g	
Baie des Veys	Diploïdes	2.6g	29g	56.6g	+25.1%
	Triploïdes	2.3g	26g	70.8g	

Tableau 11 : Evolution du poids total moyen au cours de l'expérience.

L'évolution mensuelle des poids secs moyens de la côte Est-Cotentin (Figure 33) montre également une prise de poids supérieure chez les animaux triploïdes parallèlement au processus de gamétogenèse chez les diploïdes.

4.6.3. Evolution des paramètres biochimiques

Les variations mensuelles des lipides, glucides et glycogène sont présentées dans les Figures 34 à 36. Hormis le fait que les taux de glycogène restent en Normandie très élevés par rapport à ceux enregistrés dans le bassin de Marennes-Oléron (Gérard *et al.*, 1992), même pendant la période de gamétogenèse, il faut noter la chute des pourcentages en glycogène et sucres totaux des animaux diploïdes correspondant à la fin de maturation des produits génitaux.

4.6.4. Bilan provisoire

Les résultats préliminaires obtenus en Normandie et à La Tremblade en 1991, sont comparables, en ce qui concerne les performances de croissance, avec les travaux d'Allen et Downing (1986). Les huîtres triploïdes présentent des caractéristiques biométriques supérieures à celles des huîtres diploïdes dès que le processus de gamétogenèse est entamé. Toutefois, ces résultats particulièrement intéressants doivent être tempérés par les données brutes de survie qui sont nettement en faveur du lot diploïde. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour vérifier si ces résultats de survie ne sont pas un artefact, et dans quelle mesure dans le lot "triploïde", la mortalité a frappé de façon similaire les triploïdes vrais et les diploïdes réfractaires au traitement. Le nouveau programme de contrôle de performances engagé en 1993 devrait permettre de répondre à ces questions.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Une première optimisation de l'induction de la triploïdie par le 6-DMAP a été réalisée sur *Crassostrea gigas*. Ces expériences ont confirmé l'intérêt du 6-DMAP par rapport à la cytochalasine B (meilleure survie larvaire en particulier), même si jusqu'à présent les taux de triploïdes obtenus sont légèrement inférieurs.

Les populations diploïdes et triploïdes d'*Ostrea edulis* obtenues en 1991, ont été mis en élevage en deux sites, La Trinité-sur-mer et Palavas, et les contrôles de performances sont en cours.

Parmi les résultats les plus importants obtenus en 1992 figurent les premiers bilans sur les croissances respectives des lots diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas* et *Ruditapes philippinarum*. Il apparaît en effet que pour les palourdes, l'intérêt de la triploïdisation est faible, voire nul. **Dans le cas de l'huître creuse, les premiers résultats de performances de croissance enregistrées en Normandie, sont nettement en faveur des triploïdes, toutefois, pour les deux espèces, des mortalités différentielles en défaveur des triploïdes ont été relevées ainsi qu'une plus grande sensibilité à l'anneau brun dans le cas des palourdes.**

Sous réserve de confirmation, ces premiers résultats montrent que le choix des triploïdes devra vraisemblablement être guidé par la prise en compte de nombreux facteurs extérieurs. La quantité de nourriture disponible semble être le facteur le plus important mais la présence de maladie ou la présence de toute autre source potentielle de stress peuvent également intervenir.

Dans le cadre de ce programme, il est donc nécessaire en 1993 :

- de mener à terme l'optimisation de l'induction de la polyploïdie avec le 6-DMAP par le recours à des plans d'expérience adaptés.
- de mesurer dans différentes conditions les performances des populations diploïdes et triploïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas* et d'huître plate *Ostrea edulis* dans le milieu naturel et au laboratoire.
- d'achever le traitement des données portant sur le contrôle de performances des populations diploïdes et triploïdes d'huître creuse *Crassostrea gigas* et de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum*.
- de mettre en place le transfert des connaissances pour les éclosiers et les éleveurs, en veillant tout particulièrement à ce que les messages soient adaptés à leurs destinataires.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonymes, 1990.** Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation (1^{ère} partie). Rapports internes IFREMER - RIDRV - 90.29 -RA/La Tremblade
- Allen, S.K., JR. & 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., & Downing, S.L., 1990.** Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* : Gametogenesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**, 1213-1222.
- Arai, K., Naito, F. & Fujino, K., 1986.** Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **52** : 417-422.
- Beaumont, A.R. & Contaris, M.H., 1988.** Production of triploid embryos of *Tapes philippinarum* by use of cytochalasin B. *Aquaculture*, **73** : 37-42.
- Chevassus, B., 1987.** Caractéristiques et performances des lignées uniparentales et de polyplodes 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, polyplodie et transfert de gènes chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, 60p.
- Diter, A., 1990.** Reproduction uniparentale et polyplodie 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.
- Diter, A. & Dufy, 1990.** Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. II Chemical induction of tetraploid embryos., *Aquac. Liv. Res.*, **3** : 107-112.
- Downing, S.L. & Allen, S.K., Jr., 1987.** Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, **61** : 1 -15.
- Dufy, C. & 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 Polyplodie 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 polyplodie chez l'huître plate larvipare, *Ostrea edulis* (L.). Mémoire de DEA, Univ. Bret. Occi., Brest, 30p.

- Gendreau, S. & Grizel, H., 1990.** Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L.. *Aquaculture*, **90** : 229-238.
- Gérard, A., 1991.** Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation (2^{ème} partie). Rapport Interne IFREMER, RIDRV-91.08 - RA La Tremblade.
- Gérard, A., Peignon, J.-M., Ledu, C., Phélipot, P., Noiret, C., Bodoy, A., Heurtebise, S., & Garnier, J., 1992.** Obtention de souches conchylicoles performantes par polyploïdisation (3^{ème} partie). Rapport Interne IFREMER, RIDRV-92.11 - RA La Tremblade.
- Gouletquer, P., 1989.** Etude des facteurs environnementaux intervenant sur la production de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, 347p.
- Heral, M., & 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.
- Ledu, C., 1989.** Applications de méthodes cytogénétiques aux mollusques bivalves. Mémoire de DTSM Intechmer. 30p.
- Lucas, A., 1971.** Les gamètes des mollusques. *Haliotis*, **1(2)** : 185-214.
- Néant, I. & 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. & 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. & 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.

-ANNEXE 1-

COLORATION DES CELLULES AU FLUOROCHROME HOESCHT 33258 (OBSERVATION AU MICROSCOPE A EPIFLUORESCENCE)

METHODE :

- ◆ Fixer les cellules dans le tampon GA + formol 6%: 1 volume d'ovocytes + 1 volume de tampon. Fixation pendant 60 minutes.
- ◆ Enlever le tampon fixateur par aspiration.
- ◆ Laver 60 minutes dans le tampon GA.
- ◆ Colorer 60 minutes dans GA + 0.5 µg/ml Hoescht 33258 (solution "stock" à 0.5 mg/ml).
- ◆ Laver 2 fois avec du GA.
- ◆ Observer au microscope à épifluorescence.

MATERIEL :

Tampon GA:

<u>produit</u>	<u>molarité</u>	<u>g/l de solution</u>
N-méthylglucamine	250 mM	48.8
K-gluconate	250 mM	58.6
HEPES	50 mM	13.0
EGTA	10 mM	3.8

Ajuster le pH à 7.4 avec de l'acide acétique glacial.

TAMPON DE FIXATION :

Préparation de 500 ml : 79 ml de formaldéhyde 38% et compléter à 500 ml avec le tampon GA.

-ANNEXE 2-

PROTOCOLE DU CONTRÔLE DE PERFORMANCES POUR L'HUÎTRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS*

Sites et structures.

Deux lieux ont été retenus pour tester les performances des huîtres creuses triploïdes, La Tremblade (en deux sites) et Port-en-Bessin, qui assureront un suivi complet des lots (mortalité, biométrie, biochimie, gamétogenèse et préparation de lames pour l'analyse d'image). Les stations de Palavas et d'Arcachon assureront un suivi réduit (mortalité, biométrie et préparation des lames). La station de Bouin gardera également un lot de chaque niveau de ploïdie pour un suivi, en milieu très contrôlé, de l'influence sur la croissance, de différents niveaux trophiques.

Origine des lots.

Les lots analysés proviendront de deux élevages distincts, CG3N9218 et CGGY9226 dont les lots respectifs diploïdes et triploïdes seront, pour certains sites, mélangés en respectant les classes de taille dans la mesure du possible.

Techniques d'élevage.

◆ L'élevage se fera en poches. La densité et le maillage des poches seront ajustés en fonction de la taille des huîtres, variable d'un site à l'autre. Les huîtres de chaque niveau de ploïdie devront être réparties en au moins deux poches, l'une servant au suivi de la mortalité l'autre aux prélèvements mensuels. Les conditions d'élevage devront évidemment être strictement identiques pour les deux lots diploïdes et triploïdes.

◆ A La Tremblade, les lots seront étudiés en 2 sites : estran et claire.

◆ A Port-en-Bessin, les lots seront étudiés sur estran.

◆ A Palavas, le site sera profond (20 mètres), un modèle de structure basé sur les anciens containers sera mis au point de manière à améliorer la circulation de l'eau entre les poches et à faciliter l'échantillonnage en plongée.

◆ A Arcachon, les lots seront étudiés sur estran. Un site représentatif des conditions moyennes de croissance sera choisi.

Paramètres étudiés.

Mortalité: la mortalité sera estimée à chaque prélèvement, sur une poche réservée à cet usage.

Paramètres biométriques:

Les paramètres biométriques suivants seront mesurés sur 30 individus de chaque niveau de ploïdie (soit 60 au total) :

- poids total de l'huître brossée et essuyée rapidement,
- poids frais de chair,
- poids sec de chair après lyophilisation,
- poids de coquille sèche (24h à l'étuve à 60°C),
- indice de condition (Lawrence et Scott)

$$I.C. = \frac{\text{poids sec de chair}}{(\text{poids total}) - (\text{poids coquille sèche})} \times 10^3$$

Paramètres biochimiques:

Les analyses biochimiques porteront sur les individus ayant servis à la mesure des paramètres biométriques.

- protéines
- lipides
- glucides totaux
- glycogène

Ploïdie: La détermination de la ploïdie se fera par analyse d'image d'empreintes branchiales pour chacun des animaux analysés, que ce soit pour les paramètres biométriques ou biochimiques. Les empreintes branchiales seront effectuées par chaque laboratoire sur les individus des lots triploïde (30) et diploïde (30) servant de témoins. La coloration des lames sera assurée par chacun des laboratoires et les lames analysées à l'URGE. Rappelons que des stages de préparation et coloration de lames ont été organisés à La Tremblade (formation de deux personnes de Port-en-Bessin, et d'une personne de La Trinité), et que d'autres sessions sont envisageables. Selon la réponse donnée par Arcachon, la coloration des lames se fera sur place, ou à La Tremblade.

Gamétogenèse.

Le suivi de la gamétogenèse se fera mensuellement sur 10 individus diploïdes et 10 individus triploïdes et ne concernera qu'un seul des 2 sites de Marennes-Oléron. Les analyses seront effectuées par M. Le Pennec de l'Université de Bretagne Occidentale sous contrat d'incitation.

Méthode de prélèvement.

Nombre sur chaque site : 700 à 2 000 par niveau de ploïdie, selon les sites.

Nombre à prélever à chaque échantillonnage : 30 huîtres de chaque niveau de ploïdie qui serviront pour la biométrie, la biochimie (pour Marennes-Oléron et Port-en-Bessin), et la détermination de la ploïdie. A Marennes-Oléron, 10 huîtres supplémentaires par niveau de ploïdie seront prélevées pour le suivi de la gamétogenèse pour un des deux sites.

Prélèvement des huîtres dans des poches différentes si le nombre de poches s'y prête (15 et 15 au début) avec changement de poches à chaque fois si un dédoublement a eu lieu.

Les empreintes sur lames pour la détermination de la ploïdie doivent être réalisés avant la lyophilisation ou la dessiccation de chaque huître.

Calendrier des prélèvements.

Mise en poche sur les sites d'élevage mi-Mars 1993

Dates de prélèvement :

15 Mars 1993 : ce prélèvement sera effectué par Bouin et la Tremblade (URRA) avant l'envoi des lots aux différents sites.

15 Avril 1993

15 Mai 1993

15 Juin 1993

15 Juillet 1993

1er Août 1993

15 Août 1993

1er Septembre 1993

15 Septembre 1993

15 Octobre 1993

15 Novembre 1993

-ANNEXE 3-

PROCOLE DU CONTRÔLE DE PERFORMANCES POUR LA PALOURDE JAPONAISE *RUDITAPES PHILIPPINARUM*.

Sites et structures :

Trois lieux ont été retenus pour tester les performances des palourdes triploïdes : La Trinité-sur-Mer, le CREA de l'île d'Oléron et le site de Brouenou, concession privée de Charles Aveline.

Taille des lots :

5000 palourdes par lot diploïde et triploïde ont été distribuées dans chaque site.

Techniques d'élevage :

Le semis a eu lieu dans les conditions suivantes :

- ♦ dans chaque site, 3 bandes de chaque lot ont été mises en place, soit 6 bandes au total,
- ♦ dans la partie la plus basse de chaque bande, une poche de 250 palourdes pour les 6 premiers mois, puis de 100 palourdes pour la suite de l'élevage a servi au suivi de la mortalité.

Paramètres étudiés.

Mortalité: la mortalité sera estimée à chaque prélèvement, sur les poches réservées à cet usage.

Paramètres biométriques:

Les paramètres biométriques suivants seront mesurés sur 30 individus de chaque niveau de ploïdie (soit 60 au total), à raison de 10 individus par bande :

- épaisseur,
- longueur,
- poids total,
- poids frais de chair,
- poids sec de chair après lyophilisation,
- poids de coquille sèche (24h à l'étuve à 60°C),
- indice de condition (Lawrence et Scott)

$$I.C. = \frac{\text{poids sec de chair}}{(\text{poids total}) - (\text{poids coquille sèche})} \times 10^3$$

Paramètres biochimiques :

Les analyses biochimiques porteront sur les individus ayant servis à la mesure des paramètres biométriques.

- protéines
- lipides
- glucides totaux

Détermination de la ploïdie : La détermination de la ploïdie s'est faite par analyse d'image d'empreintes branchiales pour chacun des animaux analysés, que ce soit pour les paramètres biométriques ou biochimiques. Les empreintes branchiales ont été effectuées par chaque laboratoire sur les individus des lots triploïde (30) et diploïde (30) servant de témoins, puis envoyées pour analyse à l'URGE.

Gamétogenèse :

Le suivi de la gamétogenèse s'est fait sur 20 individus diploïdes et 20 individus triploïdes fin Août 1991 puis mensuellement de Février à Septembre 1992.

Pathologie :

Suivi de la présence de l'anneau brun sur les palourdes ouvertes pour analyses.